

Schlussbericht

Teil B gemeinsamer Sachbericht

zum Vorhaben

Thema: **Bioraffinerie auf Basis kohlenhydratreicher Algenbiomasse, Nutzung von Stärke und Protein**

Zuwendungsempfänger:

Fraunhofer IGB

Subitec GmbH

Südzucker AG

Förderkennzeichen:

Fraunhofer IGB 22403211

Subitec 22404612

Südzucker 22404712

Laufzeit:

12.2012 bis 11.2015

Monat der Erstellung:

02/2016

Datum der Veröffentlichung:

13.06.2016

Gefördert durch:



**Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft**

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Autoren:

Dr. Ulrike Schmid-Staiger - Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, Stuttgart

Claudia Holdmann, M. Sc. - Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie, Universität Stuttgart

Dr. Peter Ripplinger, Peter Bergmann, M. Sc. – Subitec GmbH, Stuttgart

Dr. Wolfgang Wach, Dr. Michael Klingenberg, Dipl. Ing. Hannah Haußmann – Südzucker AG, Offstein

Inhaltsverzeichnis

II.1	Erzielte Ergebnisse	1
AP 1	Auswahl und Prozessentwicklung für verschiedene Stärkeproduzenten	1
1.1	Algenauswahl und Charakterisierung	1
1.2.	Zweistufige Prozessentwicklung für die Produktion stärkereicher Algen.....	5
1.2.1	Versuche mit <i>Chlorella sorokiniana</i> im 6-Liter Laborreaktor	5
1.2.2	Freilandversuche mit <i>Chlorella sorokiniana</i>	9
1.2.3	Versuche mit <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> im 6-Liter Laborreaktor	14
1.2.4	Freilandversuche mit <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	16
1.2.5	Stärkebildung durch weitere Algen.....	22
AP 2	Effizienzsteigerung der Algenproduktion	25
2.1	Wachstum und Stärkeproduktion auf Basis von Flüssiggärrest	25
2.2	Wachstum und Stärkeproduktion auf Basis CO ₂ aus der Ethanolfermentation ...	27
2.3	Etablierung online-Monitoring und Erhöhung des Automatisierungsgrades	31
2.3.1	Trockensubstanzgehalt	32
2.3.1	Fluoreszenz	35
2.3.1	Gasförmiges/gelöstes Kohlendioxid und Temperatur	38
AP 3	Algenernte, Zellaufschluss und erste Fraktionierung	39
3.1	Zellernte	39
3.2	Untersuchungen zum Zellaufschluss.....	41
3.3	Fraktionierung von aufgeschlossener Algenbiomasse.....	48
AP 4	Stärkegewinnung und Vergärung zu Ethanol	49
4.1	Enzymatische Stärkehydrolyse und Test des Hydrolysats auf Vergärbarkeit.....	49
AP 5	Proteinextraktion	51
5.1	Gewinnung der löslichen Proteinfraktion	52
5.2	Gewinnung der partikulären Proteinfraktion /Gewinnung partikulärer Proteine und Proteinhydrolysate	54
AP 6	Vergärung der Reststoffe zu Biogas	61
6.1	Vergärung von Klarschlempe zu Biogas.....	61
AP 7	Aufbau und Betrieb der Pilotanlage	63

7.1	Aufbau und Inbetriebnahme der Pilotanlage bei CropEnergies in Zeitz	63
7.2	Übertragung der optimierten Parameter aus AP1 auf die Pilotanlage.....	65
7.2.1	Wachstum und Stärkeproduktion	65
7.2.2	Online Messung der Trockensubstanz	71
AP 8	Projektkoordination	74
II.2	Verwertung.....	75
II.2.1	Wirtschaftliche Erfolgsaussichten.....	75
II.3	Erkenntnisse von Dritten	80
II.4	Veröffentlichungen	83

II.1 Erzielte Ergebnisse

AP 1 Auswahl und Prozessentwicklung für verschiedene Stärkeproduzenten

Ziel des ersten Arbeitspakets war zunächst die Auswahl einer Algenart, die in der Lage ist hohe Stärkegehalte zu akkumulieren. Anschließend wurde für die zwei besten Kandidaten ein zweistufiger Prozess für Wachstum und Stärkeproduktion in Flachplatten-Airlift-Reaktor zunächst im Labor optimiert. Der nächste Schritt war die Übertragung der Laborergebnisse auf die Kultivierung in 28-Liter Reaktoren im Freiland und die Optimierung des Prozesses unter realen Freilandbedingungen.

1.1 Algenauswahl und Charakterisierung

Die Zusammensetzung von Mikroalgenbiomasse kann je nach Algenart aber auch bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen stark variieren. Unter optimaler Nährstoffversorgung enthalten die meisten Mikroalgen einen Proteingehalt von etwa 50-60 % (Becker, 2007). Unter Nährstofflimitierung sind viele Mikroalgen in der Lage in hohem Maße Speicherstoffe wie Lipide oder Kohlenhydrate einzulagern. Um die optimale Alge für das Vorhaben zu finden wurde zunächst eine Literaturrecherche zu kohlenhydratreichen Mikroalgen in verschiedenen Literaturdatenbanken durchgeführt (science direct, PubMed, Scirus – for scientific information). Die Mikroalgenklassen unterscheiden sich dabei in der Art des Kohlenhydrats, das als Speicherstoff genutzt wird. In Tabelle 1 sind als Übersicht die unterschiedlichen Stärketypen, die von Mikroalgen als Speicherprodukt gebildet werden aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht über verschiedene Speicherstärketypen in verschiedenen Algenklassen (Metting Jr, 1996).

Systematische Ordnung	Kohlenhydrattyp
Cyanobakterien	Myxophycean Stärke (Amylopektin-/ Glycogen-ähnliche Einheiten)
Rotalgen	Florideenstärke (Amylopektin-Einheiten)
Grünalgen	quervernetzte Amylose-Amylopektin-Stärke (ähnlich der Stärke in Landpflanzen; Fructosan (inulin-ähnliche Fructose-Oligosaccharide)
Cryptophyten und Dinoflagellaten	α -1,4-verknüpfte Glucane
Diatomeen	Laminarin bzw. Chrysolaminarin β -1,3 und α -1,6 verknüpfte Glucose)
Chrysophyten	Chrysophyceen-Stärke (wasserlösliches β -1,3-Glucopyranosid)
Euglenoide und Haptophyta (Kalkalgen)	Paramylon (β -1,3-verknüpfte D-Glucose)

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Literaturrecherche zum Kohlenhydratgehalt verschiedener Algenstämme zusammengefasst. Sowohl für Algenstämme aus Frischwasser- als auch Meerwasserhabitaten und auch aus verschiedenen Algenklassen werden Kohlenhydratgehalte von bis zu über 50 % (w/w) beschrieben.

Tabelle 2: Algenstämme und Kohlenhydratgehalt beschrieben in der Literatur, falls keine Stammnummer einer Algenstammsammlung verfügbar ist, wird der Herkunftsort genannt. Falls der Kohlenhydratgehalt nicht angegeben war ist dies durch k.A. (keine Angabe) gekennzeichnet).

Stamm	Kohlenhydratgehalt beschrieben	Bemerkungen/ Literatur
<i>Monodopsis subterranea</i> UTEX 151	Nur Fotos, mixotroph	(Liu and Lin, 2005)
<i>Chlorella kessleri</i> 11-h	k.A.	Izumo et al. 2007
<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-8k	45-50%	Pirt and Pirt 1977
<i>Chlorella vulgaris</i> (Trebon)	46%	(Brányiková et al., 2011)
<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/19	55-65%	(Pruvost et al., 2011)
<i>Chlamydomonas reinhartii</i> UTEX90= SAG11-32b	44 % (mixotroph)	(Choi et al., 2010)
<i>Tetraselmis (Platymonas) subcordiformis</i> (aus Dalian)	62 %	(Yao et al., 2012)
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M33 (Florenz)	50%	(Bondioli et al., 2012)
<i>Skeletonema costatum</i> (Trondheim)	k.A	(Vårum and Myklestad, 1984)
<i>Phaeodactylum tricorutum</i> SAG 1090-1a = UTEX 642	50%	(Jakob et al., 2007)
<i>Phaeodactylum tricorutum</i> SAG 1090-1b = UTEX 640	20%	IGB, eigene Ergebnisse

Aus den in Tabelle 2 aufgeführten Algenstämmen, bei denen in der Literatur erhöhte Stärkegehalte beschrieben wurden, wurden einige von den Stammsammlungen in Göttingen (SAG) oder in Großbritannien (CCAP) bezogen (Tabelle 3):

Diese Algen wurden in Kultur genommen um sie anschließend in Schüttelkolbenexperimenten auf die Kohlenhydratbildung zu testen. In der Auswahl befinden sich Stämme, die unterschiedlichen Algenklassen angehören. Die Liste enthält sowohl Frischwasser- (Medium KBM, DSN, OHM), Brackwasser- (f/2, M&M) als auch Meerwasser- (VM, VM+Si).

Tabelle 3: Algenstämme, die von der SAG bzw. CCAP bezogen wurden und deren Medium/Mediumstyp (FW: Frischwasser; BW: Brackwasser; MW: Meerwasser).

Stamm	Medium	Kohlenhydrattyp
<i>Parachlorella kessleri</i> CCAP 211-11H	OHM (FW)	Amylose/Amylopektin
<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-8k	DSN (FW)	Amylose/Amylopektin
<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/19.	DSN (FW)	Amylose/Amylopektin
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CCAP 11/32A	OHM (FW)	Amylose/Amylopektin
<i>Monodopsis subterranea</i> SAG 848-1	OHM (FW)	Laminarin
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCAP 1052/1A	f/2 (BW)	Laminarin
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCAP 1052/1B	M&M (BW)	Laminarin
<i>Tetraselmis suecica</i> CCAP 66/4	f/2 (BW)	Amylose/Amylopektin
<i>Tetraselmis subcordiformis</i> (Dalian strain)	VM (MW)	Amylose/Amylopektin
<i>Scenedesmus vacuolatus</i> SAG 211-8b	DSN (FW)	Amylose/Amylopektin
<i>Skeletonema costatum</i> CCAP 1077/1B	VM+Si (MW)	Laminarin

Nach einigen Vorversuchen zum Aufschluss von Laminarin, wurde nach Absprache mit den Projektpartnern die Versuche mit den entsprechenden Algen gestoppt. Laminarin ist nur schwer hydrolysierbar und entsprechende Enzyme stehen großtechnisch nicht zur Verfügung wodurch Laminarin für die Vergärung zu Ethanol ungeeignet ist. Zudem wurde von der Subitec GmbH mitgeteilt, dass die Pilotanlage in Zeitz nicht für Meerwasseralggen ausgelegt ist, deshalb wurde die Stammauswahl auf Frisch- und Brackwasseralggen beschränkt.

Tabelle 4: Für das Stärkescreening verwendete Stämme.

Stamm	Medium
<i>Parachlorella kessleri</i> CCAP 211-11H	OHM
<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-8k	DSN
<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/19.	OHM
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CCAP 11/32A	OHM
<i>Tetraselmis suecica</i> CCAP 66/4	f/2
<i>Scenedesmus vacuolatus</i> SAG 211-8b	DSN

Die verbleibenden Stämme (Tabelle 4) wurden in Schüttelkolben vermehrt und in stickstoff- und phosphatfreiem Medium verdünnt um die Stärkebildung zu induzieren. Die Methode der Stickstofflimitierung zur Induktion der Stärkebildung ist auch in der Literatur vielfach beschrieben ((Pirt and Pirt, 1977), (Behrens et al., 1989), (Bondioli et al., 2012)). Ebenfalls beschrieben ist eine Sulfatlimitierung, die zur Induktion der Stärkebildung führt (Brányiková et al., 2011), wegen des geringen Sulfatverbrauchs der Algen müssen diese jedoch vor der Limitierung vom Medium abgetrennt werden und in neuem, sulfatfreiem

Medium aufgenommen werden, was großtechnisch nicht umsetzbar ist. Stickstoff und Phosphat werden von den Algen dagegen in höheren Mengen verbraucht, sodass eine Entfernung nicht notwendig ist. Daher wurde das Screening auf Stickstoff- und Phosphat-limitierung begrenzt.

Nach ersten Versuchen in denen nur der Endstärkegehalt der Kultur nach 10-12 Tagen N/P-Limitierung gemessen wurde, wurden in den folgenden Versuchen zehn Kolben derselben Alge zeitgleich angeimpft und jeweils 2 Kolben zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung analysiert um den Verlauf der Stärkebildung beobachten zu können. Ein Beispiel für diese Versuche ist in Abbildung 1 gezeigt.

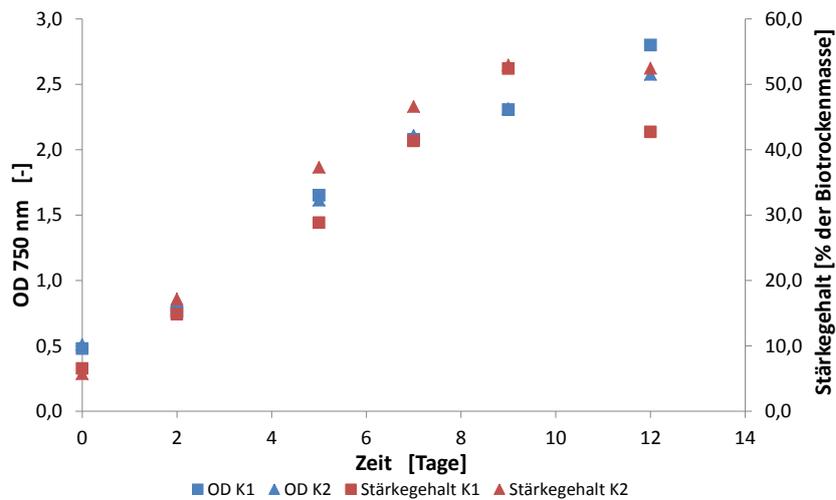


Abbildung 1: Verlauf der optischen Dichte (blau) und des Stärkegehalts (rot) von *Chlorella sorokiniana* SAG 211-8k während 12-tägiger N/P-Limitierung in DSN-Medium.

Während des Screeningversuchs stieg die optische Dichte der Kultur von 0,5 auf 2,5 an. Der Stärkegehalt stieg bis Tag 9 auf ca. 50% der Biotrockenmasse an, danach blieb er konstant oder sank in einem Kolben auf 42 % ab. Dies zeigt, dass es möglich ist mit *Chlorella sorokiniana* hohe Stärkegehalte zu erreichen und diese bei längerer Kultivierung auch nur in geringem Maße abgebaut wird. Aus diesem Grund wurde *Chlorella sorokiniana* als erste Alge für die Kultivierung im Reaktor ausgewählt.

Auch die anderen Algen wurden auf die gleiche Weise untersucht. Ein wichtiges Kriterium für die 2. Algenart war ein anderer Zellwandaufbau als bei *Chlorella sorokiniana*, da diese sehr schwer aufzuschließen ist. Der während des Screeningversuchs erreichte maximale Stärkegehalt aller getesteten Algen ist in Tabelle 5 gezeigt. *Chlamydomonas reinhardtii* CCAP 11/32A erreichte nach *Chlorella sorokiniana* den zweithöchsten Stärkegehalt. *Chlamydomonas*-Zellen sind wesentlich größer als Zellen von *Chlorella*, und besitzen zudem eine Proteinzellwand, was den Aufschluss vereinfacht, daher wurde *Chlamydomonas reinhardtii* als zweite Alge für die Prozessentwicklung ausgewählt. Eine Besonderheit trat bei *Tetraselmis suecica* auf, hier lag vor dem Start der Limitierung der Stärkegehalt bereits bei über 20 % (w/w). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass nicht ein Nährstoffmangel, sondern ein Unterschied in der Salinität bei dieser Alge die Stärkebildung induziert, dies ist bereits für eine andere *Tetraselmis*-Art beschrieben (Yao et al., 2013).

Tabelle 5: Zusammenfassung des Screenings zur Stärkebildung ausgesuchter Algenstämme.

Bewertung nach Stärkegehalt	Stamm	Stärkegehalt [% (w/w)]	Auswahl oder verworfen?
1	<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-8k	53	1. Alge für die Prozessoptimierung im Labor und im Freiland
2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CCAP 11/32A	37	2. Alge für die Prozessoptimierung im Labor und im Freiland
3	<i>Tetraselmis suecica</i> CCAP 66/4	36	Einzelne Laborversuche im FPA-Reaktor
4	<i>Parachlorella kessleri</i> CCAP 211-11H	22	Verworfen wegen zu geringem Stärkegehalt
5	<i>Scenedesmus vacuolatus</i> SAG 211-8b	15	Verworfen wegen zu geringem Stärkegehalt
5	<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/19.	15	Verworfen wegen zu geringem Stärkegehalt

1.2. Zweistufige Prozessentwicklung für die Produktion stärkereicher Algen

Die ausgewählten Algen wurden zunächst in Schüttelkolben, anschließend in einer 5-Liter Glasflasche so weit vermehrt, dass ausreichend Biomasse für die Inokulation eines 6-Liter Laborreaktors zur Verfügung stand.

Es war notwendig für *Chlorella sorokiniana* und *Chlamydomonas reinhardtii* einen zweistufigen Prozess zu entwickeln, da nur eine Nährstofflimitierung die Stärkebildung induziert und da unter Nährstoffmangel keine ausreichende Biomasseproduktion möglich ist. Somit wurde die Wachstumsphase zur Biomassebildung unter optimaler Nährstoffversorgung getrennt von der Stärkebildung untersucht.

1.2.1 Versuche mit *Chlorella sorokiniana* im 6-Liter Laborreaktor

Wachstumsphase

Die Alge wurde im Laborreaktor bei 30 °C und pH 6,5 in modifiziertem DSN-Medium (Pohl et al., 1987) kultiviert (siehe auch Abschnitt 2.2). Die Laborreaktoren im Fraunhofer IGB sind alle mit LEDs ausgestattet, damit können die Reaktoren mit einer Lichtintensität, die mit der Mittagssonne im Freiland vergleichbar ist, beleuchtet werden. Die Lichtintensität auf der Reaktoroberfläche wurde der Konzentration der Algen im Reaktor angepasst, da die relative Lichtverfügbarkeit ein entscheidender Parameter für alle photoautotrophen

Prozesse ist. Sie beschreibt die Lichtmenge an Photonen, die pro Gramm Biomasse zur Verfügung steht und lässt sich über Gleichung 1 berechnen:

$I_{rel.} = \frac{A * I}{TS * V_R}$	Gleichung 1
I: Photonenflussdichte [$\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	
$I_{rel.}$: relative Lichtverfügbarkeit [$\mu\text{mol Photonen g}_{TS}^{-1} \text{s}^{-1}$]	
TS: Biotrockenmasse [g L^{-1}]	
V_R : Reaktorvolumen [L]	
A: angestrahlte Reaktoroberfläche [m^2]	

Die Temperatur wurde über ein Wasserbad geregelt und alle Kultivierungsparameter wurden von einer SPS-Steuerung von Siemens in regelmäßigen Abständen aufgezeichnet. Zur Versorgung der Kultur mit Ammonium wurde ein virtueller Ammoniumsensor verwendet, der über den CO_2 -Gehalt in der Zuluft, der benötigt wird um den pH-Wert zu regeln, auf die Ammoniumkonzentration in der Kultur rückschließen lässt. Wird der Sollwert unterschritten, wird eine automatische Fütterung mit Ammonium ausgelöst. Dazu befinden sich Flaschen mit den Lösungen, die gefüttert werden sollen, auf einer Waage und sind über ein Schlauchsystem mit dem Reaktor verbunden (Abbildung 2). Die Fütterung von Phosphat findet immer gleichzeitig mit einer Ammoniumfütterung statt, wobei die Menge berechnet wird, da bekannt ist, wieviel mg Phosphat pro mg Ammonium benötigt wird. Ein Fließbild des Reaktors mit der Steuerung ist in Teil IA (Kapitel I2.2.) dargestellt.



Abbildung 2: Kultivierungsstand für die Wachstumsphase von *Chlorella sorokiniana*. 1: 6-Liter FPA-Reaktor, 2: SPS-Steuerung, 3: Waage mit Fütterungslösungen, 4: Wasserbad für die Kühlung/Beheizung des Reaktors.

Mit diesem Versuchsaufbau konnte eine maximale Biomasseproduktivität von $2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und eine maximale Biomassekonzentration von 17 g/L erreicht werden. Es gelang, die Alge über mehrere Monate hinweg stabil mit einer Biomassekonzentration zwischen $1,5$ und 11 g/L im repeated fed-batch Verfahren zu kultivieren (Abbildung 3). Die Produktivität war dabei in starkem Maße von der relativen Lichtverfügbarkeit der Algen abhängig, so steigt bei steigender relativer Lichtverfügbarkeit auch die Produktivität der Kultur. Bei einer konstanten relativen Lichtverfügbarkeit wurde auch eine konstante Produktivität (unabhängig von der Biotrockenmassekonzentration) erreicht.

Die Biomasse aus der Wachstumsphase wurde als Startkultur für die Optimierung der Stärkeproduktion verwendet.

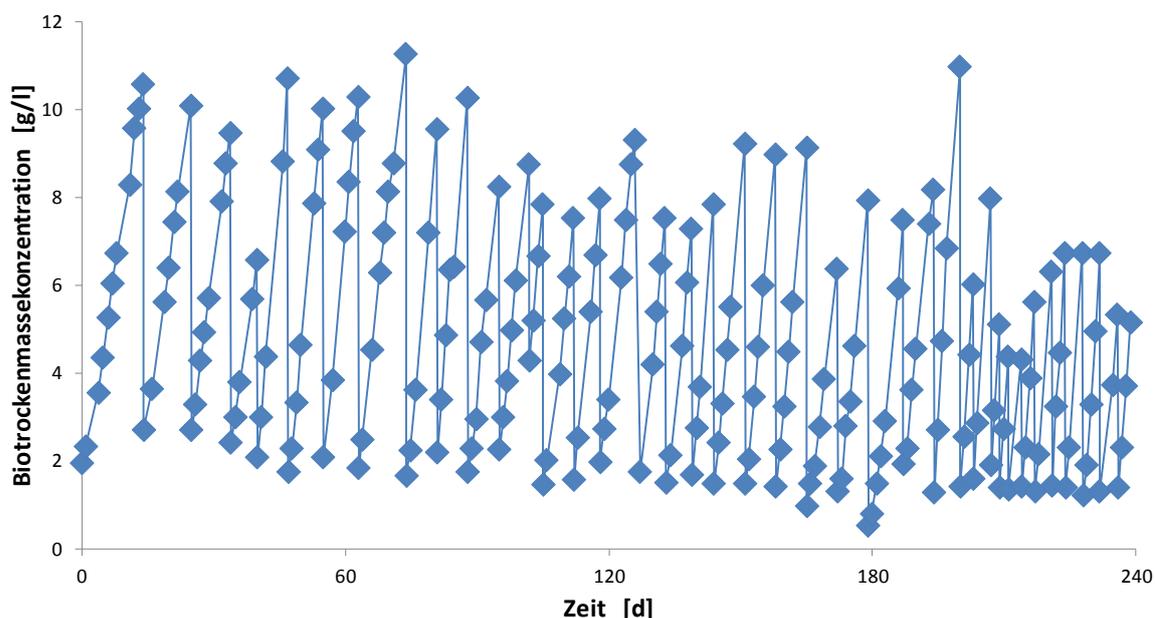


Abbildung 3: Repeated fed-batch-Kultivierung von *Chlorella sorokiniana* im 6-l FPA-Reaktor im Labor. Temperatur: $30 \text{ }^\circ\text{C}$, pH-Wert 6,5, rel. Lichtintensität $3\text{-}15 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Stärkephase

Zur Induktion der Stärkeproduktion muss eine Nährstofflimitierung z.B. von Stickstoff oder Phosphor vorliegen (siehe Kapitel 1.1). Deshalb wurde in Laborversuchen getestet, ob die Limitierung nur eines der Nährstoffe (N limitiert, P vorhanden bzw. umgekehrt) Vorteile gegenüber der Limitierung beider Nährstoffe birgt.

Beispielhaft sind die Verläufe der Biomasse- und Stärkegehalte unter N/P-Limitierung und unter N-Limitierung bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und $6 \text{ } \mu\text{mol Photonen g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in Abbildung 4 gezeigt. Die Ergebnisse zeigten, dass es optimal ist nur Stickstoff in der Algenkultur zu limitieren und ausreichend Phosphor zuzugeben. Dies wirkte sich im Vergleich zur kombinierten N- und P-Limitierung positiv auf die Prozessstabilität aus. Bei der N/P-Limitierung trat in einer Kultur des Doppelansatzes so starke Schaumbildung auf, dass Kultur aus dem Reaktor ausschäumte, sodass die Biotrockenmasse sogar unter die Startkonzentration fiel. Bei ausreichender Phosphatversorgung konnte eine wesentlich geringere Schaumbildung

beobachtet werden, zudem war die Produktivität in diesem Ansatz höher und die maximale Stärkemenge wurde bereits nach 2 Tagen erreicht.

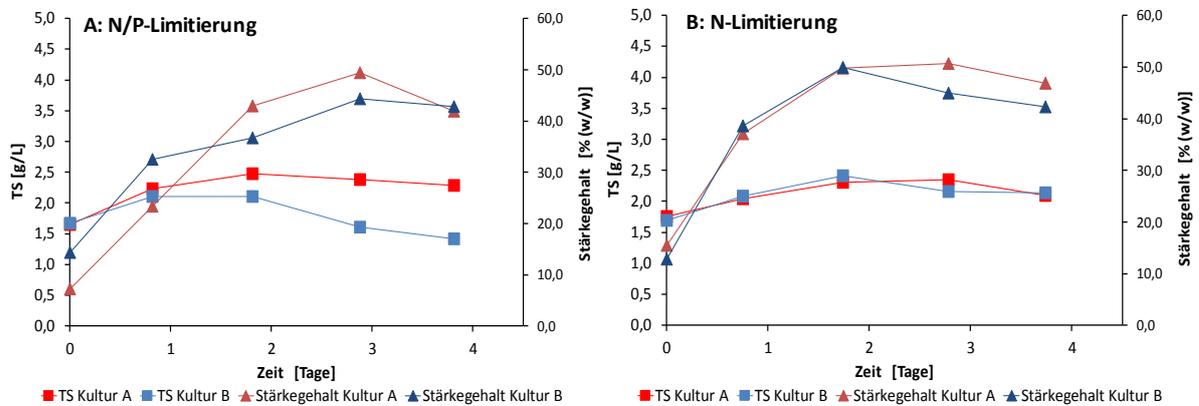


Abbildung 4: Stärkebildung unter N/P-Limitierung (A) und N-Limitierung (B), jeweils bei 30 °C und 6 $\mu\text{mol Photonen g}^{-1} \text{s}^{-1}$, gezeigt sind die Biotrockenmasse (Quadrate) und der Stärkegehalt (Dreiecke) der einzelnen Kulturen des Doppelansatzes (rot bzw. blau).

Zur Vorbereitung auf die Freilandversuche wurden der Einfluss sowohl der Lichtintensität als auch der Temperatur auf die Stärkebildung untersucht. Die Versuche wurden immer im Doppelansatz mit zwei FPA-Reaktoren, die zeitgleich beimpft wurden, durchgeführt. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Tabelle 6: Ergebnisse der Laborexperimente mit *Chlorella sorokiniana* SAG 211/8k. Zur besseren Übersicht sind die variierten Parameter in grün und die besten Ergebnisse in rot dargestellt.

Variierter Parameter	Limitierungen			Temperaturen		Rel. Lichtverfügbarkeit	
	N/P	N	P	N	N	N	N
Limitierter Nährstoff	N/P	N	P	N	N	N	N
Temperatur [°C]	30	30	30	20	38	30	30
rel. Lichtverfügbarkeit [$\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{s}^{-1}$]	6	6	6	6	6	4	8
Maximaler Stärkegehalt [% (w/w)]	49	51	36	47	38	42	46
Maximale Stärkeproduktivität [$\text{mg}_{\text{Stärke}} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{d}^{-1}$]	222	352	74	125	203	162	256
Maximale Stärkekonzentration [g/L]	1,2	1,2	0,4	1,2	1,3	0,7	0,8
Maximale volumetrische Stärkeproduktivität [$\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$]	0,54	0,51	0,05	0,48	0,57	0,36	0,26

Die weiteren Experimente (Tabelle 6) zeigten, dass *Chlorella sorokiniana* unter Stickstofflimitierung bei 30 °C und einer relativen Lichtverfügbarkeit von 6 $\mu\text{mol Photonen g}^{-1} \text{s}^{-1}$ die höchste Stärkeproduktivität zeigt. Die Alge ist jedoch in der Lage in einem weiten Temperaturbereich und bei unterschiedlich hohen relativen Lichtverfügbarkeiten über 40 % (w/w) Stärke einzulagern, was eine gute Voraussetzung für die Kultivierung unter den wechselnden Licht- und Temperaturverhältnissen im Freiland ist.

1.2.2 Freilandversuche mit *Chlorella sorokiniana*

Wachstumsphase

Chlorella sorokiniana wurde von Mai bis Oktober 2014 in fünf 28-Liter FPA-Reaktoren auf einer Plattform auf dem Dach des Fraunhofer IGB in Stuttgart kultiviert (Abbildung 5). Drei Reaktoren dienen der Stärkeproduktion, in zwei Reaktoren fand die Biomasseproduktion statt. Die Reaktoren waren in einer Reihe aufgebaut und zeigten mit der breiten Seite in Nord-/Südrichtung. Gegenseitige Beschattung fand nicht statt. Der pH-Wert wurde über den CO_2 -Gehalt in der Zuluft auf 6,5 geregelt, über eine Sprühkühlung wurde die Temperatur unter 35 °C gehalten. Die Lichtmessung erfolgte vertikal (parallel zu den Reaktoren) mit zwei PAR-Sensoren, von denen einer nach Norden und einer nach Süden ausgerichtet war. So wurde die Lichtintensität auf beiden Reaktorflächen ermittelt und für die Berechnung der relativen Lichtverfügbarkeit täglich aufsummiert. Die aufgezeichneten Lichtwerte wurden zu stündlichen Mittelwerten zusammengefasst, aus denen über das Integral der Stundenmittelwerte eine Tagessumme pro Reaktor ermittelt wurde. Während der Wachstumsphase, die der Biomassebildung dient, wurden die Algen optimal mit Nährstoffen versorgt. Die Daten wurden wie bei den Laborreaktoren (vgl. 1.2.1) aufgezeichnet, die Fütterung des Wachstumsreaktors fand ebenfalls über eine Waage mit den Lösungen und ein Schlauchsystem statt. Die Stärkebildungsreaktoren wurden über eine Spritze mit einem Sterilfilter über das Probenahmeseptum einmalig mit Phosphat (50 mg/L) versorgt.



Abbildung 5: Stärkeproduktionsreaktoren der Freilandanlage zur Algenkultivierung im Fraunhofer IGB

In den ersten 29 Tagen der Wachstumskultur wurde die optische Dichte der Kultur bei 750 nm gemessen und in die Biotrockenmasse umgerechnet, wobei der Faktor stichprobenartig überprüft wurde. Ab Mitte Juni (nach der ersten Verdünnung) wurde die Biotrockenmassekonzentration direkt über Filtration und Trocknung bestimmt. An den markier-

ten Zeitpunkten wurde Biomasse entnommen, um die zweite Stufe, in der die Algen zur Induktion der Stärkebildung stickstofflimitiert wurden, zu starten (Abbildung 6).

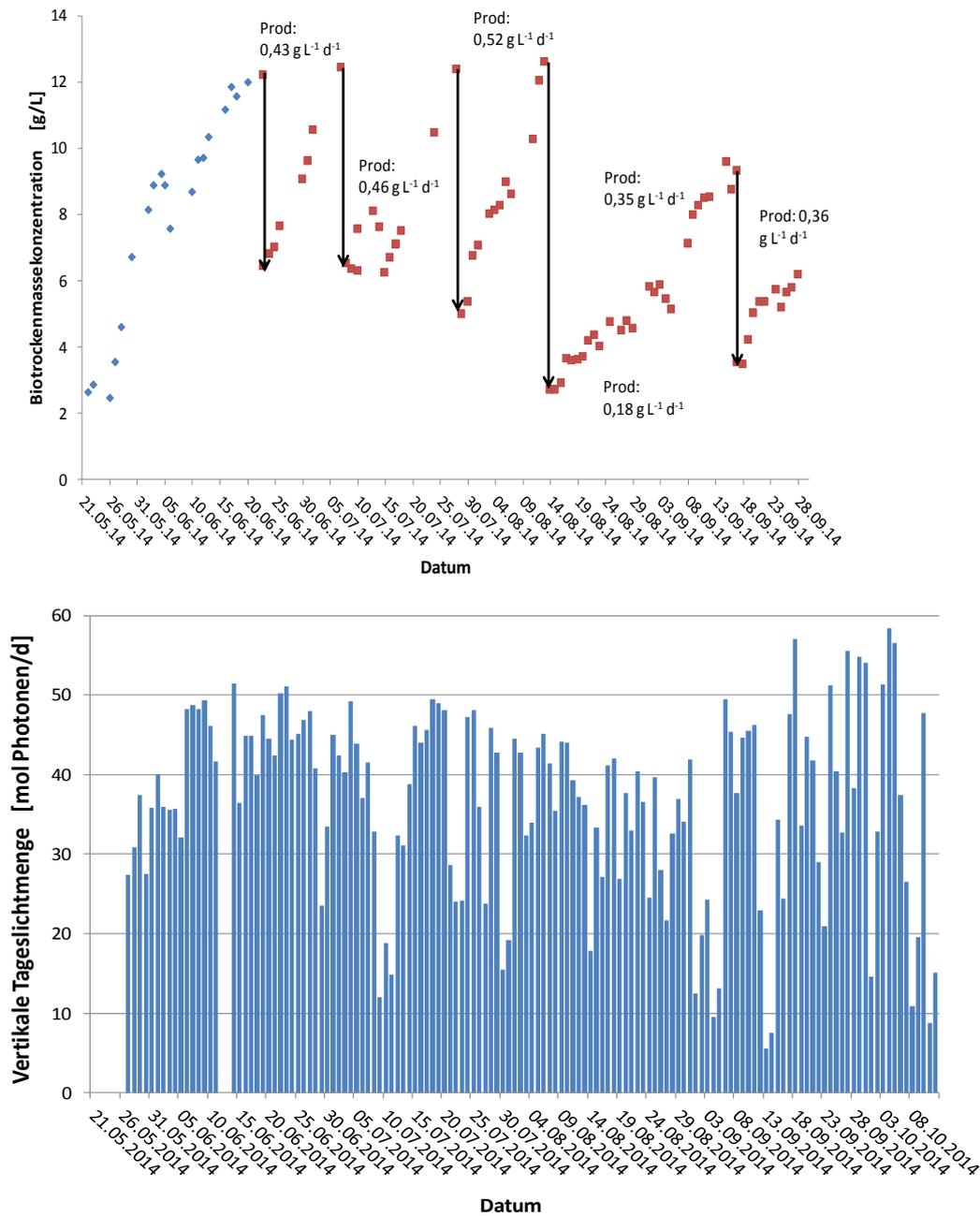


Abbildung 6: **A:** Wachstum von im 28-Liter-Freilandreaktor zur Erzeugung von Algenbiomasse für die Stärkeproduktion, Versuchsdauer: 27.5.-1.10.14. Bis Tag 29 sind die aus der optischen Dichte berechneten Trockenmassekonzentrationen dargestellt, danach die über Filtration bestimmten Werte. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte an, zu denen Kultur aus dem Reaktor entnommen wurde, um Limitierungsversuche zu starten. Zusätzlich ist die Produktivität der Wachstumsphasen zwischen den Erntezyklen angegeben. **B:** Integrierte vertikale Tageslichtmenge, die pro Tag auf den Reaktor getroffen ist. Teilweise traten technische Probleme mit der Datenaufzeichnung auf, weshalb von wenigen Tagen keine Daten vorhanden sind.

Im Sommer 2014 herrschte recht wechselhaftes Wetter. Sonnige Tage mit hoher Lichtmenge wechselten sich mit regnerischen Tagen mit niedriger Lichtmenge ab. In Tabelle 7 sind dabei einige Kennzahlen der Lichtintensität des Sommers 2014 dargestellt.

Tabelle 7: Kennzahlen der vertikalen Lichtmenge im Sommer 2014 (Mai bis Oktober)

Kennzahl	Lichtmenge [mol Photonen d ⁻¹]
Minimum	5,5
Maximum	58,4
Median	38,6
Mittelwert	36,4
Standardabweichung	12,1

Trotz der schwankenden klimatischen Bedingungen im Freiland konnte eine Kultivierung über 128 Tage durchgeführt werden. Die höchsten Biomasseproduktivitäten wurden dabei zwischen Mitte Juni und Anfang August erreicht, wobei die Zyklusproduktivität über drei Zyklen, trotz der schwankenden Lichtverhältnisse, zwischen 0,43 und 0,52 g L⁻¹ d⁻¹ lag. Bis zu einer Biomassekonzentration von 12 g/L fand lineares Wachstum statt. Die Produktivität war mit etwa 0,5 g L⁻¹ d⁻¹ während des Hochsommers niedriger als im Labor. Zwischen Mitte August und Anfang September traten Probleme mit dem Medium auf, was die schlechte Produktivität in diesem Zeitraum erklärt. Nachdem diese Probleme behoben waren steigerte sich die Produktivität nochmals auf 0,35 g L⁻¹ d⁻¹, konnte aber, vermutlich auch wegen der kürzeren Photoperiode im September, die Werte des Hochsommers nicht mehr erreichen. Leider waren die Strahlungswerte im Sommer 2014 mit im Mittel 36,4 mol Photonen/d sehr niedrig. Bei den Kultivierungen auf der Pilotanlage im Jahr 2015 (Kapitel 7.2.1) zeigte sich, dass *Chlorella sorokiniana* bei entsprechenden Lichtbedingungen im FPA-Reaktor in der Lage ist eine Produktivität von 1,6 g L⁻¹ d⁻¹ zu erreichen.

Die erste Prozessstufe zur Produktion von Biomasse konnte erfolgreich auf Freilandbedingungen übertragen werden. Über 128 Tage wurde ein stabiler Prozess realisiert, wobei eine maximale Produktivität von 0,52 g L⁻¹ d⁻¹ erreicht werden konnte. Die maximale Biomassekonzentration lag bei über 12 g/L, wobei auch bei dieser Konzentration keine Verlangsamung des Wachstums festgestellt werden konnte. Die in der Wachstumsphase gewonnene Biomasse wurde für die Stärkeproduktion eingesetzt.

Stärkephase

Die Ergebnisse der Optimierung der Stärkeproduktion im Labor unter konstanten Licht- und Temperaturbedingungen (Tabelle 6) dienten als Grundlage für den Betrieb im Freiland. So wurde den Algen in der Limitierungsphase grundsätzlich ausreichend Phosphat zur Verfügung gestellt und die Sprühkühlung wurde auf 35 °C eingestellt, um den weiten Temperaturbereich der Algen möglichst auszunutzen.

Da die relative Lichtverfügbarkeit im Freiland nur über die Biomassekonzentration im Reaktor einstellbar ist (Gleichung 1), wurden für die Experimente mehrere FPA-Reaktoren zeitgleich mit verschiedenen Startkonzentrationen inokuliert. So stand ihnen die gleiche absolute Lichtmenge zur Verfügung, durch die Biomassekonzentration wurden jedoch unterschiedliche relative Lichtverfügbarkeiten eingestellt. Es wurden Biomassestartkonzentrationen zwischen 1,2 g/L und 6,6 g/L gewählt um einen breiten Bereich von relativen Lichtverfügbarkeiten abzudecken. So erhält bei einer Strahlung von 35 mol Photonen pro Tag ein Reaktor mit 3 g/L BTM eine relative Lichtverfügbarkeit von $5,8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$, ein Reaktor mit 1,5 g/L das Doppelte und ein Reaktor mit 6 g/L die Hälfte.

Im ersten Versuch zwischen dem 7.7. und dem 18.7.2014 (Abbildung 7) wurde analysiert, ob ein Abbau der Stärke während der Nacht stattfand, was aufgrund des Erhaltungsstoffwechsels der Zellen zu erwarten wäre. Es konnte jedoch keine klare Tendenz zur Abnahme des Stärkegehalts während der Nacht ermittelt werden.

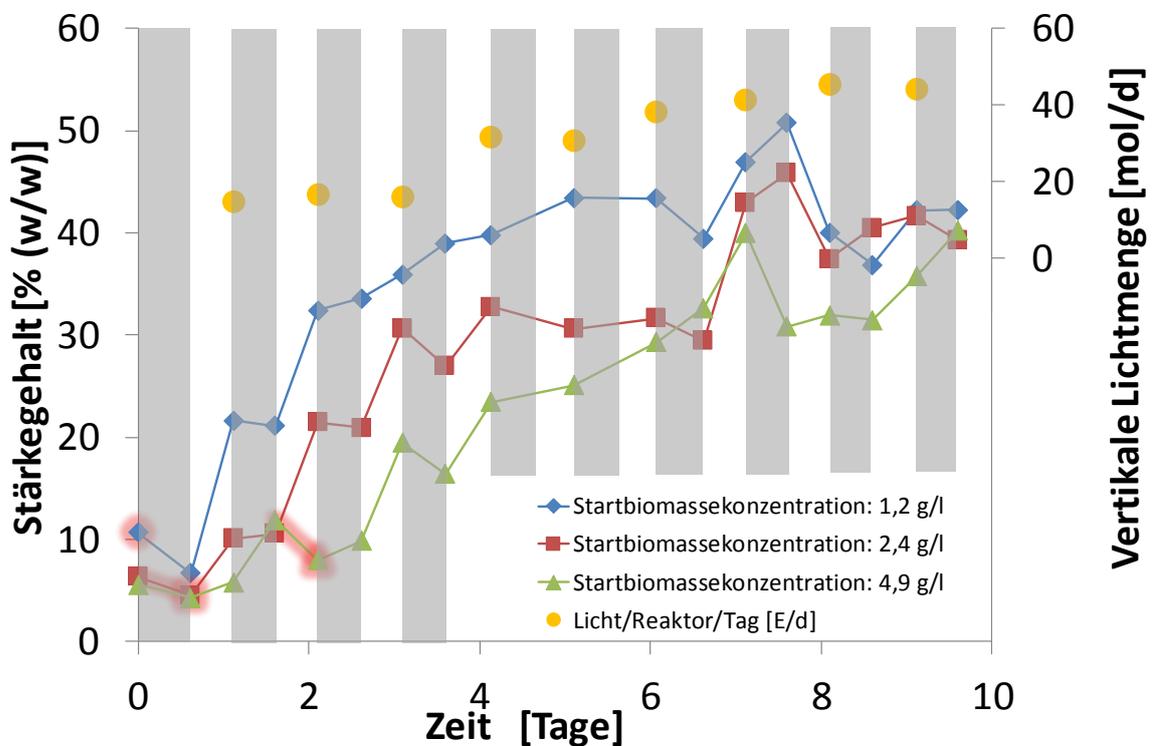


Abbildung 7: N-Limitierung von *C. sorokiniana* zur Stärkebildung zwischen dem 7.7. und dem 18.7.2014. Der Zeitpunkt, an dem das Ammonium in den Reaktoren verbraucht war, wodurch die Limitierung einsetzte, ist durch die rote Hinterlegung gekennzeichnet. Die Nachtphasen sind grau schattiert dargestellt, die Lichtmenge, die der Reaktor über den Tag erhalten hat, als gelbe Punkte.

Trotz der geringen Lichtmenge, die in den ersten drei Tagen zur Verfügung stand, stieg der Stärkegehalt in der Biotrockenmasse ab dem Zeitpunkt, an dem die Algen N-limitiert waren, sprunghaft an. Nach etwa zwei Tagen schwächte sich der Anstieg etwas ab, bis an Tag 7 nochmals ein steiler Anstieg stattfand. Nach etwa einer Woche wurden dann die maximalen Stärkegehalte erreicht, die bei 40 - 50 % (w/w) liegen. Danach sank der Stär-

kegehalt der Kulturen wieder etwas ab. In den Nachtphasen war in der Regel kein Stärkeverlust zu beobachten.

Die gesamten Ergebnisse der Freilandversuche zur Stärkebildung sind in Tabelle 8 zusammengefasst dargestellt. Der maximale Stärkegehalt wurde definiert, als der Stärkegehalt bei dem zum ersten Mal 90 % des höchsten Wertes erreicht wurden, um eventuelle Messungenauigkeiten auszugleichen.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Stärkeproduktion mit *Chlorella sorokiniana* im Freiland. Zur besseren Übersicht sind die besten Ergebnisse in rot dargestellt.

Limitierungszeitraum	Reaktor	Ammoniumzugabe bei Versuchsstart [mg/L]	Biomassekonzentration bei Versuchsstart [g/L]	TS-Zunahme bis zum Erreichen des 90% Stärkegehalts [g/L]	90% des maximalen Stärkegehalts [% (w/w)]	Zeit bis zum Erreichen des 90% Stärkewertes [d]	Stärkekonzentration [g/L]
7.7.-18.7.	D3	0	1,2	1,3	47,0	7,0	1,2
	D4	0	2,4	2,4	45,8	7,5	2,2
	D5	0	4,9	3,5	40,0	7,0	3,4
28.7.-8.8.	D3	0	1,4	1,2	45,1	4,0	1,2
	D4	0	3,7	2,1	33,9	4,0	2,0
	D5	0	5,4	4,0	33,7	8,0	3,2
13.8.-25.8.	D3	0	1,8	2,6	31,3	7,0	1,4
	D4	0	3,5	3,2	31,3	8,0	2,1
	D5	0	6,6	2,6	23,4	7,0	2,2
17.9.-28.9.	D3	0	2,4	1,5	31,7	4,0	1,2
	D4	50	2,4	1,6	35,2	7,0	1,4
	D5	0	4,3	0,2	31,2	6,0	1,4
1.10.-12.10.	D3	0	2,7	1,2	34,1	3,0	1,3
	D4	50	2,7	1,9	31,3	7,0	1,5
	D5	100	2,6	2,5	33,6	5,0	1,7

Es zeigte sich, dass mit niedrigen Biomassekonzentrationen und während des Sommers (Reaktor D3/D4 ab 7.7. bzw. D3 ab 28.7.) höhere Stärkegehalte erreichbar sind. Bis zu einer Biomassekonzentration von 5,4 g/L wurden Stärkegehalte von über 30 % (w/w) erreicht, wobei eine höhere Biomassekonzentration zu einer höheren volumetrischen Stärkekonzentration führte. Hier konnten über 3 g Stärke pro Liter mit Biomassestartkonzentrationen von 4,9 und 5,4 g/L erreicht werden. Erst bei einer Biomassekonzentration von 6,6 g/L konnten die 30 % (w/w) Stärkegehalt nicht mehr erreicht werden.

Schlussfolgerung aus der gesamten Versuchsreihe:

- Um möglichst viel Stärke zu produzieren sollten die Reaktoren mit maximal 5 g/L Biotrockenmasse inokuliert werden.
- Falls das Ziel ist möglichst hohe Stärkegehalte in den Zellen zu erreichen, sollte eher eine geringe Biotrockenmassekonzentration gewählt werden.

- Bei den Limitierungen die in den Sommermonaten durchgeführt wurden lagen die Stärkegehalte höher, als bei den Limitierungen die im Herbst durchgeführt wurden, was vermutlich an den unterschiedlichen Lichtbedingungen (Photoperioden) liegt.
- Die Ergebnisse wurden durch die eher schlechten Witterungsverhältnisse vermutlich negativ beeinflusst, unter besseren Strahlungsbedingungen könnten vor allem bei den hohen Biotrockenmassekonzentrationen noch höhere Stärkegehalte zu erwarten sein.

Die Biomasse aus den Reaktoren wurde jeweils Südzucker zur Verfügung gestellt.

1.2.3 Versuche mit *Chlamydomonas reinhardtii* im 6-Liter Laborreaktor

Wachstumsphase

Als zweite Alge wurde *Chlamydomonas reinhardtii* ausgewählt. Die Alge wurde im 6-Liter Laborreaktor bei 25 °C und pH 7,0 in OHM-Medium (modifiziert nach Fabregas et al. 2000) mit erhöhter CaCl₂-Konzentration kultiviert. Die Lichtintensität auf der Reaktoroberfläche wurde der Konzentration der Algen im Reaktor angepasst und lag bei 4 μmol g⁻¹ s⁻¹. So konnten eine maximale Biomasseproduktivität von 1,5 g L⁻¹ d⁻¹ und eine maximale Biomassekonzentration von 12 g/L erreicht werden. Es gelang, die Alge über mehr als 2 Monate mit einer Biomassekonzentration zwischen 1 und 12 g/L in repeated fed-batch-Versuchen stabil zu kultivieren (Abbildung 8).

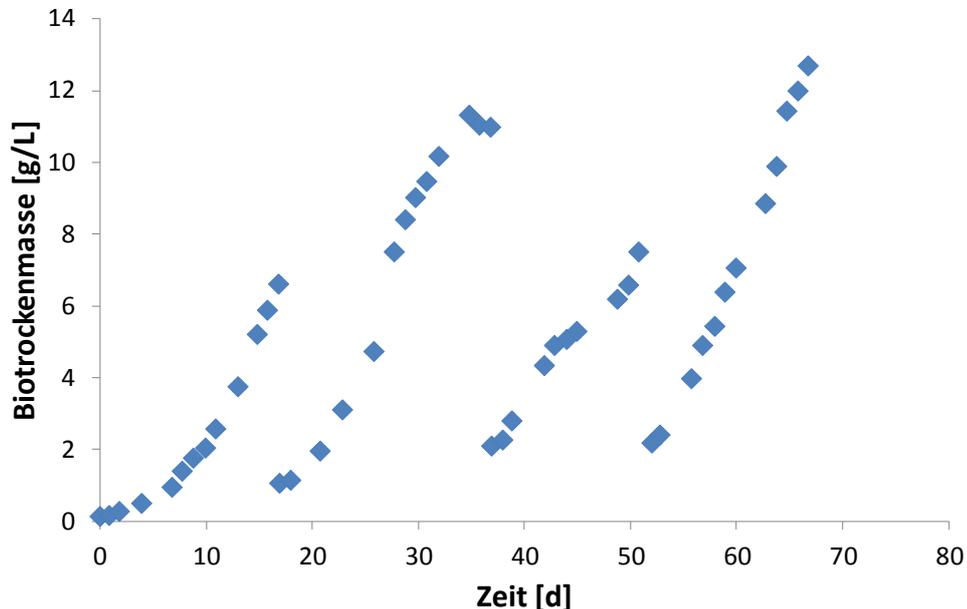


Abbildung 8: Repeated fed-batch-Kultivierung im Labor von *Chlamydomonas reinhardtii* zur Biomassebildung im 6-L FPA-Reaktor. Temperatur: 25 °C; pH-Wert 7,0; rel. Lichtintensität 4 μmol g⁻¹ s⁻¹

Stärkephase

Auch bei *Chlamydomonas reinhardtii* wurden verschiedene Limitierungen (N, P, N/P) durchgeführt, um die Stärkebildung im FPA-Reaktor zu testen und im Freiland mit der optimalen Limitierung zu starten. Die Temperatur wurde konstant bei 25 °C gehalten und die relative Lichtverfügbarkeit wurde analog zu den ersten Versuchen mit *Chlorella sorokiniana* auf $6 \mu\text{E g}^{-1} \text{s}^{-1}$ eingestellt, die Biomassestartkonzentration lag bei rund 2 g/L. Durch die unerwartet starke Zunahme der Biotrockenmassekonzentration (Tabelle 9) wurde die maximal einstellbare Lichtmenge bei der P-Limitierung an Tag 7 und bei der N-Limitierung an Tag 8 erreicht, weshalb dort dann nur noch geringere relative Lichtverfügbarkeiten einstellbar waren.

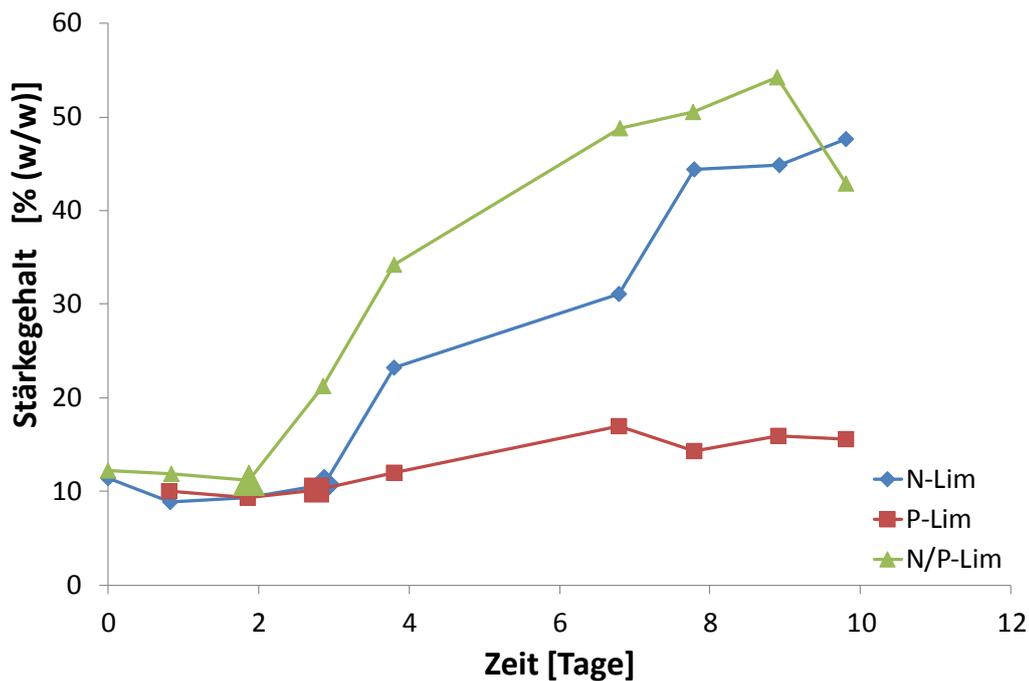


Abbildung 9: Stärkebildung von *Chlamydomonas reinhardtii* im 6-Liter Laborreaktor, unter Limitierung von N oder P bzw N+P. Temperatur: 25 °C; pH-Wert 7,0; rel. Lichtintensität $6 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$

Tabelle 9: Ergebnisse der Laborexperimente mit *Chlamydomonas reinhardtii*. Zur besseren Übersicht sind die besten Ergebnisse in rot dargestellt.

Limitierungsart	TS-Zunahme bis zum Erreichen des Stärkemaximums [g/L]	maximaler Stärkegehalt [% (w/w)]	Stärkekonzentration [g/L]	Zeit bis zum Erreichen des Stärkemaximums (ab Limitierungsbeginn) [d]
N/P	5,8	54	4,1	7
N	4,6	48	3,1	7
P	4,5	16	1	4

Eine nennenswerte Stärkeakkumulation wurde in der phosphatlimitierten Kultur nicht festgestellt. Die maximale relative Produktivität wurde an Tag 4 bei der N/P-Limitierung mit

138 mg Stärke $\text{g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ermittelt, diese liegt deutlich niedriger als bei *C. sorokiniana* (vgl. Tabelle 6). Die absolute Produktivität lag dagegen bei fast $1 \text{ g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ an Tag 8 während der N-Limitierung und somit fast doppelt so hoch liegt wie bei *C. sorokiniana*. Dieser Unterschied ist vor allem auf die hohe Biomassezunahme von *C. reinhardtii* während der Limitierung zurückzuführen, die zu einer höheren Stärkekonzentration im Reaktor führt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit *Chlamydomonas reinhardtii* ähnliche Stärkegehalte (~50 % (w/w)) wie mit *Chlorella sorokiniana* erzielt wurden, die Stärkekonzentration im Reaktorvolumen lag jedoch bei *C. reinhardtii* sehr viel höher. Aufgrund der begrenzten Zeit wurden jedoch keine weiteren Versuche zur Stärkebildung von *C. reinhardtii* unter unterschiedlichen Temperatur- und Lichtbedingungen durchgeführt, da diese im Freiland ohnehin kaum kontrollierbar sind. Außerdem kann der natürliche Tag/Nacht Rhythmus zu anderem Verhalten der Kultur führen als 24-stündige Dauerbeleuchtung im Labor. Daher wurde die Limitierung von N und P, bei der der höchste Stärkegehalt erreicht wurde, für die Induktion der Stärkebildung im Freiland gewählt.

1.2.4 Freilandversuche mit *Chlamydomonas reinhardtii*

Auch für *Chlamydomonas reinhardtii* wurde der zweistufige Prozess bestehend aus Wachstums- und Stärkebildungsphase auf Freilandbedingungen übertragen. Die Anlage war die gleiche wie für die Kultivierung von *C. sorokiniana* (vgl. 1.2.2). Die Steuerung wurde erweitert, sodass die Messung und Aufzeichnung der Lichtintensität minütlich erfolgte und auch die Außentemperatur aufgezeichnet wurde.

Ziel des Versuchs war es den Prozess auch unter den wechselnden Licht- und Temperaturverhältnissen im Freiland zu etablieren. *Chlamydomonas reinhardtii* ist zwar eine Mikroalge, die oft als Modellorganismus auch für gentechnische Versuche verwendet wird, jedoch sind keine Kultivierungen unter photoautotrophen Bedingungen im Freiland bekannt. Allenfalls sind mixotrophe Kultivierungen bekannt, bei denen z.B. Acetat als zusätzliche Kohlenstoffquelle genutzt wird (Geier et al., 2012).

Wachstumsphase

Chlamydomonas reinhardtii wurde ab Mai 2015 in der Algenanlage auf dem Dach des Fraunhofer IGB kultiviert. Als Medium während der Wachstumsphase wurde, wie unter Laborbedingungen, OHM-Medium mit gesteigerter CaCl_2 -Konzentration eingesetzt und die Kultur wurde mit allen Nährstoffen ausreichend versorgt. Die Temperaturkontrolle wurde auf $30 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt.

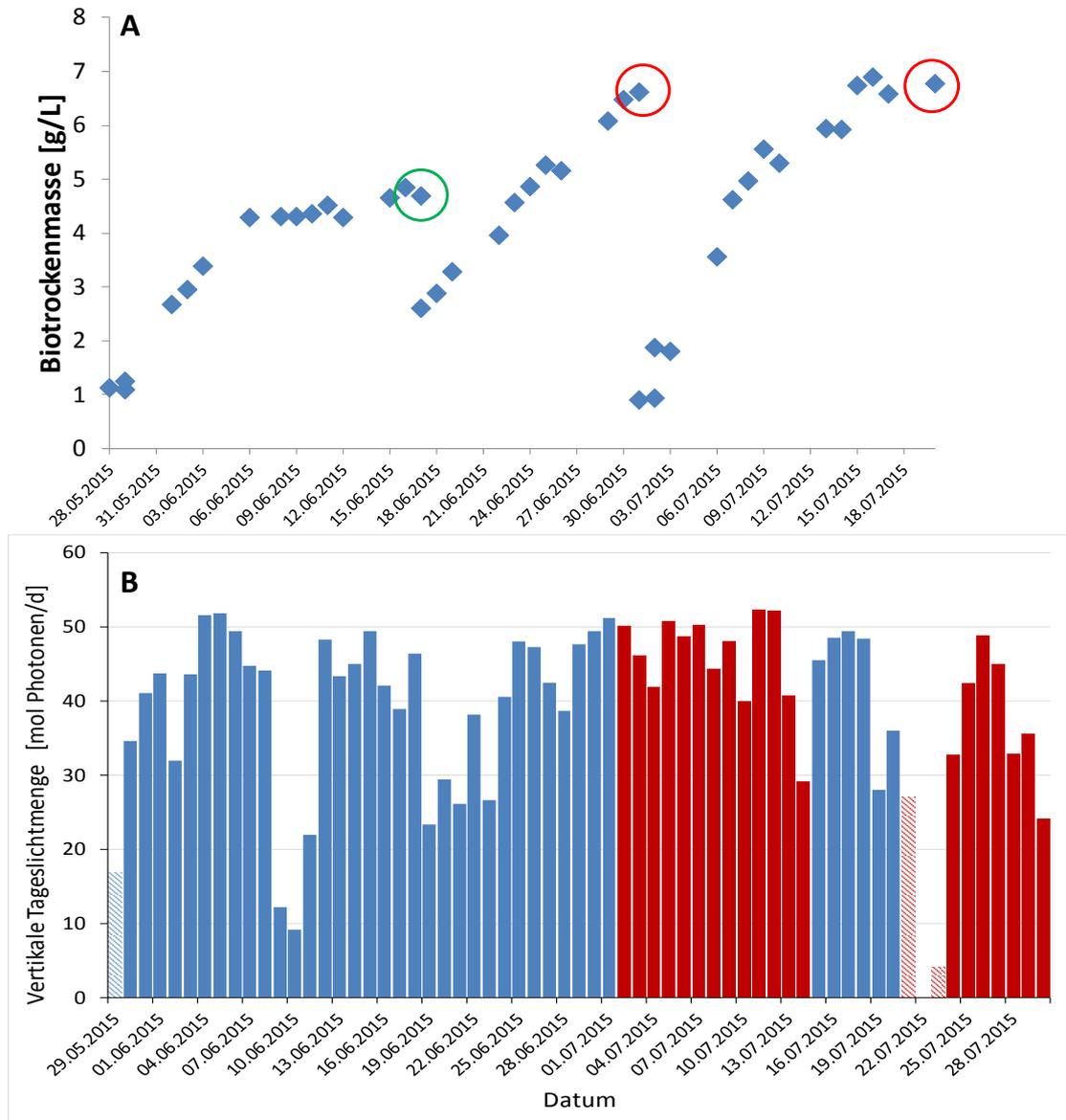


Abbildung 10: **A:** Freilandkultivierung von *Chlamydomonas reinhardtii* zur Biomasseproduktion im 28-l FPA-Reaktor. Der grüne Kreis zeigt an, zu welchem Zeitpunkt die Kultur verdünnt wurde, mit roten Kreisen sind die Biomasseentnahmen zur Verdünnung und Inokulation einer Stärkebildungsphase markiert. **B:** Integrierte vertikale Tageslichtmenge, die pro Tag auf den Reaktor getroffen ist. Teilweise traten technische Probleme mit der Datenaufzeichnung auf, an diesen Tagen wurde die Lichtmenge nicht vollständig aufgezeichnet (schraffierte Balken). Die Daten während der Limitierungsversuche sind in rot dargestellt.

Im Sommer 2015 herrschte überwiegend gutes Wetter. Die Wetterbedingungen waren insbesondere ab Mitte Juni nicht so schwankend wie 2014. In Tabelle 10 sind dabei einige Kennzahlen der Lichtintensität des Sommers 2015 dargestellt.

Tabelle 10: Kennzahlen der vertikalen Lichtmenge im Sommer 2015 (Mai bis Juli)

Kennzahl	Lichtmenge [mol Photonen d ⁻¹]
Minimum	9,2
Maximum	52,3
Median	43,7
Mittelwert	40,9
Standardabweichung	10,0

Mittelwert und Median liegen 12 bzw. 13 % höher als 2014 und die Standardabweichung ist geringer, was auf weniger Schwankungen der täglichen Lichtmenge schließen lässt. Der Sommer 2015 war insgesamt sehr sonnig und kaum bewölkt, was zu sehr hohen Lichtmengen führte. Es ist jedoch zu beachten, dass hier die Daten nur von Mai bis Juli ermittelt wurden, während die Kultivierung 2014 von Mai bis Oktober stattfand. Im Herbst werden auf Grund des flacheren Sonnenstandes oft höhere Maximalwerte erreicht, zudem führt die kurze Photoperiode an wolkigen Tagen zu sehr geringen Lichtmengen, was zu extremeren Lichtmengen (sehr hoch und sehr niedrig) führt.

Nach einer kurzen lag-Phase zu Beginn der Kultivierung stellte sich ein konstantes Wachstum mit einer Produktivität von 0,4 g L⁻¹ d⁻¹ ein. Aufgrund einer zu hohen Fütterung mit Ammonium in Verbindung mit niedrigem Verbrauch durch schlechtes Wachstum wurde zwischen dem 6. und 8.6. eine Ammoniumkonzentration von 300 mg/L überschritten, was zu einer Hemmung des Wachstums führte. Nur durch eine Verdünnung der Kultur Mitte Juni und die daraus resultierende niedrigere Ammoniumkonzentration konnte die Kultivierung fortgeführt werden. Es wurde wieder eine Produktivität von 0,4 g L⁻¹ d⁻¹ erreicht. Diese konnte auch nach der Verdünnung aufrechterhalten werden, ab einer Biomassekonzentration von 6 g/L (Tag 48) nahm die Produktivität jedoch stark ab, was an der schlechten Lichtversorgung in dichten Kulturen liegen kann.

Insgesamt lässt sich zur Freilandkultivierung von *Chlamydomonas reinhardtii* folgendes sagen:

- Eine zufriedenstellende Produktivität von 0,4 g L⁻¹ d⁻¹ wurde erreicht, die in der gleichen Größenordnung liegt wie bei *Chlorella sorokiniana* (0,4-0,5 g L⁻¹ d⁻¹).
- Jedoch ist *Chlamydomonas reinhardtii* sensibler gegenüber erhöhten Ammoniummengen in der Kultur, weshalb hier eine engmaschige Analyse der Nährstoffe notwendig ist.

Zu den in Abbildung 10 angegebenen Zeitpunkten wurde die *Chlamydomonas*-Biomasse für die Stärkeproduktionsphase eingesetzt.

Stärkephase

Für die Stärkephase wurden wieder drei Reaktoren zeitgleich mit unterschiedlichen Biomassekonzentrationen beimpft, wodurch sich eine unterschiedliche Lichtmenge pro Algenzelle in den Reaktoren ergab. Die Biomassekonzentrationen wurden analog zu den Versuchen mit *Chlorella sorokiniana* im Vorjahr zwischen 1,4 und 5,7 g/L gewählt. Das Medium für *Chlamydomonas reinhardtii* war das gleiche wie in der Wachstumsphase, jedoch wurde die Fütterung mit Ammonium und Phosphat eingestellt. Die Limitierung erfolgte für 12 Tage vom 1.7.-13.7.15 und aufgrund der vorherigen Ergebnisse und der nötigen Aufarbeitungszeit bei Südzucker im zweiten Versuch für 9 Tage vom 20.7.-29.7.15. Wegen eines Defekts eines Reaktors konnte der Inhalt des Reaktors mit der höchsten Biomassekonzentration in der ersten Versuchsreihe nicht gerettet werden. Auch im 2. Versuch trat eine Undichtigkeit eines der Reaktoren auf, wodurch ein Teil der Kultur verloren ging, hier konnte die Limitierung jedoch nach dem Abdichten des Reaktors und dem Auffüllen mit Medium fortgesetzt werden.

Die Ergebnisse des ersten Versuchs sind in Abbildung 11 gezeigt.

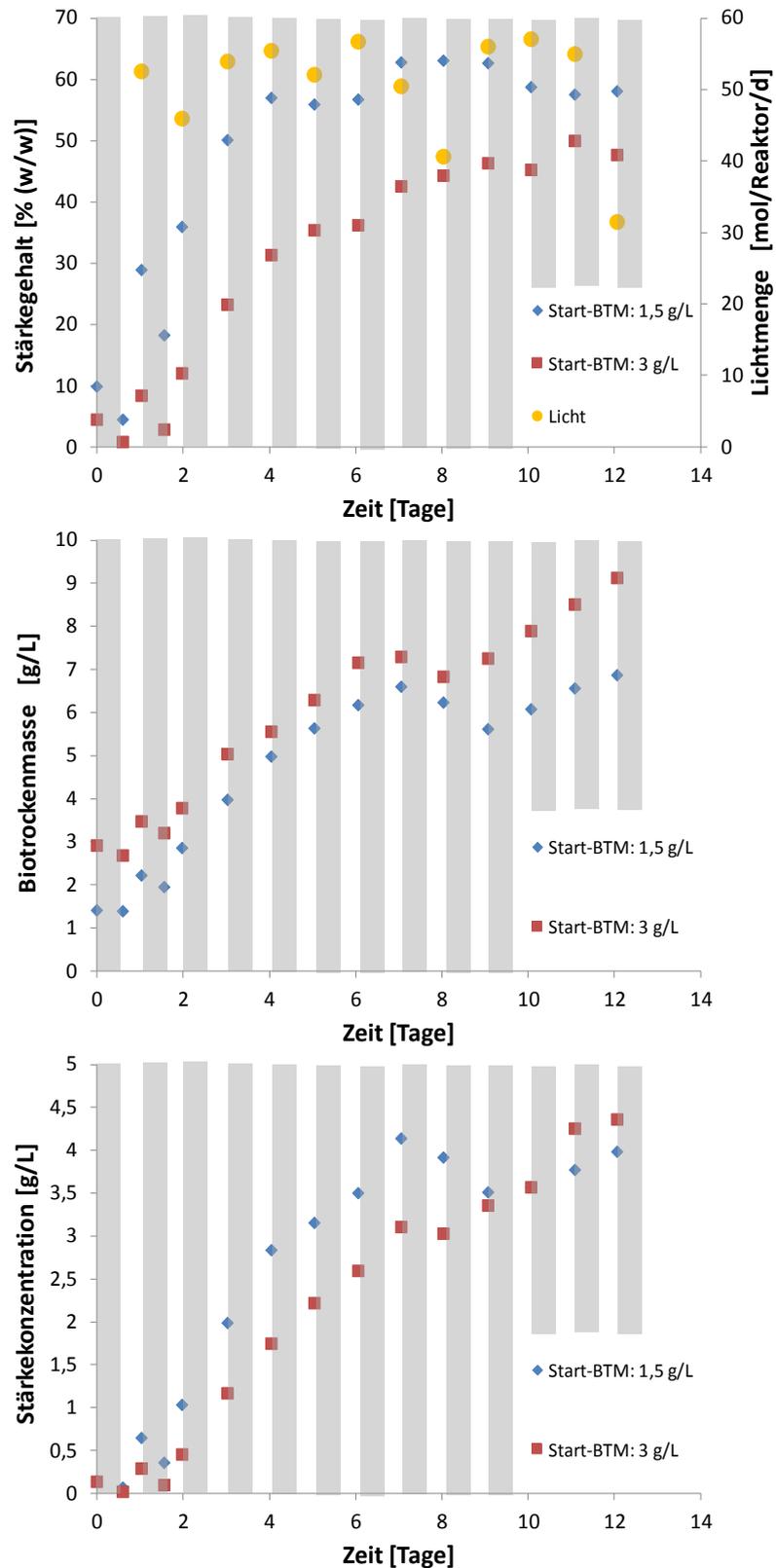


Abbildung 11: Erste Versuchsreihe der Freilandkultivierung von *Chlamydomonas reinhardtii* zur Stärkebildung im 28-L FPA-Reaktor (1.7.15-13.7.15). Gezeigt sind die ermittelten Stärkegehalte, Biomassekonzentrationen und Stärkekonzentrationen während der gesamten Limitierungsphase. Die Nachphasen sind durch graue Schattierungen dargestellt.

Die höchste Stärkeproduktivität trat in den ersten Tagen nach der N-Limitierung auf. Die Kultur mit einer Anfangsbiomassekonzentration von 1,4 g/L erreichte bereits nach 4 Tagen über 55 % (w/w) Stärkegehalt. Dieser stieg dann in den nächsten Tagen nur noch wenig, bis zu einem Maximum von 63 % (w/w) an Tag 8 an. Im Reaktor mit der Anfangsbiomassekonzentration von 3 g/L wurden erst nach 7 Tagen über 40 % (w/w) Stärkegehalt erreicht, auch das Maximum lag mit 50 % (w/w) an Tag 11 deutlich niedriger. Die Biomassekonzentration stieg während der Kultivierung auf 6,9 bzw. 9,1 g/L an. Der Abfall der Konzentration an Tag 7 bzw. 8 ist auf den Verdunstungsausgleich zurückzuführen, der an diesen Tagen durchgeführt wurde. Bedingt durch die steigende Biomassekonzentration stieg auch die absolute Stärkekonzentration im Reaktor bis zum Ende der Kultivierung an und erreichte in beiden Reaktoren etwa 4 g/L.

Diese Ergebnisse bestätigten sich auch in der 2. Versuchsreihe. Es wurden bei ähnlichen Anfangsbiomassekonzentrationen wie im ersten Experiment wiederum Stärkegehalte von 50-60 % (w/w) und Stärkekonzentrationen von 4 g/L erreicht. Zusätzlich wurde hier auch der Stärkeverlust bei Nacht analysiert, der nach dreitägiger Limitierung auf unter 2 % (w/w) des am Abend gemessenen Gehalts absank. Im Reaktor mit 5,7 g/L Startkonzentration wurde jedoch über den gesamten Zeitraum hinweg das Ammonium, das zu Beginn bei 122 mg/L lag, nicht verbraucht. Somit wurde auch keine Stärkeakkumulation induziert, der Stärkegehalt am Ende des Versuchs lag bei 16 % (w/w). Auch in der Wachstumsphase konnte bei einer Biomassekonzentration von über 6 g/L keine Produktivität mehr festgestellt werden. *Chlamydomonas reinhardtii* ist also im Freiland nicht in der Lage bei einer Biomassekonzentration von über 6 g/L eine zufriedenstellende Produktivität zu erreichen. Eine Ursache könnte die mangelnde Lichtverfügbarkeit in der Kultur sein, wobei im Labor höhere Biomassekonzentrationen erreicht wurden. Hier könnte die Lichtverteilung während eines Tages eine Rolle spielen, da die gleichmäßige 24-stündige Beleuchtung im Labor einen Vorteil gegenüber den an einem Tag schwankenden Lichtverhältnissen im Freiland darstellen kann, auch wenn während eines Tages die gleiche Photonenzahl auf die Algen trifft (Abbildung 12).

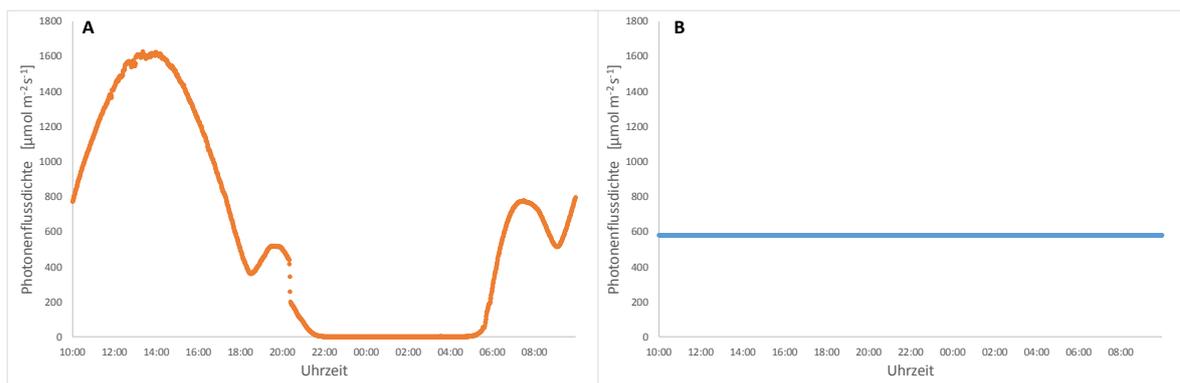


Abbildung 12: Vergleich der Photonflussdichte an einem wolkenlosen Sommertag (A, 1.7.2015) zur 24-stündigen Beleuchtung im Labor (B), bei gleicher vertikaler Lichtmenge.

Auffällig war bei den Kulturen außerdem die unterschiedliche Färbung der Kulturen, die sich während der Limitierung entwickelte. Während die Kultur mit 6 g/L Startkonzentration, die durchgehend mit Ammonium versorgt war, eine dunkelgrüne Farbe behielt, wurde der

Grünton in der Kultur mit 1,5 g/L Startkonzentration immer heller, bis zu einer gelbgrünen Färbung der Kultur (Abbildung 13).



Abbildung 13: Proben aus den Reaktoren der zweiten Limitierung am siebten Tag nach der Inkulation. Biomassestartkonzentrationen von links nach rechts: 1,5 g/L; 3 g/L (Reaktor hatte zu Beginn des Versuchs eine Leckage) und 6 g/L

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit *Chlamydomonas reinhardtii* im Freiland ein Stärkegehalt über 50 % (w/w) erreicht werden konnte, wenn die Startbiomassekonzentration bei oder unter 3 g/L lag. Ein Unterschied zur Stärkebildung von *Chlorella sorokiniana* lag vor allem in der starken Biomassezunahme von *Chlamydomonas reinhardtii* während der Stärkebildungsphase. Somit konnte auch mit geringen Biomassestartkonzentrationen (1,5 g/L) eine Endstärkekonzentration von nahezu 4 g/L erreicht werden, während bei *Chlorella sorokiniana* dieser Wert bei maximal 3,4 g/L mit einer Biomassestartkonzentration von fast 5 g/L lag.

Die Biomasse aus den Stärkebildungsversuchen und die übrige Biomasse aus der Wachstumsphase wurden an Südzucker übergeben. Die Ergebnisse der Freilandversuche wurden an die Subitec weitergegeben um diese für die Kultivierung in der Pilotanlage zu nutzen.

1.2.5 Stärkebildung durch weitere Algen

Als dritte Alge wurde *Tetraselmis suecica* ausgewählt da hier die Option bestehen könnte mit einem einstufigen Prozess, ohne Limitierungsphase, stärkereiche Algen zu produzieren (siehe Abschnitt 1.1). Ein einstufiger Prozess bietet Vorteile, da Reaktoren durchgehend genutzt werden können und beide Phasen nicht aufeinander abgestimmt werden müssen.

Nach mehreren Versuchen die Alge auf f/2-Medium, das die Salinität von Brackwasser hat, zu vermehren, wurde die Kultivierung zunächst auf VM-Medium (synthetisches Meerwasser) umgestellt. Ein 6-Liter Laborreaktor wurde inokuliert und die optische Dichte der Kultur sowie die Biotrockenmasse bestimmt. Dabei traten jedoch bei der Bestimmung der Biotrockenmasse über Filtration Probleme auf, da die Algen beim Waschen der Proben lysierten. Das Waschen der Proben mit entsalztem Wasser ist wichtig um Salze, die aus dem Medium stammen und das Ergebnis verfälschen würden, zu entfernen. Da dies bei *T. suecica* nicht möglich war, wurde in der Folge mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen, was jedoch das Lysieren der Zellen nicht immer verhinderte. Die gleichen Probleme traten beim Waschen abzentrifugierter Proben auf, weshalb hier auf das Waschen verzichtet wurde. Vermutlich ist der Unterschied des osmotischen Drucks zwischen Meerwassermedium (3,5 % Salzgehalt) und physiologischer Kochsalzlösung für die Algen zu groß. Wegen dieser Probleme mit der Biotrockenmassebestimmung ist in der Folge die optische Dichte der Algenkultur bei 750 nm aufgetragen. Das Verhältnis von Biotrockenmasse zu optischer Dichte lag bei nicht lysierenden Kulturen etwa bei 0,6.

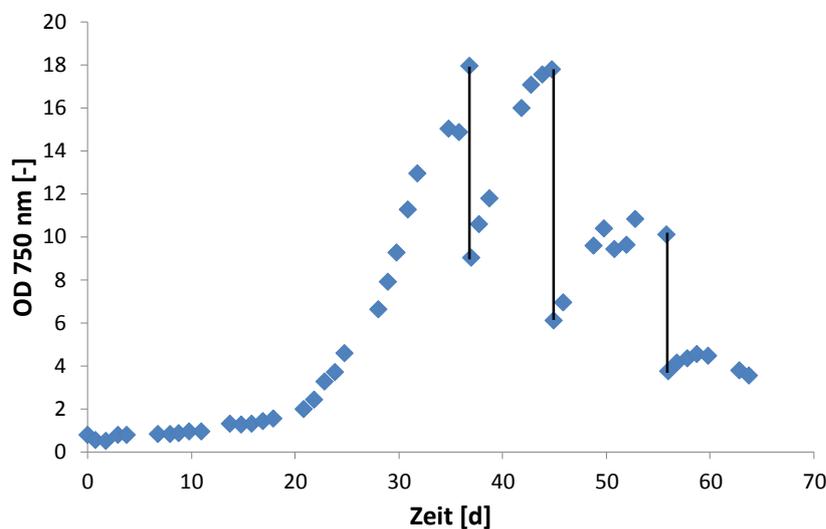


Abbildung 14: Kultivierung von *T.suecica* im repeated Fed-Batch-Verfahren. An den mit senkrechten Strichen markierten Stellen wurde die Kultur mit frischem Medium verdünnt.

Auffällig bei der Kultivierung war die lange lag Phase von etwa 20 Tagen (Abbildung 14), außerdem wurde die Produktivität nach jeder Verdünnung geringer, von anfangs $0,8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ auf später $0,3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und im letzten Lauf auf $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Wegen der Schwierigkeiten eine stabile Kultur im Fed-Batch-Verfahren zu etablieren wurde in der Folge eine neue Kultur inokuliert, die nach einer kurzen Anlaufphase als semikontinuierliche Kultur mit täglichen Ernten betrieben werden sollte. Im vorherigen Versuch war eine maximale Wachstumsrate von $0,17 \text{ d}^{-1}$ bei einer Biomassekonzentration von etwa 6 g/L ermittelt worden. Daher sollte die Biomasse in der semikontinuierlichen Kultur ebenfalls 6 g/L betragen und es wurden täglich 15 % des Reaktorvolumens ausgetauscht.

Die lag-Phase war diesmal mit 10 Tagen etwas kürzer und nach 20 Tagen konnte die semikontinuierliche Phase gestartet werden. Die ersten 4 Tage konnte mit einer Produktivität von über $1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und einer Wachstumsrate von über $0,2 \text{ d}^{-1}$ die Biomassekonzentration im Reaktor zwischen $4,5$ und $5,7 \text{ g/L}$ gehalten werden. An Tag 24

kam es jedoch zu einem Wachstumsstopp und um ein Auswaschen der Kultur zu vermeiden wurde die Ernte über das Wochenende ausgesetzt und montags wieder gestartet. Es konnte jedoch keine stabile Wachstumsrate mehr erreicht werden und die Dichte der Kultur sank weiter ab. Daher wurde die kontinuierliche Fahrweise beendet und die Kultur im Fed-Batch wieder auf etwa 6 g/L hochgezogen. Anschließend wurde die Kultur mit kochsalzfreiem VM-Medium verdünnt um den Einfluss verschiedener Salinitäten auf das Wachstum und die Stärkebildung von *T. suecica* zu testen, wobei eine Erhöhung des Stärkegehaltes schon für *T. subcordiformis* beschrieben ist (Yao et al., 2013). So wurde zunächst für eine Woche mit 75 % der Salinität von Meerwasser und anschließend nochmals 7 Tage mit 50 % der Salinität von Meerwasser kultiviert. An den Endpunkten der Versuche wurden Biomasseproben genommen und auf ihren Stärkegehalt hin untersucht. Der höchste Stärkegehalt wurde mit etwa 15 % (w/w) während der kontinuierlichen Phase erreicht. Während der Variation der Salinität lag der Stärkegehalt unter 5 % (w/w).

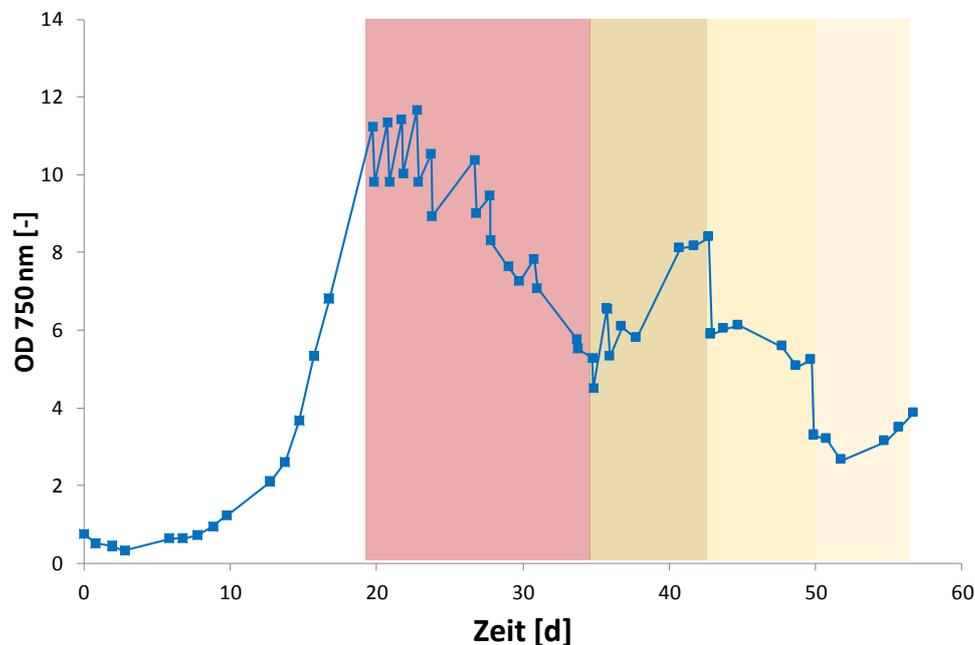


Abbildung 15: 2. Kultivierung von *T.suecica*, weiß hinterlegter Teil: Fed-Batch-Phase, rot hinterlegter Teil: semikontinuierliche Phase, dunkelgelb: 100 % Salzgehalt im Medium, mittelgelb: 75 % Salzgehalt im Medium, hellgelb: 50 % Salzgehalt im Medium.

Das größte Problem war es eine stabile Kultur von *Tetraselmis suecica* zu etablieren. Die Zellen sind sehr empfindlich gegenüber Scherkräften und osmotischem Druck, was sie schnell lysieren lässt. Lysierte Zellen sind wiederum in den nicht sterilen Kultivierungsbedingungen, die bei Algen üblich sind, ein gutes Substrat für Bakterien, was zu einem Überwachsen der Kultur durch Bakterien führt. Daher ist weitere Forschung notwendig, um eine stabile Kultivierung von *T. suecica* über mehrere Monate zu etablieren und damit erst die Grundlage für weitere Experimente zur Stärkebildung zu schaffen.

AP 2 Effizienzsteigerung der Algenproduktion

Um die Effizienz der Algenproduktion zu steigern können anstelle von synthetischen Nährstoffquellen (reine Chemikalien aus dem Labor, technisches CO₂) Abfallstoffe aus anderen Prozessen, wie zum Beispiel der flüssige Gärrest aus der anaeroben Vergärung oder auch CO₂ aus Verbrennungs- oder Fermentationsprozessen verwendet werden. Das CO₂ aus der Ethanolfermentation birgt dabei den Vorteil, dass es lebensmitteltauglich ist und somit die erzeugten Algen für Nahrungs- und Futtermittel genutzt werden könnten.

2.1 Wachstum und Stärkeproduktion auf Basis von Flüssiggärrest

Chlorella sorokiniana

Da zu Beginn der Versuche noch nicht ausreichend Gärrest aus der Schlempevergärung zur Verfügung stand, wurde ein 6-Liter Reaktor mit *Chlorella sorokiniana* inokuliert und zunächst auf Gärrest aus der Vergärung von Obst- und Gemüseabfällen adaptiert. Dazu wurden aus einer laufenden Kultur 1,5 Liter entnommen und durch sterilfiltrierten flüssigen Gärrest, dem zuvor Spurenelemente zugefügt worden waren, ersetzt. Nach dem die Nährstoffe aus dem Gärrest, insbesondere das in hohen Mengen enthaltende Ammonium (>1 g/L), verbraucht waren, wurde der Austausch erneut durchgeführt. Daraus ergab sich für die Algen eine steigende Gärrestkonzentration, die nach acht Austauschen bei über 90 % (v/v) liegt. Es ergab sich während der 50-tägigen Kultivierung eine durchschnittliche Produktivität von 0,4 g L⁻¹ d⁻¹, was bei der genutzten relativen Lichtintensität von 2,5 μmol g⁻¹ s⁻¹ auch etwa den Ergebnissen mit synthetischem Medium entspricht.

Der Flüssiggärrest aus der Schlempevergärung wurde vom DBFZ zur Verfügung gestellt¹. Einige Kenngrößen des Flüssiggärrests wurden im Fraunhofer IGB analysiert, dabei ergaben sich die folgenden Werte (Tabelle 11). Für die Algenkultivierung ist insbesondere das Verhältnis von N:P von Bedeutung, welches hier bei 15,8 lag. Somit wies der Gärrest im Verhältnis zur Ammoniumkonzentration eine zu niedrige Phosphatkonzentration auf, weshalb Phosphat zusätzlich in den Reaktor zugegeben wurde, wenn dies erforderlich war. Zusätzlich wurde dem Gärrest vor der Verwendung Spurenelemente hinzugefügt um eine Limitierung z.B. von Magnesium zu vermeiden.

¹ Energie aus Biomasse – Neue Wege zur integrierten Bioraffinerie – BIORAFFINERIE2021. BMBF-Forschungsvorhaben im Förderprogramm „BioEnergie 20121 – Forschung für die Nutzung von Biomasse. FKZ 0315559

Tabelle 11: Im IGB ermittelte Kenngrößen des Flüssiggärrests aus der Schlempe-Vergärung

Kenngrößen zum Flüssiggärrest (Schlempe)	
pH-Wert	7,85
TR	7,5 g/L
oTR	0,294 g/L
DOC	870 mg/L
CSB	2220 mg/L
Härte	19,8 dH°
Ca	66,8 mg/L
Mg	1,1 mg/L
SO ₄	78,7 mg/L
NH ₄ -N	1110 mg/L
NH ₄	1427 mg/L
PO ₄ -P	70 mg/L
PO ₄	214 mg/L

Der Gärrest ließ sich nicht über eine Kartusche sterilfiltrieren, da der Filter sich sehr schnell zusetzte. Daher wurde er mit einem Rotationsscheibenfilter mit einer Porengröße von 60 nm aufbereitet. Für die ersten drei Austauschungen wurde der Gärrest sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße), anschließend wurde der Gärrest nach der 60 nm-Filtration direkt genutzt. Aufgrund des hohen Ammoniumgehaltes konnten jeweils nur 1,2 Liter ausgetauscht werden um eine Inhibierung der Algen durch zu hohe Ammoniumkonzentrationen zu vermeiden. Während der Kultivierung traten große Probleme mit Aggregat- und Biofilmbildung der Algen auf. Dies führte dazu, dass teilweise nach der Entnahme der Kultur eine höhere Biomassekonzentration gemessen wurde als zuvor. Insgesamt wurden im Laufe der 60-tägigen Kultivierung jedoch 220 g Algen geerntet und das Ammonium aus insgesamt 16 Gärrestzugaben wurde vollständig verbraucht.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Gärrest aus der Schlempevergärung als Nährstoffquelle für die Kultivierung von *Chlorella sorokiniana* genutzt werden kann, wobei trotz der starken Biofilmbildung und der Aggregation der Algen ähnliche Ergebnisse wie auf synthetischem Medium erzielt werden konnten. Eventuell könnte eine Verbesserung der Logistik zwischen Biogasanlage und Algenreaktor auch zu einer vereinfachten Aufbereitung des Gärrests führen.

Für die Stärkebildung kann der Gärrest nicht als Mediumbestandteil genutzt werden, da das enthaltene Ammonium eine Induktion der Stärkebildung verhindert.

Chlamydomonas reinhardtii

Der Einfluss von flüssigem Gärrest als Mediumbestandteil wurde für *Chlamydomonas reinhardtii* im Schüttelkolben bestimmt. Dazu wurden 3 Schüttelkolben, die zuvor gutes Wachstum zeigten mit ca. 7 % (v/v) Gärrest versetzt, was zu einer Ammoniumkonzentration von 100 mg/L in der Kultur führte.

Die verschiedenen Ansätze zeigten unterschiedliches Verhalten. In zwei Kulturen sank die optische Dichte nach der Zugabe des Gärrests stark ab und es zeigte sich eine deutliche Gelbfärbung der Kultur (Abbildung 16). Im dritten Ansatz stieg die optische Dichte leicht an und die Kultur wies weiterhin eine dunkelgrüne Farbe auf. In allen Ansätzen war ein Verbrauch des Ammoniums zu beobachten und auch die Gelbfärbung der ersten beiden Kulturen verschwand nach etwa drei Wochen. Insgesamt wurden über fast 100 Tage viermal je 7 % (v/v) Gärrest den Kulturen zugegeben, wobei zwar das Ammonium vollständig verbraucht wurde, die optische Dichte jedoch kaum anstieg.



Abbildung 16: Dreifach Ansatz von *Chlamydomonas reinhardtii* im Schüttelkolben, A: 4 Tage nach Gärrest-Zugabe, B: 12 Tage nach Gärrest-Zugabe, C: 24 Tage nach Gärrest-Zugabe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *Chlamydomonas reinhardtii* langsam auf Gärrest als Mediumsbestandteil adaptiert werden konnte und dass die Adaption nicht so problemlos ablief wie bei *Chlorella sorokiniana*. Jedoch kann in einem FPA-Reaktor wegen der besseren Licht- und CO₂-Versorgung besseres Wachstum erwartet werden.

2.2 Wachstum und Stärkeproduktion auf Basis CO₂ aus der Ethanolfermentation

Das Wachstum der Stärke-akkumulierenden und thermotoleranten Grünalge *Chlorella sorokiniana* SAG 211-8k unter Verwendung von Gär-CO₂ wurde in einer von der Subitec GmbH errichteten Technikumsanlage zur Kultivierung phototropher Mikroorganismen am Standort der CropEnergies AG in Zeitz evaluiert (siehe Abbildung 17).



Abbildung 17: Technikumsanlage bestehend aus vier 28 L FPA-Photobioreaktoren zur Kultivierung phototropher Mikroorganismen nach Montage und Inokulation mit *C. sorokiniana* SAG 211-8k.

Die Fertigstellung der Anlage erfolgte in KW 26 des Jahres 2013. Die Anlage bestand aus vier 28 L FPA-Photobioreaktoren mit abgeschattetem Bypass zur *online* Bestimmung der Trockensubstanz (TS). Die Kultivierungstemperatur konnte über ein temperiertes Wasserbad reguliert werden. Volumenströme von Luft und CO₂ konnten mittels Massendurchflussregler (MFCs) reguliert werden. Eine kontinuierliche Datenaufzeichnung von Temperatur, pH und TS erfolgte über eine speicherprogrammierbare Steuerung (SPS, Siemens). Erste Kultivierungen erfolgten unter Verwendung von technischem CO₂ und der thermotoleranten Grünalge *Chlorella sorokiniana* SAG 211-8k.

In KW 35 des Jahres 2013 erfolgte die Montage und Inbetriebnahme der Gärgasaufbereitung. Die Photobioreaktoren wurden parallel unter identischen Bedingungen, mit Ausnahme der CO₂-Quelle, betrieben. Hierbei dienten zwei Reaktoren, betrieben mit technischem CO₂, als Kontrolle. Die beiden anderen Reaktoren wurden mit konditioniertem Gärgas betrieben. Selbiges wurde komprimiert und flüssige Bestandteile durch Kondensation an einem Wärmetauscher entfernt. Hierfür reichte eine Kühlung des Gärgases auf unter 15°C aus. Während der Kondensation wurden sämtliche im Gas befindlichen Ethanolrückstände abgeführt. Während das Kondensat eine durchschnittliche Ethanolkonzentration von 82,5 g L⁻¹ aufwies, konnte zu keinem Zeitpunkt Ethanol in einem der Photobioreaktoren nachgewiesen werden. Abbildung 18 stellt exemplarisch den Temperaturverlauf vor und nach der Kühlung im Wärmetauscher dar.

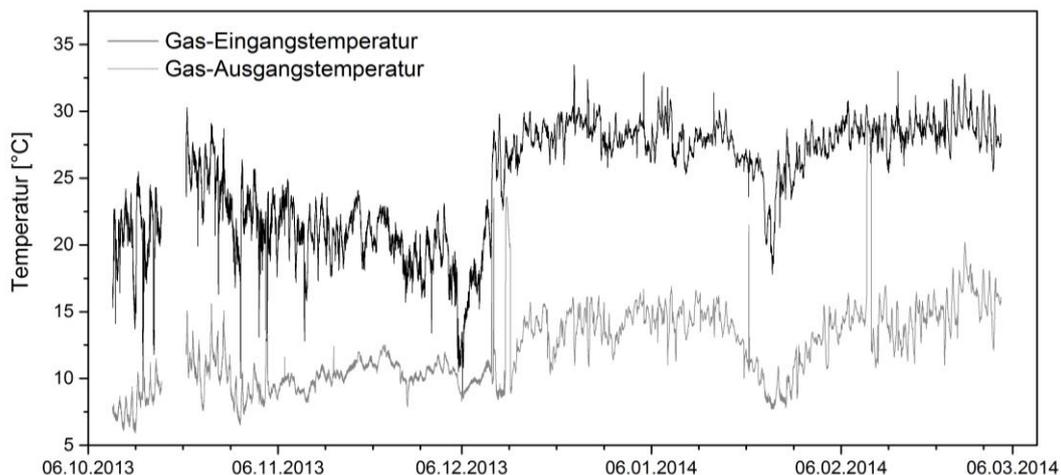


Abbildung 18: Exemplarischer Temperaturverlauf des Gärgases am Ein- und Auslass des Wärmetauschers.

Modifiziertes DSN (*Distilled Water Seawater Nitrogen*) diente als Medium und wurde über einen Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) verabreicht. Die Zusammensetzung des Mediums war (in g L⁻¹): Instant Ocean®, 3,5; CaCl₂, 0,56; MgSO₄ * 7H₂O, 2,46 und (in mg L⁻¹): MnCl₂ * 4H₂O, 20,0; ZnSO₄ * 7H₂O, 5,0; CoSO₄ * 7H₂O, 5,0; Na₂MoO₄ * 2H₂O, 5,0; CuSO₄ * 5H₂O, 0,5; Fe(III)C₆H₅O₇ * H₂O, 15,98; K₂HPO₄, 181,2; KH₂PO₄ 473,2 und NH₄HCO₃ 1314. Die Phosphat- und Ammoniumkonzentrationen wurden täglich ermittelt und die Differenz zur Ausgangskonzentration via Sterilfiltration (0,2 µm Porengröße) nachgefüttert um Limitationen auszuschließen. Die Kultivierungstemperatur betrug 30°C. Die Begasungsrate betrug 360 L h⁻¹ (0,24 vvm). Der CO₂-Volumenstrom wurde mittels MFCs in Abhängigkeit des pH-Wertes geregelt; dessen Sollwert wurde auf 6,5 eingestellt. Kontinuierliche Beleuchtung mit einer durchschnittlichen Photonenflussdichte von 380 µmol Pho-

tonen $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf der Reaktoroberfläche wurde mittels zweier Hochdruck-Natriumdampflampen realisiert. Ein Fließbild der Anlage ist in Abbildung 19 dargestellt.

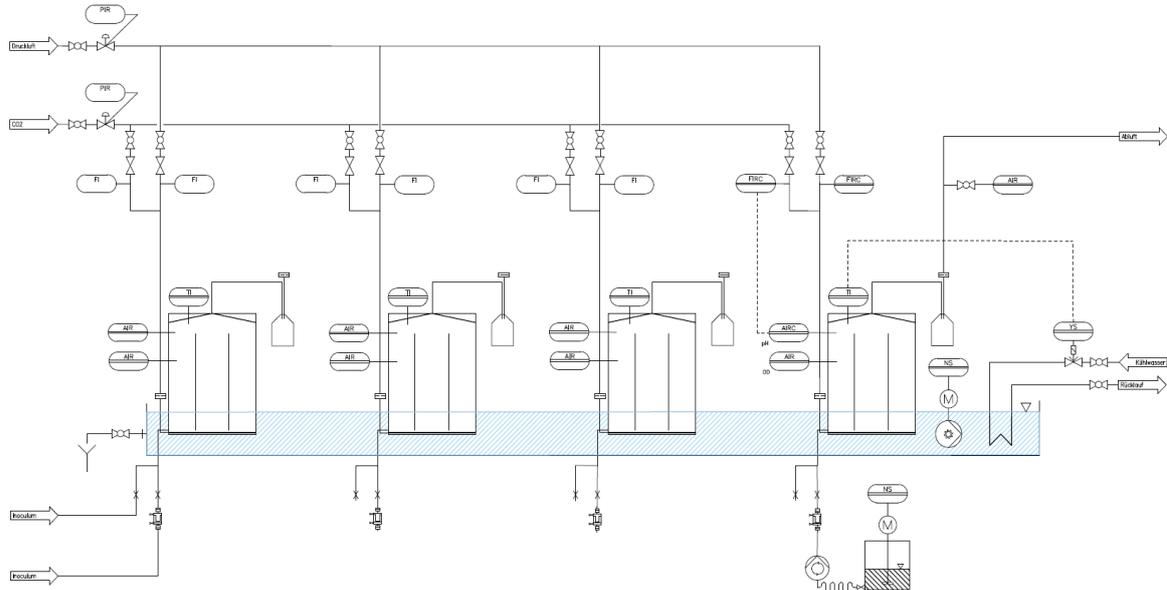


Abbildung 19: Fließbild der Technikumsanlage zur Kultivierung phototropher Mikroorganismen bestehend aus vier 28 L FPA-Photobioreaktoren (28_1 – 28_4).

Der Versuch wurde im Triplikate durchgeführt, resultierte dementsprechend in sechs Wachstumsphasen pro eingesetzter CO_2 -Quelle. Die Bewertung des Wachstums erfolgte mittels täglicher Messung der optischen Dichte bei 750 nm (OD_{750} ; Photometer DR3900, Hach Lange GmbH). Diese wurde über einen zuvor ermittelten Korrelationsfaktor in die Trockensubstanz (TS) umgerechnet. Hierbei entsprach eine OD_{750} von 1,0 einer Trockensubstanz von $0,334 \text{ g L}^{-1}$ (siehe Abbildung 20). Die Wachstumskinetik der Kulturen ist in Abbildung 21 dargestellt und in Tabelle 12 zusammengefasst.

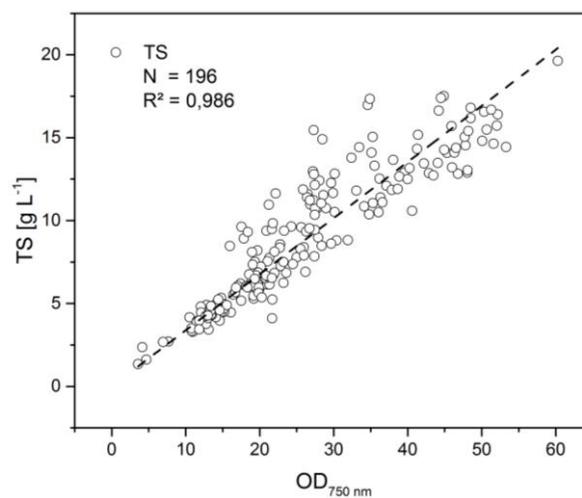


Abbildung 20: Korrelation zwischen Trockensubstanz von *Chlorella sorokiniana* SAG 211-8k und optischer Dichte bei 750 nm.

Tabelle 12: Zusammenfassung der unter Verwendung von technischem CO₂ und Gär-CO₂ erzielten Kultivierungsergebnisse von *C. sorokiniana* SAG 211-8k als Produktivität während der linearen Wachstumsphase (angegebene Kultivierungstage) resultierend aus der Steigung der Regressionsgerade.

Reaktor	CO ₂ -Quelle	Produktivität [g L ⁻¹ d ⁻¹]			
		Kultivierung 1 (Tag 03 – 15)	Kultivierung 2 (Tag 21 – 31)	Kultivierung 3 (Tag 36 – 51)	Mittelwert
28_1	Techn. CO ₂	0,93	0,67	0,79	0,80 ± 0,10
28_2	Gär-CO ₂	0,87	0,85	0,73	0,82 ± 0,06
28_3	Gär-CO ₂	1,11	0,94	0,77	0,93 ± 0,16
28_4	Techn. CO ₂	1,11	1,01	0,85	1,00 ± 0,11

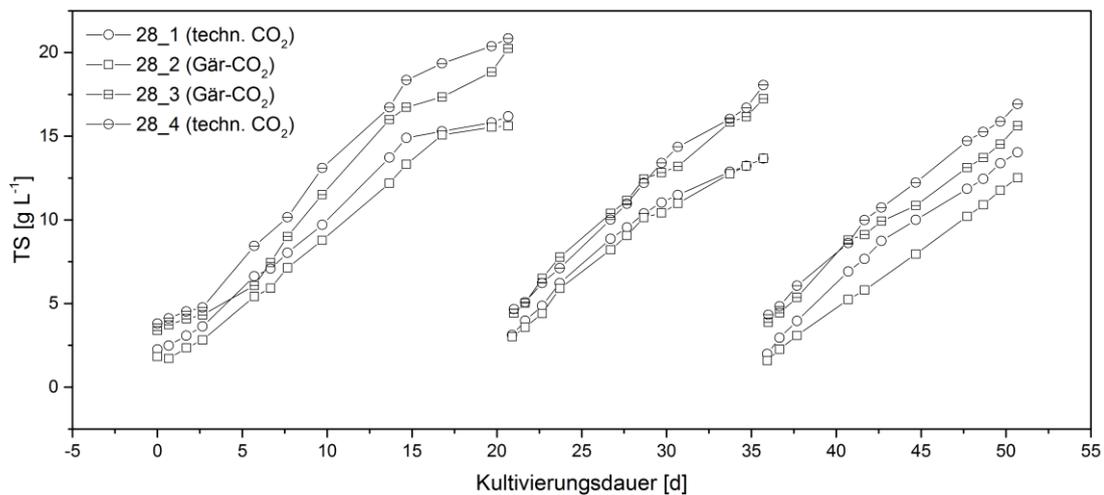


Abbildung 21: Wachstumskinetik von *C. sorokiniana* SAG 211-8k unter Verwendung von technischem CO₂ und Gär-CO₂.

Wie aus Abbildung 21 und Tabelle 12 ersichtlich, wiesen die Kulturen unter Verwendung von technischem CO₂ und Gär-CO₂ eine identische Wachstumskinetik während der Dreifachbestimmung auf. Die mittlere Produktivität aller durchgeführten Versuche betrug $0,89 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ für technisches CO₂ und $0,88 \pm 0,12 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ für Gär-CO₂. Auch die finalen Biomassekonzentrationen einzelner Kultivierungen unterschieden sich nicht signifikant, wenn man die differierenden Anfangskonzentrationen berücksichtigt. Maximal konnte eine Biomassekonzentration von 20 g L^{-1} innerhalb eines Kultivierungszeitraums von 20 Tagen erzielt werden. Abschließend kann konstatiert werden, dass Gärgas, nach marginaler Konditionierung (Kompression und Trocknung), eine geeignete Kohlenstoffquelle zur photoautotrophen Kultivierung von Mikroalgen darstellt. Dieses Ergebnis konnte ohne Ein-

schränkung auf die Pilotanlage übertragen und skaliert werden (siehe Kapitel 7.2 Übertragung der optimierten Parameter aus AP1 auf die Pilotanlage). Hier wurde auch die Limitierung zur Stärkeproduktion durchgeführt, um ausreichend Biomasse für andere Arbeitspakete zur Verfügung zu stellen.

2.3 Etablierung online-Monitoring und Erhöhung des Automatisierungsgrades

Hinsichtlich eines größtmöglichen Automatisierungsgrads industrieller Anlagen zur photoautotrophen Produktion von Mikroalgen wurden verschiedene *online-Monitoring* Systeme evaluiert und auf ihre Tauglichkeit hin überprüft, aussagekräftige Daten zu liefern die es erlauben die Aktivität und „Vitalität“ einer Algenkultur abzuschätzen. Obwohl eine Vielzahl an potentiell nutzbaren Sensoren auf dem Markt zur Verfügung steht, stellt die Integration selbiger an das Photobioreaktorsystem eine Herausforderung dar. Die Gründe hierfür sind vielfältig, vor allem da der Großteil der kommerziell erhältlichen Messsysteme nicht für das *Monitoring* von Algenkulturen konzipiert wurde. Zum einen erreicht der im vorliegenden Projekt genutzte Photobioreaktor sehr hohe Zelldichten. Diese erschweren zum Beispiel die *online* Erfassung der Trübung/optischen Dichte. Hierbei müssen Sonden, die nach dem Durchlicht-Prinzip arbeiten, entweder einen sehr starken Lichtimpuls ausüben, der weiterhin für dünnere Kulturen anpassbar sein muss um z.B. die Trockensubstanz auch kurz nach Inokulation detektieren zu können, und/oder eine geringe Spaltbreite aufweisen. Dies wiederum begünstigt eine Biofilmbildung, die sich vor allem in hochzell-dichten Kulturen nur schwer vermeiden lässt und die Messergebnisse negativ beeinflusst. Eine weitere Störgröße für optische Sensorik während der photoautotrophen Kultivierung stellt das künstliche oder natürliche Gegenlicht dar. Bereits unter kontrollierten Bedingungen im Labormaßstab nimmt dies mit steigender Kulturdichte stetig ab und erschwert somit eine korrekte Kalibrierung. Im Freiland unterliegen sowohl Intensität als auch Eintrittswinkel des Gegenlichtes täglichen und saisonalen Schwankungen. Des Weiteren wird selbiges, bedingt durch die Reaktorfunktionsweise nach dem *Airlift*-Prinzip, welche an sich eine Herausforderung für jegliche Sensorik darstellt, permanent „unkontrolliert“ reflektiert und gestreut. Zur Minimierung zuvor benannter Störgrößen wurde daher beschlossen, mit (teil)abgeschatteten Bypässen zu arbeiten, in denen, mittels Anbringung im Bereich des *Downcomers* oder als externe Sensorstecke, auch die Abundanz von Luftblasen reduziert wurde. Eine Zusammenfassung der evaluierten Messsensorik ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Zusammenfassung evaluierter Messsensorik mit Angabe von Messparameter und Hersteller.

Sensor	Parameter	Hersteller
Trübungs- und Feststoffsonde TSS Wsc, <i>in-situ</i> Sonde mit Wischer	Trübung, Trockensubstanz	Hach Lange GmbH
Quad-PAM	Fluoreszenz, Photosyntheseaktivität	Gademann Instruments GmbH
Dipping Probe pCO ₂ minisensor	CO _{2(aq)} , CO ₂ -Partialdruck	PreSens GmbH
ORBISPHERE TC-Sensor	CO _{2(aq)} , CO ₂ -Partialdruck	Hach Lange GmbH
InPro5000i/12/120	CO _{2(aq)} , CO ₂ -Partialdruck	Mettler-Toledo GmbH
BlueInOne Cell 25100	CO _{2(g)} , O _{2(g)}	BlueSens GmbH

2.3.1 Trockensubstanzgehalt

Die Trübungssonde der Firma Hach Lange GmbH besteht aus rostfreiem Edelstahl mit Saphirfenstern für Umgebungen mit hohen Feststoffkonzentrationen. Das Messverfahren stellt ein kombiniertes Mehrstrahl-Wechsellicht-Verfahren mit IR-Diodensystem und Strahlfokussierung dar. Ausgestattet mit einem Wischer, werden die Strahlenfenster frei von Biofilm gehalten. Des Weiteren besitzt die Sonde laut Herstellerangaben ein einzigartiges Kompensationssystem gegen Störeinflüsse durch Luftblasen, sodass die Sonde für die Applikation im beschriebenen Photobioreaktorsystem ideal erschien. Das Messsystem wurde über einen im *Downcomer*-Bereich angebrachten, durchströmten Bypass an einen 28 L FPA-Photobioreaktor integriert (siehe Abbildung 22), welcher mit *C. sorokiniana* SAG 211-8k betrieben wurde. Die Datenaufnahme erfolgte nach abgeschlossener Dreipunktkalibrierung während eines Kultivierungszyklus. Die *online* gemessenen Trockensubstanzen wurden mit denen aus der *offline* durchgeführten OD₇₅₀ Messung berechneten TS-Werten (siehe Abbildung 20) verglichen. Die erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

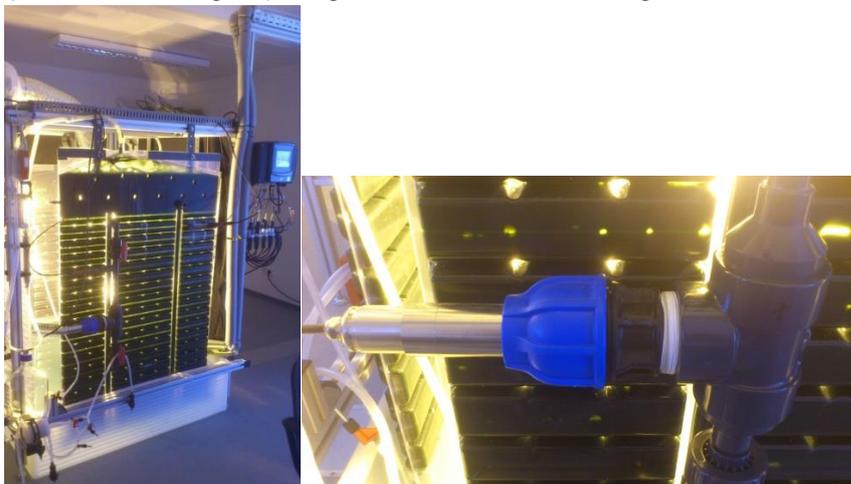


Abbildung 22: Integration der Hach Lange Trübungssonde an einem 28 L FPA-Photobioreaktor über einen abgeschatteten Bypass im Downcomer-Bereich.

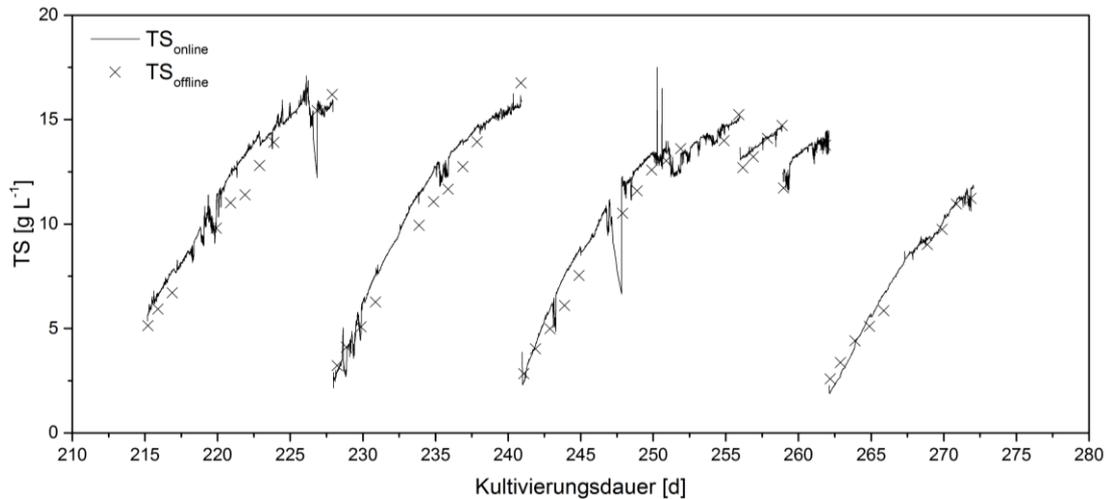


Abbildung 23: Vergleich der mittels Hoch Lange Trübungssonde gemessenen und über die OD_{750} berechneten Trockensubstanzgehalte während der Kultivierung von *C. sorokiniana* SAG 211-8k.

Wie aus Abbildung 23 ersichtlich, generierten die mittels Hoch Lange Trübungssonde gemessenen und über die OD_{750} berechneten Trockensubstanzgehalte während der Kultivierung von *C. sorokiniana* SAG 211-8k vergleichbare Wachstumsverläufe. Nichtsdestotrotz konnten Abweichungen von bis zu $1,5 \text{ g L}^{-1}$ und eine allgemeine Unterbewertung der vorherrschenden Trockensubstanz durch die Sonde verzeichnet werden (siehe z.B. Kultivierungstag 222), welche eine auf dem Messsystem basierende Automatisierung von industriellen Anlagen schwierig erscheinen lässt. Hierbei ist davon auszugehen, dass primär das SONDENSIGNAL vom wahren Istwert abwich. Dies könnte zum Beispiel an veralteten Kalibrierwerten (anderer Kulturzustand) liegen. Mit einfachsten nachgeschalteten mathematischen Mitteln (Korrelation), die sich ohne weiteres auch in die speicherprogrammierbare Steuerung integrieren lassen, war es allerdings möglich das SONDENSIGNAL anzupassen (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25). Abschließend kann man die verwendete Sensorik für das *Monitoring* des Wachstums von Laborkulturen bis zu einer Trockensubstanz von mindestens $12,5 \text{ g L}^{-1}$ als geeignet bewerten. Es ist davon auszugehen, dass höhere Konzentrationsbereiche durch die Wahl adäquater Kalibrierpunkte ebenfalls dargestellt werden können. Dieses Ergebnis konnte nur bedingt auf die Pilotanlage übertragen und skaliert werden (siehe Kapitel 7.2 Übertragung der optimierten Parameter aus AP1 auf die Pilotanlage).

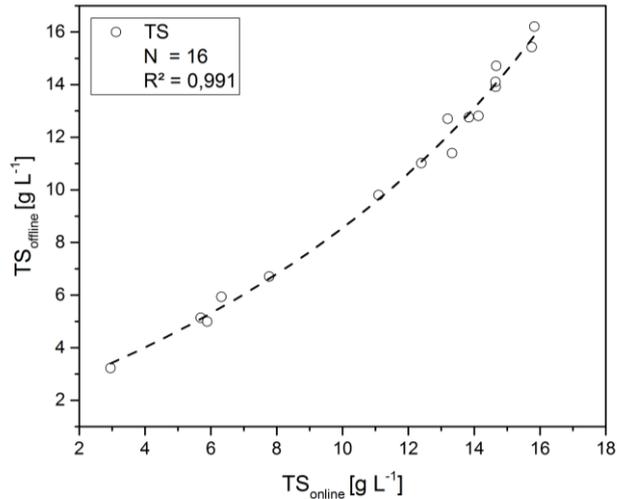


Abbildung 24: Korrelation der mittels Hach Lange Trübungssonde gemessenen und über die OD₇₅₀ berechneten Trockensubstanzgehalte während der Kultivierung von *C. sorokiniana* SAG 211-8k

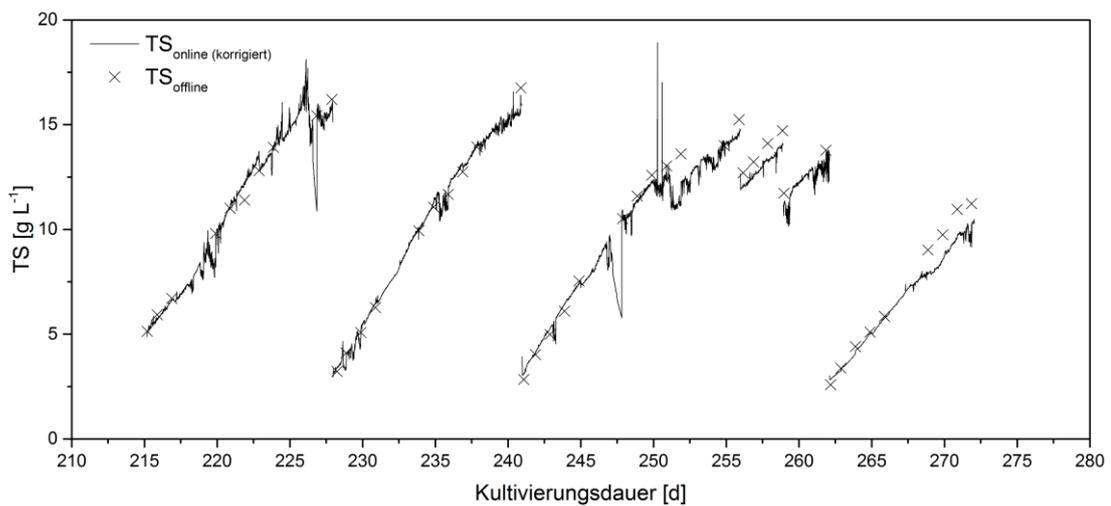


Abbildung 25: Vergleich der mittels Hach Lange Trübungssonde gemessenen/korrigierten und über die OD₇₅₀ berechneten Trockensubstanzgehalte während der Kultivierung von *C. sorokiniana* SAG 211-8k.

2.3.1 Fluoreszenz

Neben der *online*-Bestimmung der Trockensubstanz sollte Sensorik etabliert werden, das ein direktes Signal über den Zustand der sich in Kultur befindlichen Zellen generiert. Hierbei wurde sich für die PAM (*pulse amplitude modulation*) Fluoreszenz entschieden, welche die Aktivität des Photosynthesesystems II (PSII oder P680) über mehrere Parameter (z.B. Maximalfluoreszenz nach Dunkeladaption und Applikation eines sättigenden Lichtimpulses) darstellt. Durch diverse Stressfaktoren, wie z.B. Temperatur, pH und Nährstofflimitierung, verringert sich hierbei die Quantenausbeute (es werden weniger Photonen durch das P680 verarbeitet), sodass Rückschlüsse auf die „Vitalität“ der Kultur ge-

geschlossen werden können. In Vorversuchen in Schüttelkolben konnten hierbei Einflüsse wie Licht- und CO₂-Mangel sowie prozentuale Anteile photosynthetisch aktiver Zellen versus toter Zellen nachgewiesen werden. Für die Integration der Sensorik (Quad-PAM, Gademann Instruments GmbH) an das Photobioreaktorsystem standen sowohl invasive, als auch nicht-invasive Messköpfe zur Verfügung. Die Integration erfolgte, nach diversen Vorversuchen zur Position der Anbringung, ebenfalls in bzw. an einem abgedunkelten Bypass der während der Projektlaufzeit auf Grund fortwährender Beobachtungen wie mangelnde Durchströmung und Biofilmbildung an Sichtfenstern und/oder Messköpfen weiterentwickelt wurde. Die finale Version bestand aus einem intermittierend begasteten Bypass, wobei die Begasung eine Biofilmbildung an den Messköpfen der invasiven Sensorik verhinderte (siehe Abbildung 26).



Abbildung 26: Integration der PAM-Sensorik (invasiv) an ein 6 L FPA-Photobioreaktorsystem über einen Bypass mit intermittierender Begasung an der lichtabgewandten Seite.

Abschließend ist zu konstatieren, dass lediglich die invasive PAM-Sensorik störungsfreie (keinen Schwankungen unterliegend) Ergebnisse bei gleichbleibenden Kultivierungsbedingungen lieferte. Die Sensorik wurde an einen 6L FPA-Photobioreaktor integriert. Kontrollbedingungen der Kultivierung waren eine Begasungsrate von 180 L h⁻¹ (0,5 vvm), 6,7% (v/v) CO₂ und 485 μmol m⁻² s⁻¹ (Hochdruck-Natriumdampfampe) unter Verwendung von DSN Medium. Hierbei resultierte eine Kultivierung über 23 h in einer Produktivität von 1,46 g L⁻¹ d⁻¹ und korrelierte zu einem F_v/F_m Verhältnis zwischen 0,7 und 0,75, welche dementsprechend einer „vitalen“ Kultur zuzusprechen war (siehe Abbildung 27).

In Folge wurden, mit zwischenzeitlichen „Erholungsphasen“ unter Kontrollbedingungen von mindestens 4 h, verschiedene Stressfaktoren appliziert. Diese bestanden aus Dunkelheit, 0% v/v CO₂ und einer Temperatur von 10°C bzw. 48°C.

Die Applikation kompletter Dunkelheit zeigte keinerlei Einfluss auf das F_v/F_m Verhältnis. Dies ist vermutlich dadurch begründet, dass sich der überwiegende Teil der Zellen bei einem Trockensubstanzgehalt von $6,12 \text{ g L}^{-1}$ auch unter Kontrollbedingungen in einem dunkeladaptierten Zustand befand (Lichtattenuation durch Abschattung und Reflektion). Eine Zunahme des F_v/F_m Verhältnisses, wie sie zu vermuten war, konnte daher nicht detektiert werden da sich die Reaktionszentren des PSII schon vor dem Ausschalten der Lichtquelle im offenen Zustand befanden. Dies bedeutet, dass auch hier die Grundlage für maximale Photosyntheseaktivität bei Applikationen eines Lichtpulses gegeben war. Es konnte kein Wachstum detektiert werden.

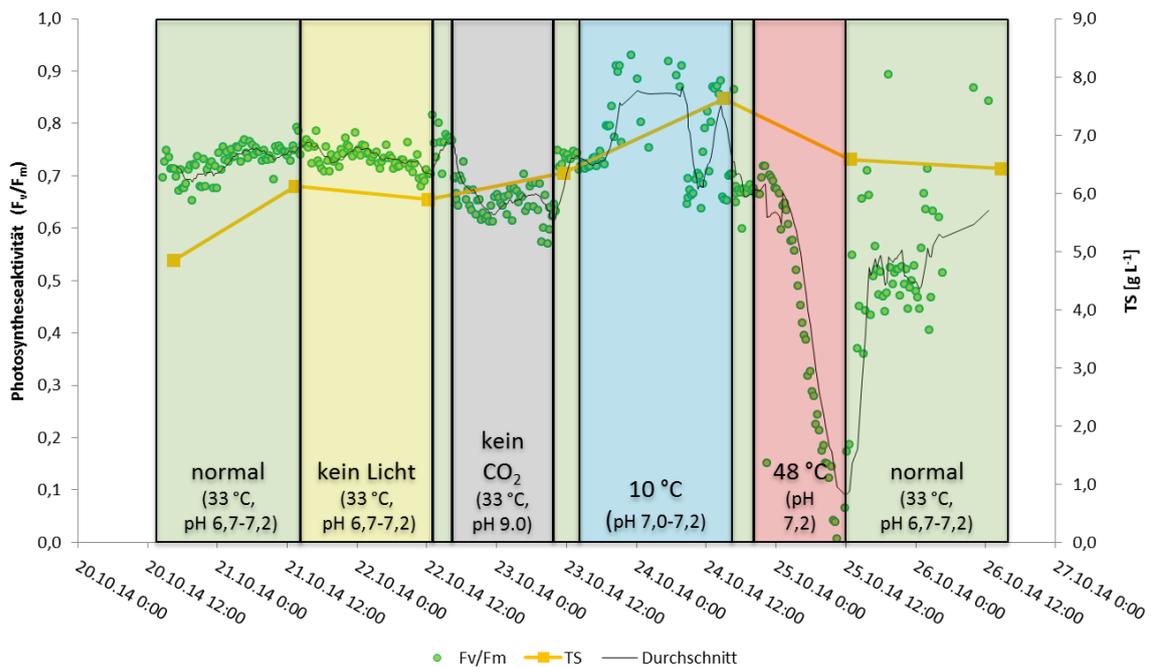


Abbildung 27: Evaluation der PAM-Sensorik integriert an einem 6 L FPA-Photobioreaktor unter Verwendung eines begasten Bypasses. *C. sorokiniana* SAG 211-8k wurde verschiedenen Stresssituationen ausgesetzt.

Das Ausschalten der CO_2 -Versorgung resultierte in einem reduzierten F_v/F_m Verhältnis von $0,6 - 0,7$ bei einer Produktivität von $0,46 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Nach Wiederinbetriebnahme der CO_2 -Versorgung „normalisierte“ sich das F_v/F_m Verhältnis. Die Reduktion der Photosyntheseaktivität wurde hierbei entweder durch CO_2 oder den pH-Wert, der mit 9 ungefähr zwei pH-Einheiten über dem der Kontrolle lag, ausgelöst.

Eine Reduktion der Kultivierungstemperatur resultierte aus nicht benennbaren Gründen in einer potentiell erhöhten Photosyntheseaktivität. Eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur resultierte in einer gegen Null tendierenden Photosyntheseaktivität.

Abschließend kann konstatiert werden, dass die erzielten Ergebnisse der „Vitalität“ bei verschiedensten Stressapplikationen (Dunkelheit, CO_2 -Mangel, sub- und supraoptimale Temperaturen) nur eingeschränkt interpretierbar waren und weiterer F&E-Bemühungen bedingen. Potenzielle Gründe hierfür stellen die für diese Art der Sensorik hohen Zelldich-

ten (> 5 g Trockensubstanz pro Liter) sowie die für diese Art der Sensorik vergleichsweise hohen Strömungsgeschwindigkeiten im Bypass dar. Dennoch ist davon auszugehen, dass mittels weiterer Anpassungen, wie zum Beispiel dem Pausieren der Begasung des Photobioreaktors und dem damit verbundenen Abbruch der Strömung im Bypass während der Messung, verlässliche Werte zu generieren sind. Hierzu sollte ein empirischer Versuchsansatz mit Aufnahme eines ausgedehnten Datenpools genutzt werden.

2.3.1 Gasförmiges/gelöstes Kohlendioxid und Temperatur

Eine weitere, wenn auch indirekte, Methode zur Bewertung der Photosyntheseeffizienz von Mikroalgenkulturen stellt die Messung der CO₂-Fixierung (Differenz von % v/v CO₂-Zuluft und CO₂-Abluft) bzw. die der Sauerstoffevolution (Differenz von % v/v O₂-Abluft und O₂-Zuluft) dar. Sie gibt somit einen Aufschluss über die Nettophotosynthese. Während der Evaluation des Sensors BlueInOneCell 25100 (BlueSens GmbH), die an einem 28 L FPA-Photobioreaktor während der Kultivierung von *C. sorokiniana* durchgeführt wurde, stellte sich heraus, dass diese Art der Sensorik für das verwendete Photobioreaktorsystem keine interpretierbaren Ergebnisse lieferte. Hauptgrund hierfür stellt der hohe CO₂-Volumenstrom dar, der zur pH-Regulierung genutzt wurde. Dieser liegt bei einer Begasungsrate von 360 L h⁻¹ bei mindestens 9 L h⁻¹ (2,5% v/v). Bei einer kontinuierlich hohen Produktivität von 1 g L⁻¹ d⁻¹ im Reaktor (25 L Arbeitsvolumen), können theoretisch 45 g CO₂ Reaktor⁻¹ d⁻¹ in Biomasse fixiert werden. Dies wiederum entspricht, unter der bewussten Vereinfachung der Betrachtung von CO₂ als ideales Gas, 25,4 L CO₂ d⁻¹ bei 30°C. In Anbetracht der Tatsache, dass pro Tag und Reaktor mindestens 216 L CO₂ injiziert werden, ist es nicht weiter verwunderlich, dass die gegebene Sensorik keine CO₂-Fixierung im zeitlichen Verlauf darstellen kann. Weitere Versuche wurden somit *ad acta* gelegt. Selbiges gilt für die Messung von gelöst-CO₂ (CO_{2(aq)}), die mit drei verschiedenen Systemen, basierend auf drei Messprinzipien, evaluiert wurde. Hierbei lässt sich auf Grund der stetigen Zuführung von CO₂ in das Photobioreaktorsystem keine Zehrung aus dem Medium nachweisen. Abschließend wurde in AP2 der Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von *C. sorokiniana* in einem 6 L FPA-Photobioreaktor ermittelt, um den während der Freilandkultivierung für die Kühlung benötigten Wasser- und Energiebedarf zu minimieren, während gleichzeitig Bedingungen für eine hohe Produktivität gewährleistet wurden. Der Versuchsaufbau beinhaltete fünf Temperaturen zwischen 15°C und 43°C. Die Kultivierung bei sowohl 15°C als auch 43°C über einen Zeitraum von sieben Tagen resultierte lediglich in einer maximalen Produktivität von 0,6 g L⁻¹ d⁻¹ und einer finalen Biomassekonzentration von 5 g L⁻¹. Kultivierungen zwischen 28°C und 38°C verliefen ohne signifikante Unterschiede. Hierbei sank die volumetrische Produktivität in einem Biomassekonzentrationsbereich zwischen 2,5 g L⁻¹ und 11 g L⁻¹ während der Kultivierungsperiode nicht unter 1,0 g L⁻¹ d⁻¹. Der für die Freilandkultivierung zulässige Maximalwert der Temperatur wurde folgerichtig auf 38°C eingestellt.

AP 3 Algenernte, Zellaufschluss und erste Fraktionierung

Nach der Kultivierung der Algen müssen diese in einem nächsten Schritt zunächst aufkonzentriert und anschließend zur Freisetzung der Inhaltsstoffe aufgeschlossen werden.

Ziel dieses Arbeitspaketes war es die Aufarbeitungsschritte Separierung, Zellaufschluss und erste Fraktionierung der aufgeschlossenen Biomasse zu untersuchen und hinsichtlich ihres Energiebedarfes optimieren.

3.1 Zellernte

Die Zellernte stellt, neben der Generation von Turbulenz im Photobioreaktorsystem, einen der energieintensivsten Schritte während der Herstellung von Produkten aus Mikroalgen dar. Selbst bei im FPA-PBR zu erreichenden Biomassekonzentrationen von 20 g L^{-1} besteht die finale Suspension zu 98% (w/w) aus Wasser. Selbige muss für weitere Downstream-Applikationen wie Zellaufschluss, Fraktionierung, Extraktion etc. demnach zuerst aufkonzentriert werden. Dies wird durch die geringe Zellgröße (ca. $3 - 30 \mu\text{m}$) der meisten Arten sowie zu einer zu Wasser ähnlich Dichte erschwert. Die am häufigsten eingesetzten Methoden zur Teilentwässerung von Mikroalgenkulturen stellen Filtration, Sedimentation und Zentrifugation dar.

Im Labormaßstab konnte die Teilentwässerung von *C. sorokiniana* SAG 211-8k über eine Laborzentrifuge (Heraeus Biofuge, Thermo Fisher Scientific Inc.) realisiert werden. Hierbei wurden durch Zentrifugation bei $22\,000 \text{ g}$ Biotrockenmassekonzentrationen von ca. 32 % erreicht. Der Aufkonzentrierungsfaktor betrug somit ca. 15.

Um den erforderlichen Energiebedarf zur Teilentwässerung zu reduzieren, werden in der Literatur häufig Flokkulationsmethoden beschrieben, welche eine Aggregation der Zellen hervorrufen. Die gebildeten Aggregate stellen folgerichtige große Partikel mit höherer Dichte dar, welche, je nach angewandter Methode, schneller sedimentieren oder, im Falle von z.B. Elektroflokkulation, flotieren. Nachgeschaltete Teilentwässerungsschritte können somit „intensiviert“ werden.

Während der Projektlaufzeit wurde die Flokkulation mittels pH-*shift* unter Verwendung von NaOH sowie unter Verwendung der polykationischen Flokkulationsmittel Chitosan, Polyethylenimin (PEI) und Polydiallyldimethylammoniumchlorid untersucht. Dies resultierte lediglich in geringen Aufkonzentrationsfaktoren von maximal 3,5 für PEI. Weitere Flokkulationsversuche wurde daher *ad acta* gelegt.

Die Zellernte der Pilotanlage im Großmaßstab ($4,3 \text{ m}^3$) wurde mit verschiedenen, kommerziell verfügbaren Geräten realisiert. Hierbei wurde eine Vollmantelzentrifuge der Fa. Heine, sowie ein Separator und Dekanter der Firma Alfa Laval eingesetzt. Die technischen Daten, Versuchsparameter sowie abschließende Bewertungen der Geräte sind in folgender Tabelle (Tabelle 14) zusammengefasst.

Tabelle 14: Vergleich der verwendeten Geräte zur Zellernte der während der Freilandproduktion generierten Biomasse

	Heine Vollmantel-zentrifuge	Alfa Laval Seperator Clara 20	Alfa Laval Dekanter P1-100
Technische Daten			
Drehzahl [U min⁻¹]	2850	9512	5300
Trommel Ø [mm]	400	220	200
Zentrifugalkraft [g]	1816	11130	3140
Antriebsleistung [kW]	2,6	3,7	7,5 (Hauptantrieb), 3,0 (Nebenantrieb)
Versuchsparameter			
Durchsatzleistung [L h⁻¹]	200 – 250	350 – 1800	225 – 300
Betriebsweise	diskontinuierlich	kontinuierlich	kontinuierlich
Erscheinung Klarlauf	gelblich-grün	klar	grünlich
			
Erscheinung Produkt	konsistente Masse, ca. 23 – 25 % TS	fließfähige Masse nach Rühren, ca. 15 % TS	fließfähige Masse, ca. 5 – 10% TS
Ausbeute (ca.)	Fast vollständig, mindestens 95%, fast unabhängig der Ansatzgröße	Fast vollständig, mindestens 95%, fast unabhängig der Ansatzgröße	Viel Verlust in der Trommel, ca 80% bei 1 m ³ , bei mehreren m ³ Verluste entsprechend geringer da der Verlustanteil in der Trommel gleich bleibt

	Heine Vollmantel-zentrifuge	Alfa Laval Separador Clara 20	Alfa Laval Dekanter P1-100
Bewertung			
Vorteile	gute Trennung Schlamm/Klarlauf, konsistenter Schlamm mit hohem TS-Gehalt, geringe Lagerkapazität des Schlamms	sehr gute Trennung Schlamm/Klarlauf, hohe Durchsatzleistung, kontinuierliche Betriebsweise	kontinuierliche Betriebsweise
Nachteile	geringe Durchsatzleistung; diskontinuierliche Betriebsweise	weniger konsistenter Schlamm mit niedrigeren TS-Gehalten (kann je nach weiterer Applikation auch von Vorteil sein, jedoch höhere Lagerkapazität notwendig)	keine optimale Trennung Schlamm/ Klarlauf, geringe Durchsatzleistung,

Abschließend kann konstatiert werden, dass der Separator Clara 20 (Fa. Alfa Laval) von den getesteten Geräten am vielversprechendsten für die Teilentwässerung der Mikroalgensuspension war. Der Hauptgründe hierfür waren die kontinuierliche Betriebsweise sowie die hohe Durchsatzleistung. Obwohl man den vergleichsweise geringen Trockensubstanzgehalt von 15% als negativ auslegen kann, ist eine fließfähige Masse für nachgeschaltete industrielle Anwendungen (Extraktion etc.) durchaus von Vorteil.

3.2 Untersuchungen zum Zellaufschluss

Ein wichtiger Schritt in der Aufarbeitung von Algenbiomasse ist der Zellaufschluss zur Freisetzung intrazellulärer Komponenten wie Proteine und Stärke. Hierfür ist eine Aufschlussmethode notwendig, die einen hohen Aufschlussgrad von nahezu 100 % aufweist und vor allem die Produktintegrität sicherstellt. Die Methode sollte zudem auch im großen Maßstab anwendbar sein. Zum Aufschluss der Mikroalgen wurden verschiedene Methoden (Tabelle 15) untersucht und hinsichtlich ihres Aufschlussgrades verglichen.

Tabelle 15: Übersicht der getesteten Zellaufschlussmethoden.

Methode
Einfrieren/Auftauen
Osmose
Ultraschallbehandlung
Enzymatische Vorbehandlung + mechanischer Aufschluss
Hochdruckhomogenisator
Rührwerkskugelmühle

Als Maß für den Zellaufschluss wurde der Gehalt an Protein und Chlorophyll-a bestimmt, welches während des Zellaufschlusses freigesetzt wird und nach der Zentrifugation der aufgeschlossenen Algensuspension im Überstand verbleibt.

Der Aufschlussgrad wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$A = \frac{E_i - E_0}{E_{\max} - E_0}$$

mit:

A [%] – Aufschlussgrad

E_i – Extinktion untersuchte/aufgeschlossene Probe

E_0 – Extinktion unaufgeschlossene Probe

E_{\max} – maximale Extinktion

Am effektivsten war der mechanische Zellaufschluss mit dem Hochdruckhomogenisator und Rührwerkskugelmühlen. Die anderen Methoden führten nur zu einem geringen Aufschlussgrad der Mikroalgen. Mechanische Methoden zum Zellaufschluss wie Hochdruckhomogenisierung oder das Mahlen mit Rührwerkskugelmühlen werden zudem für den Einsatz im Großmaßstab bevorzugt, da sie den Vorteil einer kontinuierlichen Betriebsweise und kurzen Verweilzeiten bieten. Zudem sind die Betriebskosten gegenüber chemischen und enzymatischen Verfahren gering und eine Reinigung und Validierung ist einfach. Daher wurden diese Methoden im Folgenden genauer untersucht.

3.2.1 Hochdruckhomogenisator

Zur Untersuchung des Zellaufschlusses von *Chlorella sorokiniana* wurde ein Hochdruckhomogenisator der Firma APV/Gaulin Modell LAB40-10,0 RBF1 mit einem 5 mm CD Homogenisierventil (1stg. Hand CD081) (CD - Cell Disruption), wie in Abbildung 28 dargestellt, verwendet.



Abbildung 28: Hochdruckhomogenisator der Fa. APV/Gaulin, Modell LAB40-10,0 RBF1, zur Untersuchung des Zellaufschlusses von *Chlorella sorokiniana*.

Zur Untersuchung des Zellaufschlusses mittels Hochdruckhomogenisator wurden Algen-suspensionen verschiedener Konzentrationen (5 %, 10 %, 15 %) hergestellt und diese bei verschiedenen Drücken (500 bar, 800 bar, 1000 bar) in jeweils einem Durchlauf aufgeschlossen.

Die im Überstand der aufgeschlossenen Proben gemessenen Chlorophyll-a- und Proteinwerte sind in Abbildung 29 dargestellt.

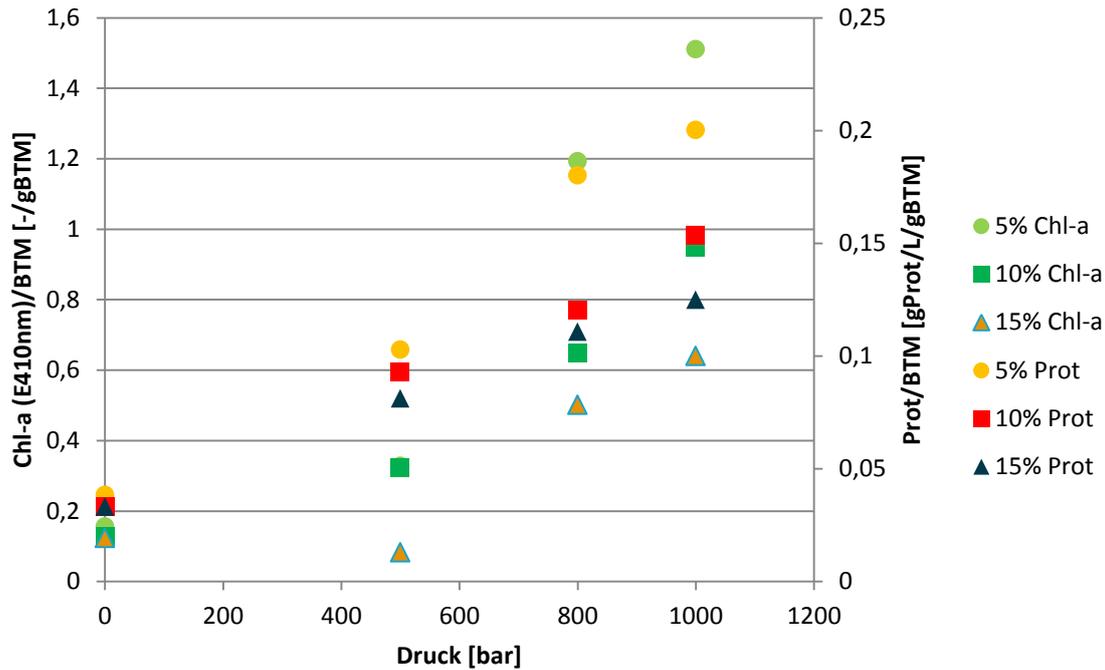


Abbildung 29: Chlorophyll-a- und Proteinkonzentrationen bezogen auf die Biotrockenmassenkonzentration im Überstand nach Zentrifugation und vorherigem Zellaufschluss im Hochdruckhomogenisator.

Wie in Abbildung 29 zu sehen ist, nahm die Chlorophyll-a bzw. Proteinkonzentration mit steigendem Druck zu. Zudem zeigte sich, dass mit abnehmender Biomassekonzentration der Zellaufschlussgrad zunahm, sodass die besten Ergebnisse mit 5 % BTM bei 1000 bar erzielt wurden.

Dies ist im Einklang mit dem spezifischen Energieeintrag E_{spez} in die Biomasse beim Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator, welcher von der Druckdifferenz Δp , der Biomassekonzentration c_{BTM} und der Passagenzahl N abhängig ist und sich nach folgender Formel berechnen lässt:

$$E_{spez} = \frac{\Delta p}{c_{BTM}} \cdot N$$

Der Energieeintrag kann somit über die Konzentration der aufzuschließenden Biomasse variiert werden. Abbildung 30 verdeutlicht diesen Zusammenhang nochmals.

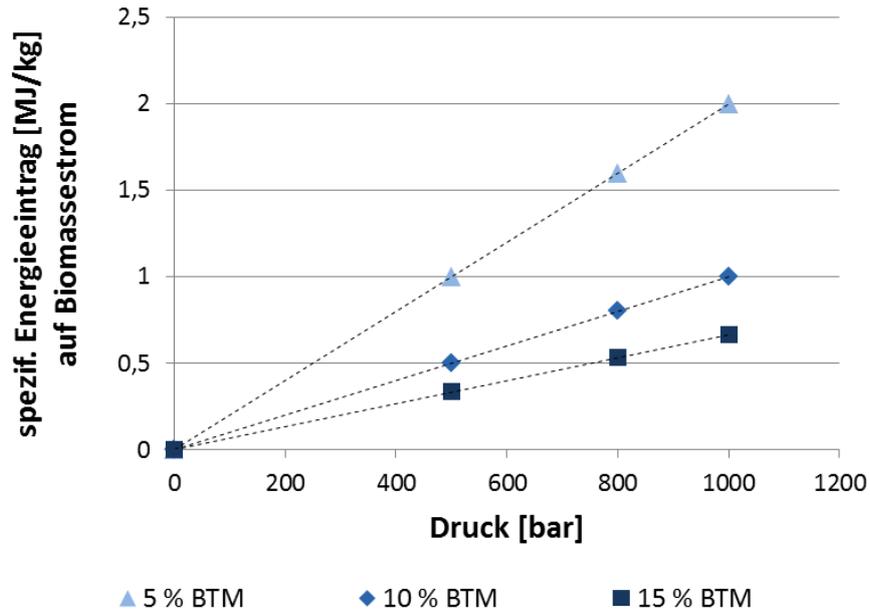


Abbildung 30: Zusammenhang zwischen dem spezifischen Energieeintrag und eingetragenen Druck bei verschiedenen Biotrockenmassekonzentrationen mit Passagenzahl N=1.

Zur Ermittlung der nötigen Passagenzahl für einen Komplettaufschluss der Zellen wurde eine Algensuspension mit 5 % BTM in mehreren Passagen aufgeschlossen und der Proteingehalt im Überstand der zentrifugierten Probe nach jeder Passage bestimmt. Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, stellte sich nach der 4. Passage ein Plateau ein. Nach Abbildung 5 entspricht dies einem spezifischen Energieeintrag von 8 MJ/kg, welcher für einen Komplettaufschluss der Algenzellen benötigt wurde.

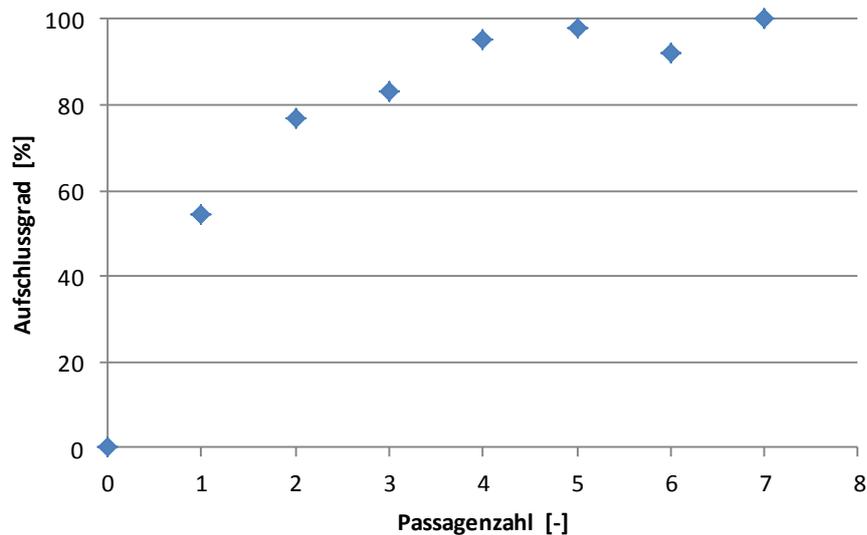


Abbildung 31: Zusammenhang zwischen Passagenzahl und Aufschlussgrad beim Zellaufschluss von *Chlorella sorokiniana* im Hochdruckhomogenisator.

3.2.2 Zellaufschluss mit Rührwerkskugelmühle

Eine weitere Möglichkeit zum Zellaufschluss im industriellen Maßstab ist die Verwendung einer Rührwerkskugelmühle. Zum Aufschluss von *Chlorella sorokiniana* wurden u.a. Versuche mit der Rührwerkskugelmühle Dyno®-Mill ML der Firma Willy Bachofen AG durchgeführt (siehe Abbildung 32).

Um die optimalen Parameter für den Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle zu bestimmen, wurden die Biomassetrockenmassekonzentration, Drehzahl, Mahlkörperfüllgrad, sowie der Mahlkörperdurchmesser variiert.

In Vorversuchen wurden die besten Aufschlussergebnisse mit kleinen Mahlkugeln erzielt. Daher wurden die Folgeversuche mit Ytt-stabilisierten Zirkonoxidkugeln mit einem Mahlkugeldurchmesser von 0,40 mm (-0,05/+0,10) durchgeführt. Dies entspricht dem kleinstmöglichen Durchmesser, der beim Modell Dyno®-Mill ML verwendet werden kann.



Abbildung 32: Rührwerkskugelmühle Dyno®-Mill ML der Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik.

Mit Design-Expert® wurde ein Response Surface/Central Composite-Versuchsplan erstellt. Es wurden die Biotrockenmassekonzentration, Drehzahl und der Mahlkörperfüllgrad entsprechend Tabelle 16 variiert. Die Versuche wurden mit Rührscheiben aus Stahl durchgeführt. Die Verweilzeit (40 s) im Mahlraum wurde über Anpassung der Pumpleistung zur Einspeisung der Biomasse in den Mahlraum konstant gehalten.

Tabelle 16: Untersuchte Variationen der Parameter für den Zellaufschluss mit der Rührwerkskugelmühle Dyno®-Mill ML.

Parameter	Variationen
Mahlkörperfüllgrad [%]	70 – 86,5
BTM [%]	2 – 15
Drehzahl [m/s]	8, 10, 14

Die Ergebnisse der Auswertung mit Design-Expert® sind in Abbildung 33 und Abbildung 34 dargestellt.

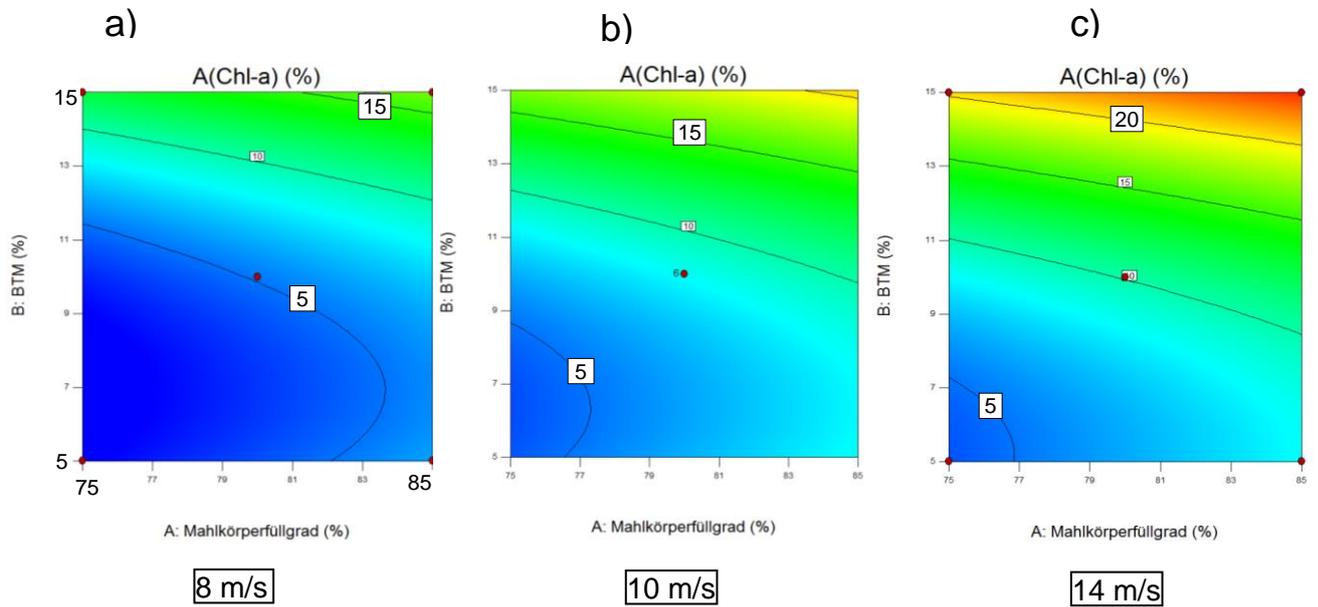


Abbildung 33: Ergebnisse des Zellaufschlusses in der Rührwerkskugelmühle Dyno®-Mill ML dargestellt als Zellaufschlussgrad Chl-a bei verschiedenen BTM-Konzentrationen, Mahlkörperfüllgraden und Drehzahlen. a) 8 m/s b) 10 m/s c) 14 m/s.

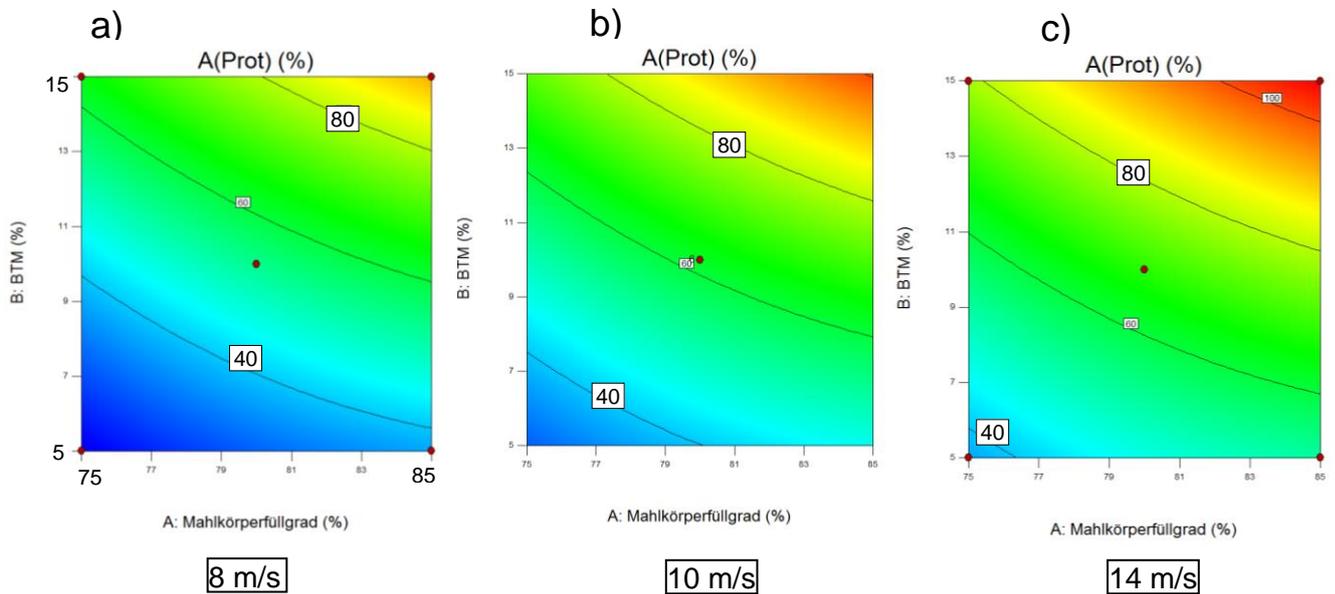


Abbildung 34: Ergebnisse des Zellaufschlusses dargestellt als Zellaufschlussgrad an löslichen Proteinen mit der Rührwerkskugelmühle Dyno®-Mill ML bei verschiedenen BTM-Konzentrationen, Mahlkörperfüllgraden und Drehzahlen. a) 8 m/s b) 10 m/s c) 14 m/s.

Die graphische Auswertung der Chlorophyll-a-Aufschlussgrade zeigt eine Zunahme des Aufschlussgrads bei Erhöhung der Drehzahl. Zudem führt die Erhöhung des Mahlkörperfüllgrads und der Biomassekonzentration zu einer Steigerung des Aufchlusses. Bei höheren Drehzahlen wird auch bei geringen Biomassekonzentrationen ein zufriedenstellender Aufschlussgrad erreicht.

Die höchsten Aufschlussgrade wurden mit 15 %igen Biomassekonzentrationen erzielt. Die Ergebnisse des Versuchs mit 18 % BTM bei 80 % Füllgrad und 10 m/s wurden aus den Modell-Berechnungen ausgeschlossen, da sich aufgrund der hohen Biomassekonzentration die Viskosität stark erhöhte. Dies führte zu einer schlechten Pumpfähigkeit und einer Druckerhöhung im Mahlraum auf den maximal zulässigen Druck von 1 bar, weswegen der Versuch vorzeitig abgebrochen werden musste.

Die graphische Auswertung der Protein-Aufschlussgrade zeigt, wie auch bei A(Chl-a), eine Zunahme des Aufschlussgrads bei Erhöhung der Drehzahl, des Mahlkörperfüllgrads, sowie der Biomassekonzentration.

Sowohl mit dem Hochdruckhomogenisator als auch mit der Rührwerkskugelmühle ist ein Komplettaufschluss der Algen möglich. Im Labormaßstab stellte sich die Rührwerkskugelmühle als vorteilhaft heraus, da durch einen separaten Kühlkreislauf die Kühlung des Mahlraums während des Zellaufchlusses gewährleistet ist und somit eine Produktschädigung durch Überhitzung ausgeschlossen werden kann. Der spezifische Energieeintrag konnte jedoch aus technischen Gründen nicht berechnet werden.

3.3 Fraktionierung von aufgeschlossener Algenbiomasse

Eine erste Fraktionierung im Anschluss an den Zellaufschluss konnte durch Zentrifugation der aufgeschlossenen Algenbiomasse für 20 min bei 17 600 g realisiert werden.

Durch die Zentrifugation entstand ein braun-grünlicher Überstand und ein Pellet bestehend aus einer grünen Schicht mit Zelltrümmern und einer weißen Schicht Stärke (Vgl. Abbildung 35).

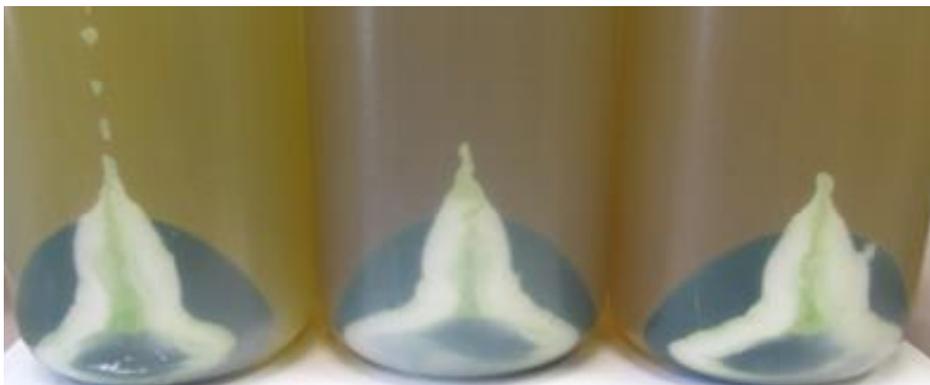


Abbildung 35: Pellets und Überstand der durch Hochdruckhomogenisierung aufgeschlossenen Algen nach Zentrifugation. Zu sehen ist ein Pellet bestehend aus einer weißen Stärke-Schicht und einer grünen Schicht mit Zelltrümmern.

AP 4 Stärkegewinnung und Vergärung zu Ethanol

Chlorella sorokiniana lagert bei Stickstofflimitierung quervernetzte Amylose-Amylopektin-Stärke als Speicherkohlenhydrat ein. Nach Aufschluss der Algen liegt eine Suspension aus löslichen und unlöslichen Proteinen, sowie gelösten Kohlenhydraten vor. Um die in den Algen enthaltene Stärkefraktion als Substrat für die Bioethanolanlage nutzen zu können, muss diese erst verflüssigt und verzuckert werden.

Ziel dieses APs war es zu analysieren, in wie weit die Stärke enzymatisch zu Glucose hydrolysiert und das Hydrolysat anschließend nach Zusatz von Hefen zur Ethanolfermentation verwendet werden kann.

4.1 Enzymatische Stärkehydrolyse und Test des Hydrolysats auf Vergärbarkeit

Zur Fermentation der in die Algenzelle eingelagerten Stärke zu Bioethanol wurde Algenbiomasse mit der Rührwerkskugelmühle aufgeschlossen. Die Ausgangsbiomasse hatte einen Trockensubstanzgehalt von 4 %. Der Stärkegehalt betrug 18 %.

In einem ersten Schritt wurde die Stärke durch die Zugabe von α -Amylase und anschließender Inkubation für 1 h bei 90°C verflüssigt. Daraufhin wurde die teilhydrolysierte Stärke durch die Zugabe von Glucoamylase und Inkubation für 2 h bei 60 °C in Glucose gespalten. Nach Abkühlen auf 30 °C wurde Hefe (Ethanol Red®) zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 41 h bei 30 °C. Proben wurden zu Beginn des Versuchs (Stunde 0), nach Inkubation mit Glucoamylase (bzw. vor Zugabe der Hefe) und nach 41 h Fermentation mit Hefe genommen. Die Proben wurden abzentrifugiert und ihr Überstand mittels HPLC analysiert. Die ermittelten Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 36 dargestellt.

Eine Übersicht der verschiedenen Schritte des Verflüssigungs- und Verzuckerungsprozesses ist in Tabelle 17 zu sehen.

Tabelle 17: Übersicht der verschiedenen Schritte des Verflüssigungs- und Verzuckerungsprozesses.

Schritt	Enzym	Temperatur [°C]	pH [-]	Zeit [h]	Probenahme	Enzym zugabe
	-		-	-	am Anfang	
Vor-Verflüssigung	α -Amylase (GC 358)	68	5.6	1	am Ende	15.1 μ L
Verflüssigung		92	5.6	1	am Ende	
Verzuckerung	Glucoamylase (Spirizyme Ultra)	65	4.6	1-3, 23	nach 1 h, 2 h, 3 h und 23 h	40.5 μ L

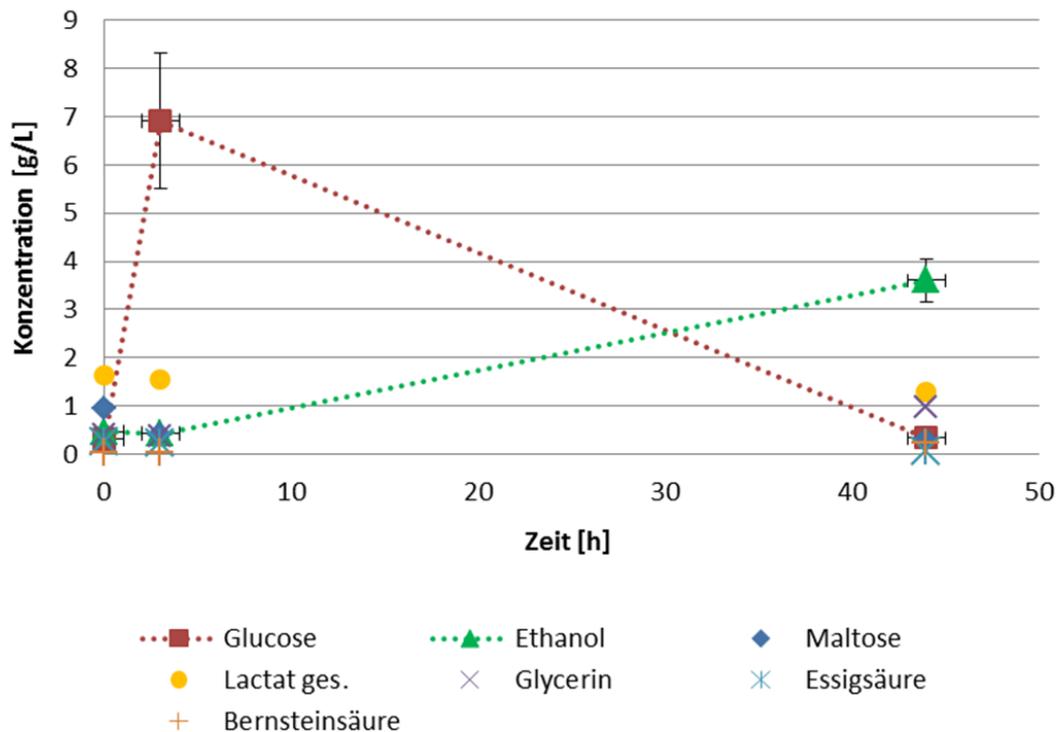


Abbildung 36: Konzentrationsverläufe verschiedener, während der enzymatischen Stärkehydrolyse und Fermentation zu Ethanol, gebildeter Produkte. Die Ergebnisse wurden durch eine HPLC-Analyse ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Versuchen mit ihrer Standardabweichung als Fehlerbalken.

Nach Aufschluss der Algen liegt eine Suspension aus löslichen und unlöslichen Proteinen, kristalliner Stärke, sowie gelösten Kohlenhydraten vor.

Bei einem Stärkegehalt der Algen von 18 % sollten 7,2 g/L Stärke bzw. nach dessen Hydrolyse 7,9 g/L Glucose in der Algensuspension enthalten sein. Nach der enzymatischen Stärkehydrolyse betrug die durchschnittliche Glucosekonzentration 6,91 g/L (\pm 87 % Ausbeute); sie nahm im Verlauf der Fermentation (41 h) auf 0,34 g/L ab. Die durchschnittliche Ethanolkonzentration betrug vor der Hefezugabe 0,43 g/L und nahm nach 41 h Fermentation auf 3,61 g/L zu. Die Glucosekonzentration nahm folglich während der Fermentation um 6,57 g/L ab. Daraus können theoretisch 3,36 g/L Ethanol entstehen. Es wurden 3,18 g/L Ethanol gebildet, was, bezogen auf die verbrauchte Menge an Glucose, einer Ausbeute von 95 % entspricht. Bezogen auf den Glucosegehalt nach der enzymatischen Stärkehydrolyse entspricht es einer Ausbeute von 90 % (Glucose 6,91 g/L \rightarrow theoret. 3,53 g/L Ethanol). Die prinzipielle Vergärbarkeit der Stärkefraktion aus Algen zu Ethanol wurde somit gezeigt.

Während in Bioethanolanlagen in der Regel noch eine Stickstoffquelle zur Fermentation hinzugesetzt werden muss, ist das im Fall der Ethanolbildung aus Kohlenhydraten der Alge nicht notwendig, da diese bereits Aminosäuren und andere Stickstoffquellen enthält.

AP 5 Proteinextraktion

Der Fokus dieses AP lag bei der Gewinnung und Nutzung verschiedener Proteinfractionen aus Algenbiomasse.

Durch Wahl geeigneter Extraktionsmedien sollte die lösliche Proteinfraction über Fest/Flüssig-Separation von unlöslichen Kohlenhydraten, partikulären Proteinen, Zellwandbestandteilen, etc. abgetrennt werden.

Partikuläre Proteine fallen in der aufgeschlossenen Algenbiomasse zusammen mit Stärke und weiteren Kohlenhydraten als unlösliche Fraction an. Die Isolierung der partikulären Proteine ist beispielsweise durch Fest-Flüssig-Abtrennung nach enzymatischer Verflüssigung der Kohlenhydrate/Stärke möglich. Ein weiterer Ansatz ist, lösliche Peptide und/oder Aminosäuren durch enzymatische Proteolyse freizusetzen. Die gewonnenen Proteinfractionen können als Fermentationsnährmedium genutzt werden.

Abbildung 37 zeigt ein mögliches Verfahrensschema zur Gewinnung der verschiedenen Proteinfractionen.

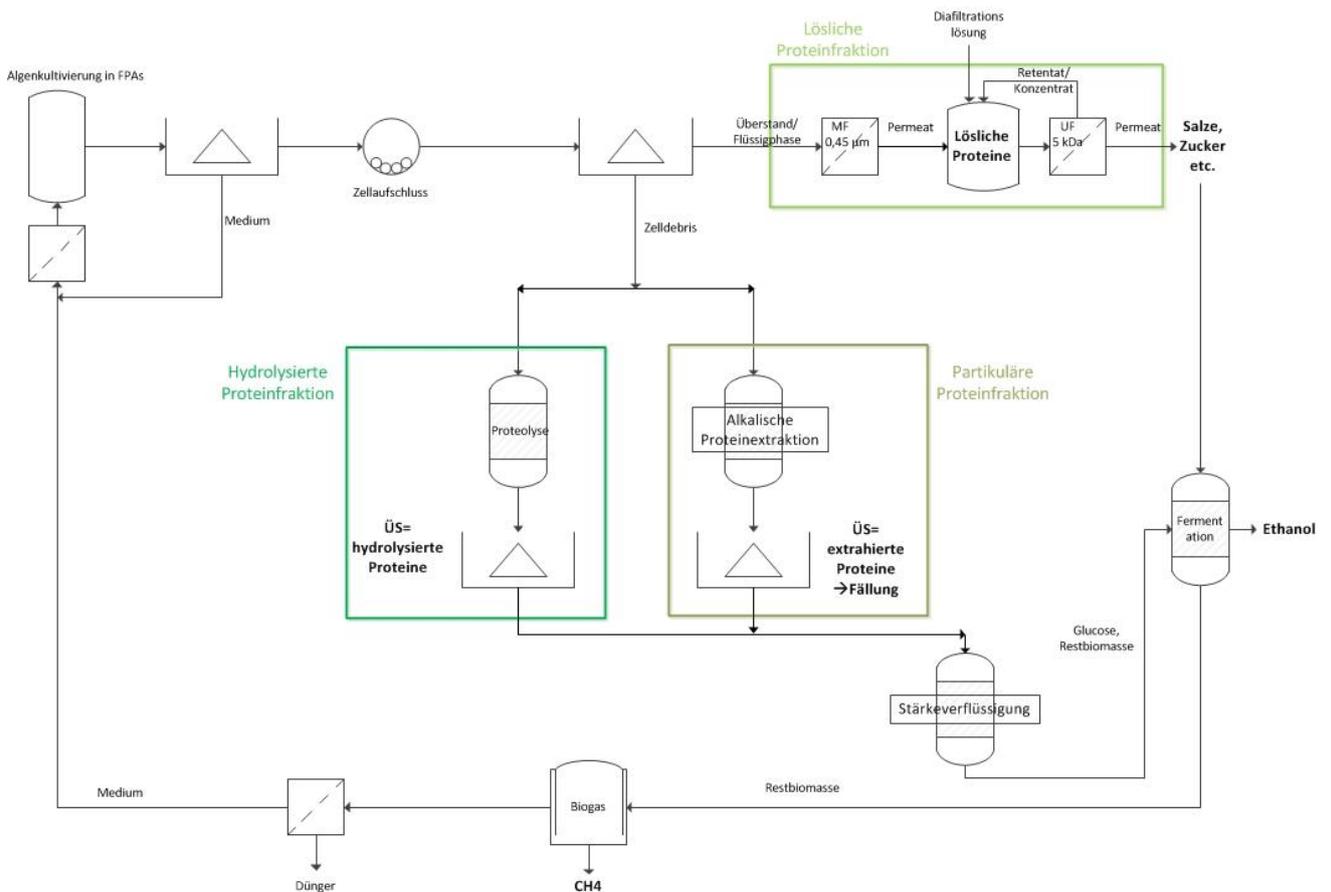


Abbildung 37: Verfahrensschema zur Gewinnung verschiedener Proteinfractionen.

5.1 Gewinnung der löslichen Proteinfraktion

Ziel dieses Arbeitspakets war die Isolierung und Aufreinigung löslicher Proteinfractionen aus aufgeschlossener Algenbiomasse.

Hierzu wurde Algenbiomasse im Hochdruckhomogenisator bei 1000 bar komplett aufgeschlossen und anschließend bei 17 600 g für 20 min in einer Becherzentrifuge (Sorvall RC 6+) zentrifugiert. Lösliche Proteine liegen nach dem Zellaufschluss und anschließender Fest/Flüssigtrennung im Überstand vor. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über Membranfiltrationen. Abbildung 38 gibt eine Übersicht über die einzelnen Aufreinigungsschritte zur Gewinnung der löslichen Proteinfraction.

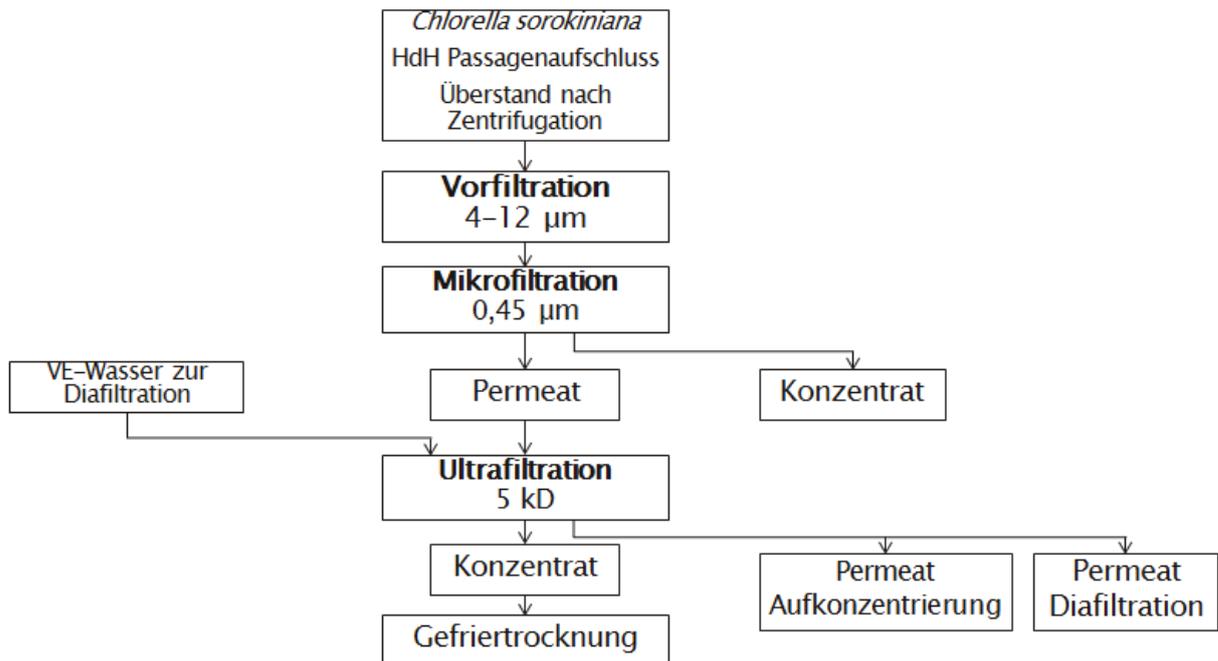


Abbildung 38: Übersicht des Verfahrensschemas zur Gewinnung löslicher Algenproteine.

In einem ersten Schritt wurde der Überstand nach der Fest/Flüssigtrennung mittels Vakuumfiltration (4-12 µm Filter) vorfiltriert um größere Feststoffpartikel abzutrennen. Anschließend wurde das Permeat über eine Mikrofiltration mit der Sartorius Filteranlage Sarto Jet mit einem Plattenmodul mit 0,45 µm filtriert (siehe Abbildung 39), um mögliche mikrobielle Kontaminationen zu entfernen.

Das Permeat der Mikrofiltration konnte mit einer 5 kD-Membran aufkonzentriert werden und anschließend unter Zugabe von VE-Wasser diafiltriert werden, um vorhandene Salze zu entfernen. Das gewonnene Konzentrat wurde daraufhin gefriertrocknet.

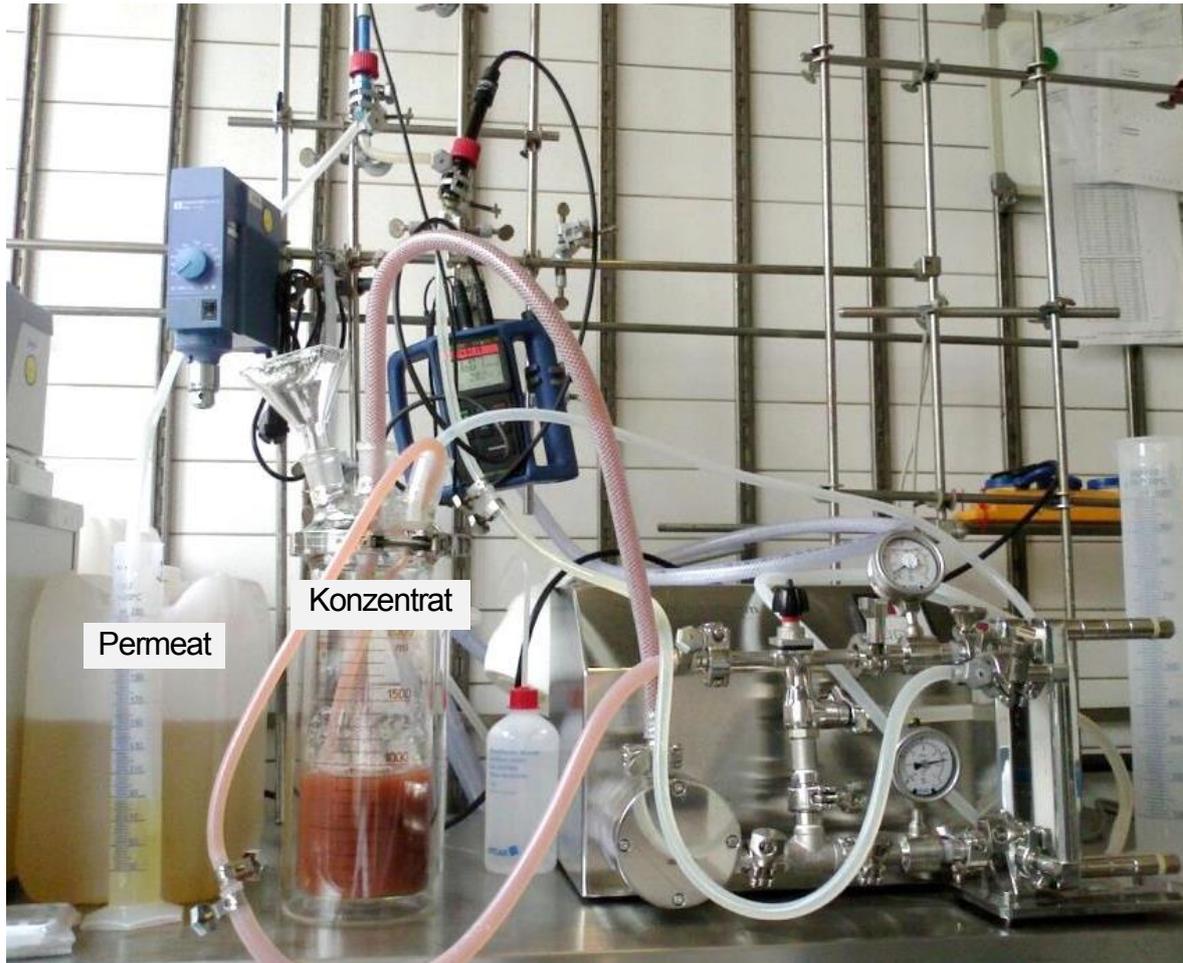


Abbildung 39: Versuchsaufbau zur Fraktionierung löslicher Proteine mittels Membranfiltration



Abbildung 40: gefriergetrocknete, lösliche Proteinfraction

Abbildung 40 zeigt die gefriergetrocknete lösliche Proteinfraction. Die Proteinkonzentration des Endproduktes wurde mittels Kjeldahl-Gesamtstickstoff-Analyse bestimmt und mit dem Faktor 6,25 multipliziert, um den Proteingehalt der Probe zu erhalten. Dieser betrug 61 %. Des Weiteren waren 21 % gebundene Kohlenhydrate, 3 % freie Kohlenhydrate, <0,1 g/kg Rohfett im Endprodukt enthalten (siehe Abbildung 41).

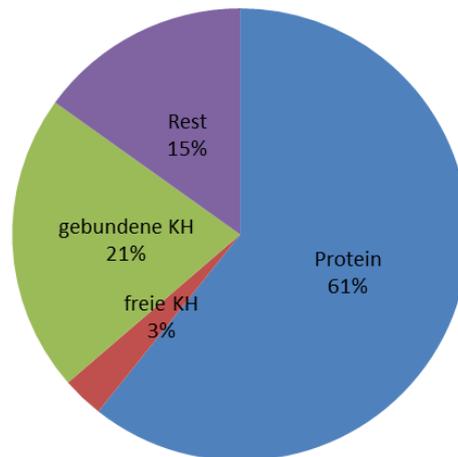


Abbildung 41: Zusammensetzung der gefriergetrockneten Proteinfraction nach Aufreinigung über Membranfiltrationen.

5.2 Gewinnung der partikulären Proteinfraction / Gewinnung partikulärer Proteine und Proteinhydrolysate

Partikuläre Proteine fallen in der aufgeschlossenen Algenbiomasse zusammen mit Stärke und weiteren Kohlenhydraten als unlösliche Fraktion an. Algenproteine können mit klassischen Lösemitteln oder über enzymatische Methoden extrahiert werden. Klassische Methoden nutzen die Zersetzung der Algen unter reduzierenden Bedingungen in Alkali. Die löslichen Proteine können daraufhin über eine Säurepräzipitation bei niedrigem pH von den Kohlenhydraten getrennt werden. Starke Laugen wirken sich jedoch auf den Zellinhalt aus und können zur Aufspaltung von Proteinen und anderer wertvoller Zellbestandteile führen. Eine mildere Alternative zur klassischen Methode mit NaOH ist die enzymatische Extraktion von Proteinen aus Algen.

5.2.1 Alkalische Protein-Extraktion des Pellets und Fällung der extrahierten Proteine

Zur Extraktion der partikulären Proteine wurde im ersten Schritt *Chlorella sorokiniana* im Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Die aufgeschlossene Algensuspension wurde zentrifugiert, um die löslichen Proteine abzutrennen und das Pellet wurde in VE-Wasser resuspendiert (siehe 5.1).

Um die Abhängigkeit der Menge an extrahiertem Protein vom pH-Wert zu analysieren, wurde die Algensuspension auf pH-Werte von 3-12 mit HCl bzw. NaOH eingestellt. Die Ansätze wurden für 4 h bei 50°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Proteingehalt im Überstand wurde mittels Lowry bestimmt (siehe Abbildung 42).

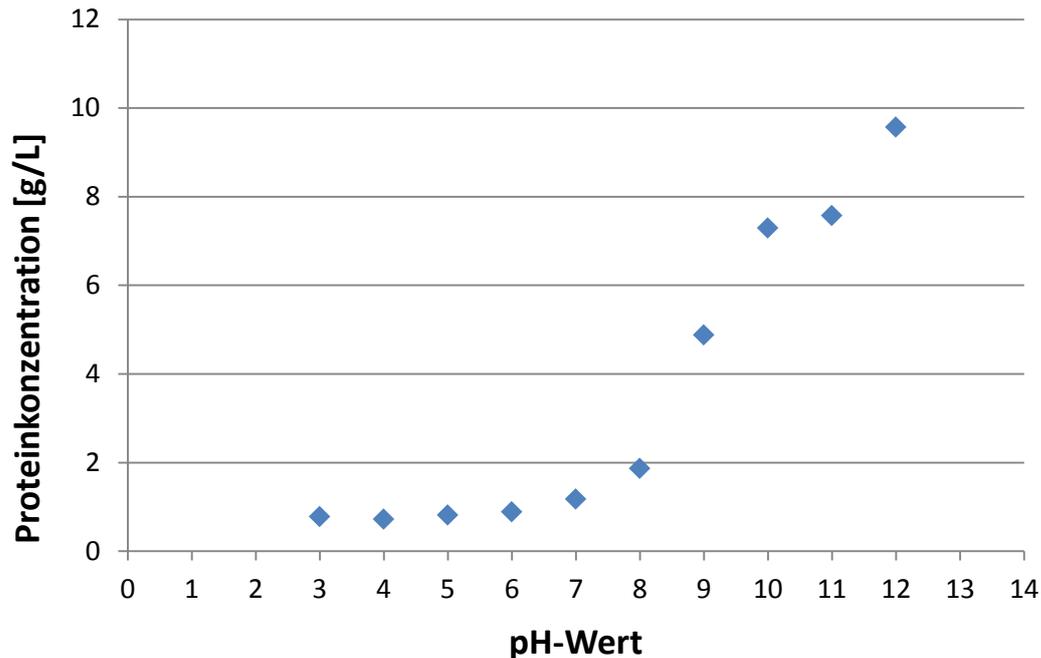


Abbildung 42: Proteinkonzentrationen [g/L] im Überstand nach Inkubation aufgeschlossener Algenbiomasse (Pellet) bei verschiedenen pH-Werten (bestimmt mit Lowry-Methode).

Mit zunehmendem pH-Wert steigt die Proteinkonzentration im Überstand ab pH 7 stetig auf einen Maximalwert von 9,56 g/L bei pH 12 an.

Zur Berechnung der prozentual extrahierten Proteinmenge an der Gesamtmenge wurde der Gesamtstickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt. Die Algenbiomasse hatte einen Stickstoffgehalt von 105 g/kg. Bei der Berechnung des Proteingehalts der Algensuspension mit dem Faktor 6,25, ergibt sich eine maximale Proteinkonzentration von 26,26 g/L. Dies bedeutet, dass eine Proteinausbeute bei der alkalischen Extraktion bei pH 12 von 36 % erzielt wurde. In der Literatur wird jedoch häufig berichtet, dass der gängige Faktor von 6,25 für Algen zu hoch ist (Barbarino et al., 2005), was zu einer Überschätzung des Proteingehalts führen kann und in unserem Fall zu einer unterschätzten Proteinausbeute der alkalischen Extraktion.

Zur Optimierung der alkalischen Extraktion wurde in weiteren Versuchen neben dem pH-Wert der Einfluss der Temperatur und Extraktionszeit untersucht. Hierzu wurden Proteinextraktionen bei pH 9 – 13 und Temperaturen von 30 °C, 45 °C, 60 °C und 80 °C untersucht.

Die Gesamtlaufzeit jedes Versuchs betrug 5 Stunden. Die Probennahme erfolgte stündlich. Die entnommenen Proben wurden für 10 min bei 17 600 g zentrifugiert und auf ihren Proteingehalt nach Lowry untersucht. Die Ergebnisse wurden mit Design Expert über eine Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und sind in Abbildung 43 und Abbildung 44 dargestellt.

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Original Scale
 Proteinkonz. (g/L)
 ● Design Points
 17.8128
 6.75597

X1 = C: Zeit
 X2 = B: Temperatur

Actual Factor
 A: pH = 12

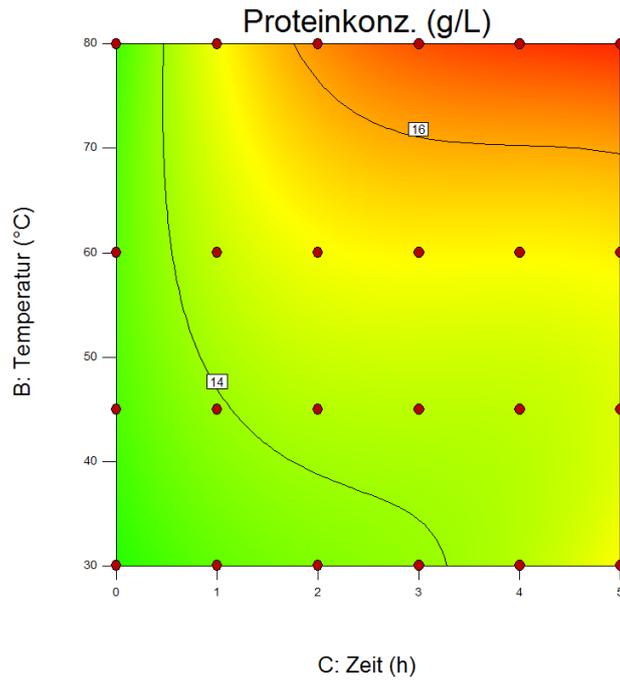


Abbildung 43: Einfluss der Temperatur auf die alkalische Proteinextraktion bei pH 12 im Verlauf von 5 h.

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Original Scale
 Proteinkonz. (g/L)
 ● Design Points
 17.8128
 6.75597

X1 = A: pH
 X2 = B: Temperatur

Actual Factor
 C: Zeit = 5

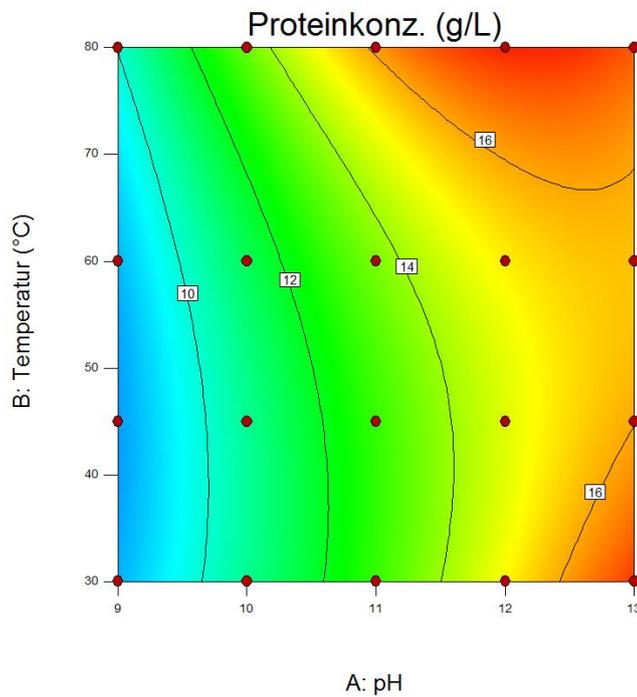


Abbildung 44: Einfluss der Temperatur und des pH-Werts auf die Proteinextraktion (zum Zeitpunkt 5 h).

Die Ergebnisse der Optimierungsversuche bestätigen die starke pH-Abhängigkeit der Proteinextraktion. Ab einem Zeitpunkt von 2 h erhöht sich die Proteinkonzentration nur noch geringfügig. Eine Temperaturerhöhung führte zu einer leichten Steigerung der Proteinextraktion, jedoch besteht bei hohen Temperaturen die Gefahr der Hydrolyse der Proteine, weswegen eine alkalische Extraktion bei pH 12 und 30 °C für 2 h als Optimum festgelegt wurde.

Die Aufkonzentrierung der extrahierten Proteine wurde über eine pH-Fällung untersucht.

Hierzu wurde eine alkalische Extraktion des Pellets bei pH 12 und 30 °C für 2 h durchgeführt und anschließend bei 17.600 g für 30 min zentrifugiert. Die extrahierten Proteine liegen hierbei im Überstand vor. Zur Fällung der Proteine wurde der Überstand in separaten Ansätzen auf pH-Werte von 2,5 bis 7 eingestellt, für 30 min inkubiert und daraufhin für 15 min bei 17.600 g zentrifugiert. Zur Analyse der Proteinfällung wurde die Proteinkonzentration im Überstand nach Lowry bestimmt.

Aus den Proteinwerten der Fällung in Bezug auf die Nullprobe nach der Inkubation wurde errechnet, durch welchen pH-Wert der Anteil gefällten Proteins am höchsten ist (siehe Abbildung 45).

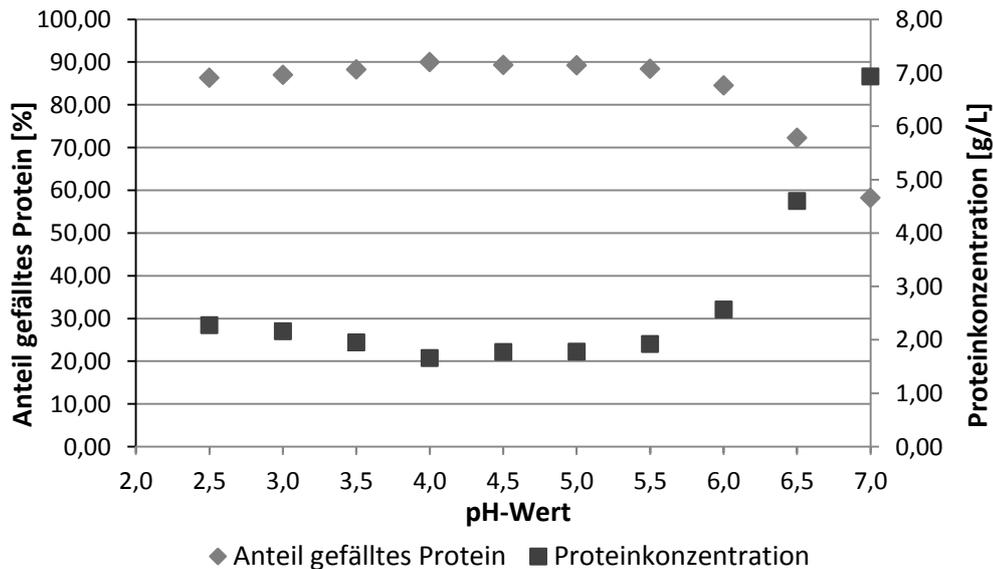


Abbildung 45: Proteinkonzentration und Anteil gefälltes Protein in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Die Fällung der Proteine geschieht im sauren Milieu über einen weiten pH-Bereich. Das Maximum wurde bei pH 4 erzielt. Hier wurden 90 % der Proteine gefällt. Eine auf diese Weise gewonnene partikuläre Proteinfraktion wurde zweimal mit VE-Wasser gewaschen, um den Salzgehalt zu reduzieren, anschließend gefriergetrocknet und die Zusammensetzung analysiert.

Das gefriergetrocknete Produkt ist in Abbildung 46 zu sehen. Wie man Abbildung 47 entnehmen kann, enthält es 62 % Proteine, 26 % Rohfett und 0,49 % Asche.



Abbildung 46: Gefriergetrocknetes Produkt nach alkalischer Extraktion der partikulären Proteine bei pH 12 und Fällung bei pH 4 mit anschließender Zentrifugation für 30 min bei 17.600 g

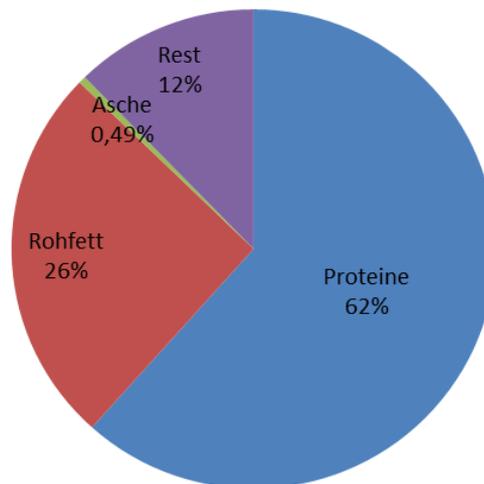


Abbildung 47: Zusammensetzung der durch Extraktion bei pH 12 gewonnenen partikulären Proteinfraction.

5.2.2 Enzymatische Proteingewinnung

Da partikuläre Proteine in der Alge häufig mit anderen Zellbestandteilen verknüpft sind (Membranen, Stärke) wurde versucht, durch Zusatz verschiedener Proteasen diese Bindungen zu spalten und so ggfs. partikuläre Proteine in den löslichen Überstand zu überführen. Kommerziell erhältliche Proteasen mit unterschiedlichen Selektivitäten und Spezifitäten wurden getestet und der Einfluss der Enzymdosierung auf die Freisetzung der Proteine untersucht.

Proteasen sind Enzyme, welche katalytisch die hydrolytische Spaltung von Peptiden begünstigen und somit die Basis für den Abbau von Proteinen bilden. Sie können unter anderem in Exoproteasen und Endoproteasen eingeteilt werden. Exoproteasen spalten einzelne Aminosäuren an den Enden eines Proteins bzw. Peptids ab, wohingegen Endoproteasen unspezifisch innerhalb eines Proteins/Peptids die Peptidbindungen spalten. Im Enzym-Screening zur Gewinnung von Proteinen aus aufgeschlossener Algenbiomasse

wurden verschiedene Endoproteasen getestet. Tabelle 18 gibt eine Übersicht über die getesteten Endoproteasen.

Tabelle 18: Verwendete Proteasen und ihre Spezifikationen.

Name	Hersteller	pH-Stabilität	pH-Optimum	Temp. Stabilität	Temp. Optimum	Einsatzmenge [% bez. auf Proteingehalt der Algensuspension]
Corolase H-pH	AB Enzymes	7-11	10	bis 65	60	0,1 - 1,5
Alcalase 2,4L FG	Novozymes	7-9	8	30-65	60	0,5 - 2
Izyme G	Novozymes	5-10	7,5-10	55-60	60	0,2 - 2
Multifect PR 6L	Du Pont	7,0 - 10	9,5	25-70	60	0,25 - 2
Optimase PR 40E	Du Pont	7,0- 12	8,6	35- 65	60	0,2 - 2
Optimase PR 40X	Du Pont	8,0- 12	11	40-70	65	0,2 - 2
Optimase PR 40L	Du Pont	7,0- 12	8,6	40-70	65	0,2 - 2
Izyme B	Novozymes	3-11	8-11	65-70		0,25 - 1
Proteinase T	DuPont		7,50		50	0,2 -2
Neutralase 0,8 L	Novozymes		7,00	40-50 °C		0,2 - 2
Multifect Neutral	DuPont	6 - 8	7,00	40-60 °C		0,2 -2

Zur Versuchsdurchführung wurde eine 5% ige Suspension aufgeschlossener Algenbiomasse hergestellt und mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen versetzt. Die Versuche fanden beim jeweiligen pH- und Temperaturoptimum der Enzyme statt. Nach Inkubation für 2 h wurden die Ansätze für 10 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzt, um die Enzyme zu inaktivieren und anschließend die Proben jeweils 2x 10 min bei 12000 g zentrifugiert.

Zur Evaluierung der Hydrolyse wurde der Lowry-Proteingehalt und Hydrolysegrad im Überstand der zentrifugierten Probe bestimmt. Die Bestimmung des Hydrolysegrades erfolgte mittels OPA-Assay. Bei der Hydrolyse von Peptiden entsteht pro hydrolytischer Spaltung eine freie α -Aminogruppe. Diese kann durch ortho-Phthaldialdehyd (OPA) komplexiert und spektroskopisch bei $\lambda=340$ nm quantifiziert werden. Der Hydrolysegrad (DH) ist ein Maß für die Anzahl der gespaltenen Peptidbindungen. Durch ihn lässt sich der Prozentsatz an gespaltenen Peptidbindungen bestimmen.

In Abbildung 48 sind beispielhaft die Ergebnisse der enzymatischen Proteinextraktion mit Alcalase bei pH 8 nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 60 °C dargestellt. Die höchste Proteinkonzentration von 11,3 % wurde bei einer Enzymkonzentration von 2 % (bezogen auf Proteingehalt der Algensuspension) erreicht. Alcalase bewirkte eine Steigerung der Proteinkonzentration um 6,6 g/L bezogen auf die Proteinkonzentration, welche sich durch entsprechende pH-Wert-Anpassung ohne Enzymzugabe einstellte.

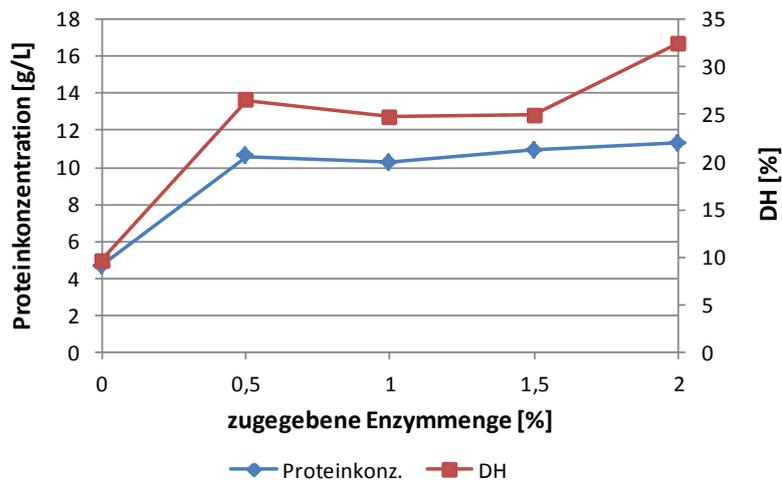


Abbildung 48: Proteinhydrolyse bei verschiedenen Alcalase-Konzentrationen, pH 8, 60 °C.

In Tabelle 19 sind die Ergebnisse des Enzym-Screenings zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigen die Steigerung der Proteinkonzentrationen im Überstand bezogen auf die Proteinkonzentration, welche sich durch entsprechende pH-Wert-Anpassung ohne Enzymzugabe einstellte.

Tabelle 19: Steigerung der Proteinkonzentrationen in g/L durch Wirkung der verschiedenen Enzyme.

Enzym	Proteinkonzentration [g/L]
Alcalase, pH 8	6,6
Multifect Neutral, pH 7	6,0
Proteinase T, pH 7,5	5,2
Optimase PR 40L, pH 8,6	4,6
Corolase, pH 10	4,0
Neutrase 0,8 L, pH 7	3,7
Optimase PR 40E, pH 8,6	3,3
Optimase PR 40X, pH 11	2,2
Multifect PR 6L, pH 9,5	1,7
Izyme G, pH 8	1,4
Izyme B, pH 9	1,3
Optimase PR 40X, pH 9	0,2

Es konnten drei verschiedene Proteinfractionen gewonnen werden. Eine lösliche Proteinfraction, welche sich nach dem Zellaufschluss und anschließender Fest-/Flüssigtrennung im Überstand befindet, konnte mit Hilfe von membranbasierten Trenntechniken aufgereinigt und aufkonzentriert werden. Das gefriergetrocknete Endprodukt enthielt 61 % Protein, 21 % gebundene Kohlenhydrate, 3 % freie Kohlenhydrate und <0,1 g/kg Rohfett.

Partikuläre Proteine konnten zum einen über eine alkalische Hydrolyse bei pH 12 und 30°C für 2 h und anschließender Säurefällung des Überstands bei pH 4 gewonnen werden. Das gefriergetrocknete Produkt enthielt 62 % Proteine, 26 % Rohfett und 0,49 % Asche.

Zum anderen war es möglich partikuläre Proteine durch eine Behandlung mit Enzymen zu gewinnen. Hierbei wurden die höchsten Proteinausbeuten mit Alcalase (pH 8), Multifect Neutral (pH 7) und Proteinase T (pH 7,5) erzielt.

AP 6 Vergärung der Reststoffe zu Biogas

Um den Stoffkreislauf von Stickstoff und Phosphat zu schließen wurden die Reststoffe aus der Ethanolfermentation zu Biogas vergoren. Der so entstehende Flüssiggärrest kann als Medienbestandteil für die Algenkultivierung verwendet werden (siehe Kapitel 2.1).

6.1 Vergärung von Klarschlempe zu Biogas

Klarschlempe wurde von CropEnergies (Zeit) zur Verfügung gestellt und am 22.8.14 dort abgeholt. Die von CropEnergies gelieferten Analysen sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Daten zur Schlempe vom 22.8.14, die von Crop Energies ermittelt wurden.

Parameter	Einheit	22.08.2014 Freitag
TSg	g/100g	12,0
TSg Überst.	g/100g	8,7
Dichte	g/cm ³	
pH		3,7
Viskosität	mPa	154
Viskos.250	mPa	35
Dextrine	g/l	
Dextrine DP3	g/l	6,8
Maltose	g/l	2,4
Glucose	g/l	0,3
Fructose	g/l	0,9
Bernsteinsr.	g/l	0,9
Milchsäure	g/l	2,2
Glycerin	g/l	13,7
Essigsr.	g/l	0,74
2,3Butandiol	g/l	2,07
Ethanol	g/l	1,35
Buttersäure	g/l	0,00

Die Schlempe wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen in 1-Liter Biogasreaktoren anaerob vergoren. Dabei wurden 3 g oTR (entspricht 26,25 g Schlempe) pro Reaktor verwendet. Dabei ergab sich folgende Kurve der gebildeten Gasmenge:

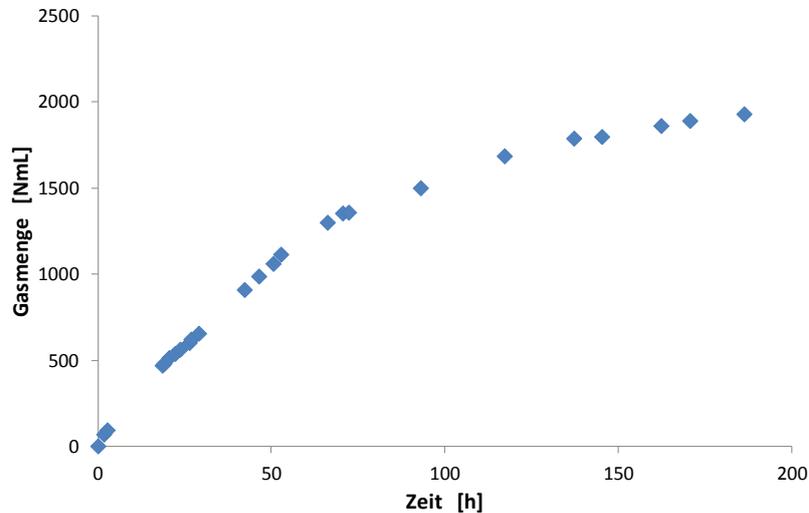


Abbildung 49: Gebildete Gasmenge während der anaeroben Vergärung von Schlempe im 1-Liter Biogasreaktor.

Es wurden insgesamt 672 NmL Gas pro Gramm oTR gebildet. Dabei bestand das gebildete Gas zu 54 % aus Methan und zu 46 % aus CO₂. Die Veränderung von einigen Parametern bezüglich des Abbaus ist in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Bilanzierung von Parametern während der anaeroben Vergärung

	Start [mg/L]	Ende [mg/L]	Differenz [mg/L]
Gesamtstickstoff	1013	742	-271
CSB	2540	1190	-1350
DOC	1015,1	296,5	-719
NH ₄ -N	724	765	41
NH ₄	931	984	53
PO ₄ -P	81	112	31
PO ₄	248	343	95

Der Abbau der Schlempe ist über die sinkenden Werte des CSB, DOC und Gesamtstickstoffs nachzuweisen. Für die Algenkultivierung sind vor allem der Ammoniumgehalt und das Verhältnis von N:P (hier: 6,8:1) von Bedeutung. Die Werte liegen hier in einem optimalen Bereich für die Nutzung des Gärrests als Nährstoffquelle für die Algenkultivierung.

Es wurden keine Versuche zur Vergärbarkeit der Schlempe vermischt mit Algenreststoffen durchgeführt, da die Algenreststoffe im Verhältnis zur Schlempe wenige Prozent des

Substrats stellen würden. Somit wäre die Vergärung vor allem von der Schlempe abhängig und die Algenreststoffe hätten keinen entscheidenden Einfluss auf den Prozess.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Schlempe ein gutes Substrat für die anaerobe Vergärung zu Biogas ist, ein Nebenprodukt dieser Gärung ist der flüssige Gärrest, der aufgrund seiner Zusammensetzung als gutes Substrat für die Algenkultivierung genutzt werden kann.

AP 7 **Aufbau und Betrieb der Pilotanlage**

In AP 1 wurde bereits ein erster Scale-Up bis zum 28-L FPA-Reaktor im Freiland durchgeführt. Zur Darstellung der Versuchsergebnisse in technisch relevanter Größe wurde auf dem Gelände von CropEnergies in Zeitz eine Pilotanlage mit 24 FPA-Reaktoren mit je 180 Liter Volumen aufgebaut und anschließend für 2 Vegetationsperioden betrieben.

7.1 **Aufbau und Inbetriebnahme der Pilotanlage bei CropEnergies in Zeitz**

Der Aufbau der Anlage erfolgte von April bis Juli 2014. Die Endabnahme und Inokulation der Anlage erfolgte im August 2014. Kultivierungen erfolgen unter Verwendung von $\text{G}\text{-CO}_2$ und der thermotoleranten Grünalge *Chlorella sorokiniana* SAG 211-8k. Die Anlage bestand aus vier Linien mit jeweils sechs gekoppelten 180 L FPA-Photobioreaktoren. Das Kultivierungsvolumen der Anlage betrug somit 4,3 m³. Abbildung 50 zeigt eine schematische Darstellung der etablierten Freilandanlage, Abbildung 51 eine Fotografie nach der Inokulation mit *C. sorokiniana* SAG 211-8k. Die linieninterne Kopplung betraf die Medien- (flüssig und gasförmig), Ernte- und Abluftleitungen. Alle Reaktoren innerhalb einer Linie wurden somit mit identischem flüssigem und gasförmigem Medium versorgt. Die Ausrichtung der Anlage erfolgte entlang der Ost-West-Achse, folgerichtig waren die Reaktoroberflächen nach Norden bzw. Süden ausgerichtet, um maximale Lichtpenetration zu gewährleisten. Der Antrieb bzw. die Durchmischung der Reaktoren erfolgte über das Belüften mit einem Luft-Gärgas-Gemisch. Eine entsprechende Mischstation, bestehend aus MFCs für Luft und Gärgas, diente dazu, die beiden Komponenten gemäß dem geforderten Konzentrationsverhältnis zu mischen und in den gewünschten Mengen für die Algenproduktion bereitzustellen. Medienpumpen sowie diverse Flüssigkeitsfilter vervollständigten, zusammen mit Behältern zur Bereitstellung des Mediums und zum Lagern der geernteten Algenbiomasse, die technische Grundausstattung einer Linie. Die Anlage verfügte über eine rechnergestützte Prozesssteuerung. Sie war teilautomatisiert und verfügte über einige prozessrelevante Überwachungs- und Regelvorrichtungen. Jeweils der erste Reaktor einer Linie war mit Stutzen für pH-, TS- und Temperaturmessung ausgestattet. Alle drei Messgrößen wurden erfasst und im Datenspeicher des Bedienpanels abgelegt. Die Lichtintensität (Photonenflussdichte) wurde im Bereich der photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR, 400 nm – 700 nm) sowohl horizontal als auch vertikal (Sensorausrichtung nach Süden) gemessen und gespeichert. Die Temperaturmessung steuerte die Temperaturkontrolle der FPA-Reaktoren mittels evaporativer Kühlung. Zudem war die

Zufuhr von frischem Medium über einen Grenzstandsensor gesteuert. Die Ventile sowie die Pumpen konnten automatisch (nach Grenzstand oder Zeitintervallen) oder manuell geschaltet werden. Die Medienzufuhr der Linien 1 und 2 konnte durch pneumatische Ventile manuell, aber auch automatisch über die zentrale Steuereinheit, bewerkstelligt werden. Die Linien 3 und 4 waren mit Kugelhähnen ausgestattet und konnten ausschließlich manuell betrieben werden. Folgende Prozesse konnten automatisch gefahren werden: Steuerung des CO₂-Volumenstroms (nach vorgegebenem pH-Wert), Steuerung der Erntezyklen (Linie 1 und 2) und die Kühlung der Reaktoren. Die Kühlung erfolgte über eine Berieselungsvorrichtung, die aus einer bauseits vorhandenen Zisterne gespeist wurde. Von den Reaktoren abtropfendes Wasser wurde in den unter den FPAs befindlichen Rinnen aufgefangen und floss zurück in die Zisterne. Reichte das in der Zisterne gesammelte Regenwasser nicht aus, wurde sie automatisch mit Prozesswasser nachgespeist. Der Betrieb der Anlage erfolgte von August bis Oktober 2014 sowie von März bis Juli 2015. Neben einem witterungsbedingten Winterstillstand konnte dementsprechend die Kultivierung von *C. sorokiniana* SAG 211-8k im Jahresverlauf dargestellt werden. DSN fungierte als Kultivierungsmedium. Der pH-Wert wurde zwischen 6,5 und 7,0 geregelt und die Maximaltemperatur mittels evaporativer Kühlung auf 38°C begrenzt. Die Begasungsrate betrug 0,14 vvm.

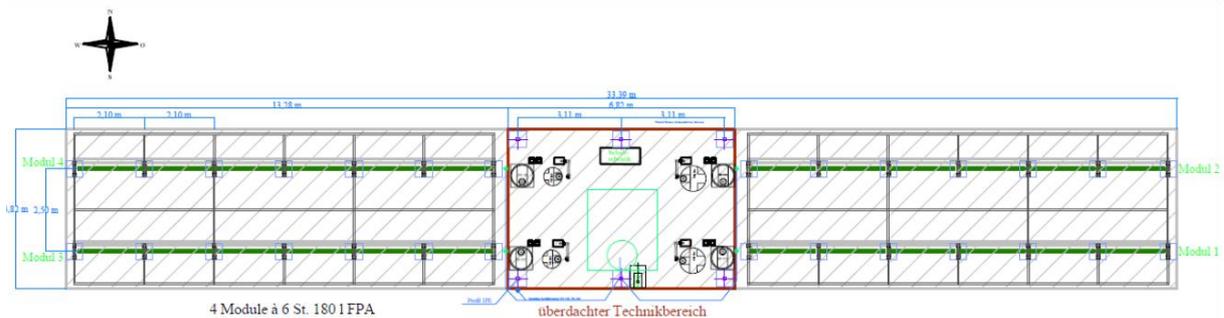


Abbildung 50: Schematische Darstellung der Freilandanlage bestehend aus vier Linien mit jeweils sechs 180 L FPA-Photobioreaktoren zur Kultivierung phototropher Mikroorganismen.



Abbildung 51: Freilandanlage bestehend aus vier Linien mit jeweils sechs 180 L FPA-Photobioreaktoren zur Kultivierung phototropher Mikroorganismen nach Inokulation mit *C. sorokiniana*.

7.2 Übertragung der optimierten Parameter aus AP1 auf die Pilotanlage

In AP1 kristallisierte sich die Nutzung der Grünalge *C. sorokiniana* SAG 211-8k für die Stärkeproduktion heraus. Grund hierfür war die hohe Produktivität, die Robustheit gegenüber Umwelteinflüssen wie Temperatur- und Lichtschwankungen sowie der hohe zu erreichende Stärkegehalt bei hoher Produktivität der Stärkeformation. Bei der Übertragung der Ergebnisse aus AP 1 in den Pilotmaßstab galt es sowohl biologische Resultate (Wachstum und Stärkeproduktion) als auch technische Aspekte (online Sensorik) umzusetzen.

7.2.1 Wachstum und Stärkeproduktion

Chlorella sorokiniana SAG 211-8k wurde im Technikumsmaßstab am Standort der CropEnergies AG in Zeitz kultiviert, um Inokulum für die Pilotanlage zu generieren. Letztere wurde erstmalig am 22.08.2015 inokuliert (Linie 2). Innerhalb von 6 Tagen verdoppelte sich die Biomasse von 1,0 auf 2,0 g L⁻¹. Daraufhin wurde am 05.09.2015 die Linie 1 mit 50% des Volumens der Linie 2 inokuliert. Wiederum nach 6 Tagen stieg die Biomassekonzentration in Linie 1 von 1,2 auf 3,0 g L⁻¹ und in Linie 2 auf von 1,2 auf 2,6 g L⁻¹ an. Am 11.09.2014 wurde erneut 50% des Volumens beider Linien zur Inokulation der Linien 3 und 4 verwendet. Die Wachstumsverläufe aller Linien im Jahre 2014 sind in Abbildung 52 bis Abbildung 55 unter Nennung ausgewählter Produktivität (ermittelt als Anstieg der linearen Regressionsgerade) dargestellt. Der Verlauf der durchschnittlichen Kultivierungstemperatur (Tagesdurchschnitt) ist exemplarisch in Abbildung 53 (Linie 2) dargestellt. Der August und September 2014 waren relativ bewölkt und kühl, sodass mit wenigen Ausnahmen nur mäßige volumetrische Produktivitäten von 0,1 bis 0,3 g L⁻¹ d⁻¹ erzielt wurden. Nichtsdestotrotz konnte somit eine Nutzung von Gär-CO₂ zur photoautotrophen Produktion von Mikroalgen im Pilotmaßstab gezeigt werden.

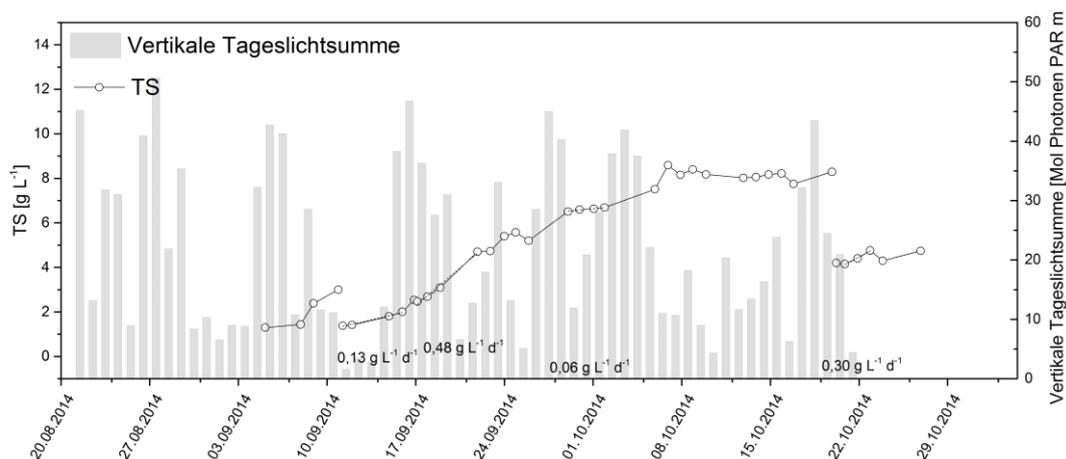


Abbildung 52: Linie 1 – Kultivierungsverlauf von *C. sorokiniana* SAG 211-8k im Jahr 2014 unter Darstellung der vertikalen Tageslichtsummen und Produktivitäten über ausgewählte Perioden (siehe Trendlinien ---).

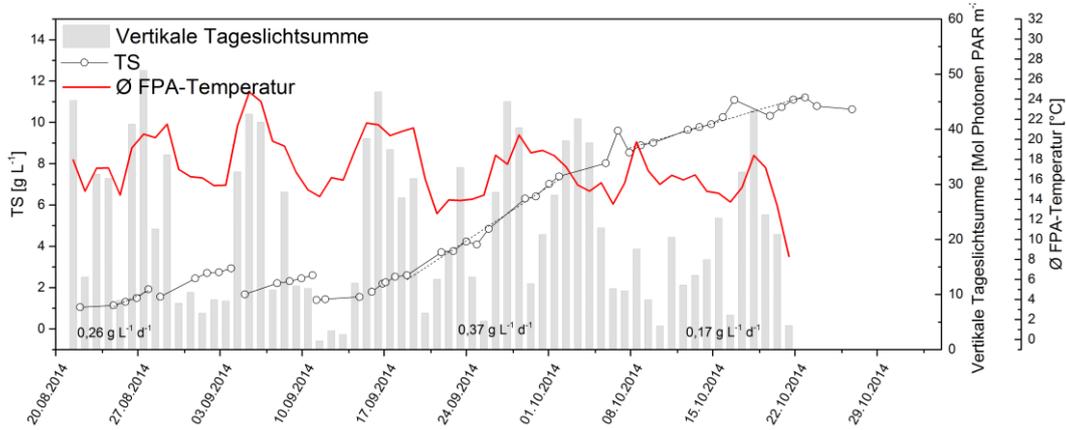


Abbildung 53: Linie 2 – Kultivierungsverlauf von *C. sorokiniana* SAG 211-8k im Jahr 2014 unter Darstellung der vertikalen Tageslichtsummen und Produktivitäten über ausgewählte Perioden (siehe Trendlinien ---) sowie durchschnittlicher Kultivierungstemperatur.

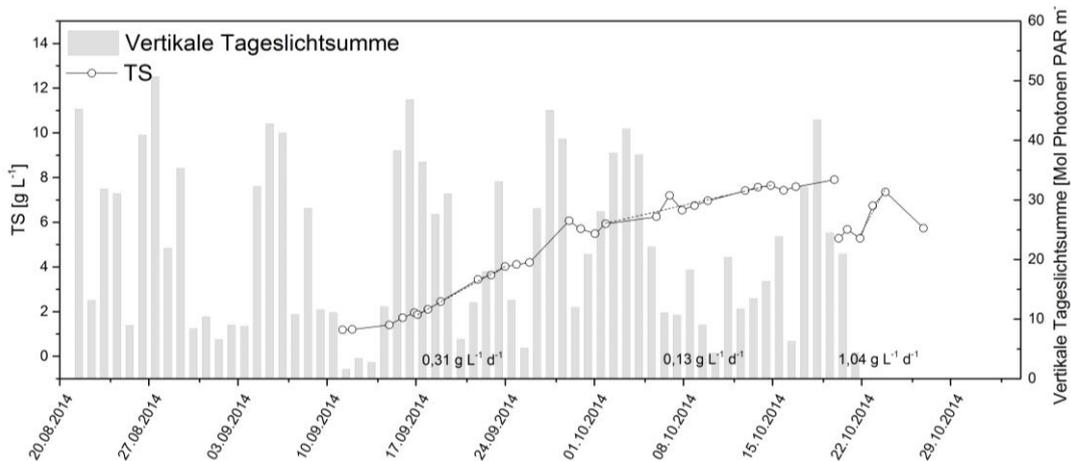


Abbildung 54: Linie 3 – Kultivierungsverlauf von *C. sorokiniana* SAG 211-8k im Jahr 2014 unter Darstellung der vertikalen Tageslichtsummen und Produktivitäten über ausgewählte Perioden (siehe Trendlinien ---).

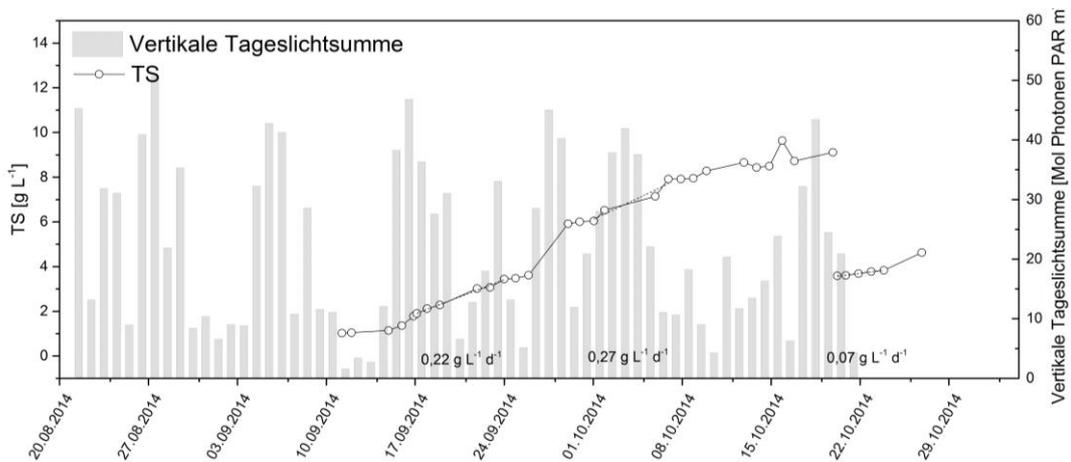


Abbildung 55: Linie 4 – Kultivierungsverlauf von *C. sorokiniana* SAG 211-8k im Jahr 2014 unter Darstellung der vertikalen Tageslichtsummen und Produktivitäten über ausgewählte Perioden (siehe Trendlinien ---).

Zur Akkumulation von Speicherstärke durch *Chlorella sorokiniana* SAG 211-8k wurden den Kulturen aller Linien letztmalig am 10.10.2015 Ammonium zugeführt. Zur Verifizierung der durch das Fraunhofer IGB erzielten Ergebnisse zur Optimierung der Stärkeakkumulation, sollten die Kulturen der Linien auf unterschiedliche Startkonzentration verdünnt werden. Die Verdünnungen erfolgten, sofern nicht anders angegeben, mit DSN Medium. Hierbei sollte eine Konzentration von 2 g L⁻¹ angestrebt werden. Aus betrieblichen Gründen konnte dies jedoch nicht geleistet werden, auch um den Verlust an Biomasse für die Aufarbeitung nicht zu groß werden zu lassen. Die Verdünnung der Kulturen erfolgte wie folgt: Linie 1 von 8,3 auf 4,2 g L⁻¹, Linie 2 blieb unverdünnt bei 10,3 g L⁻¹, Linie 3 von 7,9 auf 5,3 g L⁻¹ und Linie 4 von 9,1 auf 3,6 g L⁻¹. Ab dem 20.10.2014 fand eine tägliche Probenahme zum Nachweis akkumulierter Speicherstärke seitens der Südzucker AG statt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt. Aufgrund des schlechten Wachstums, bedingt durch geringe Lichtverfügbarkeit und niedrigen Temperaturen bei einem gleichzeitig hohen Trockensubstanzgehalt, konnte Ammonium nicht vollständig verbraucht und selbst nach der Verdünnung in vergleichsweise hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Demzufolge fand keine Stickstofflimitierung der Kulturen statt, sodass nur geringe Konzentrationen an Speicherstärke gemessen werden konnten. Diese nahm mit steigender Ammoniumkonzentration annähernd linear ab. Eine Wiederholung des Versuches wurde daher im Jahr 2015 vorgenommen.

Tabelle 22: Stärkegehalt nach Verdünnung der Linien 1, 3 und 4. Linie 2 blieb unverdünnt.

Linie	Datum	Trockensubstanz [g L ⁻¹]	Ammoniumkonzentration [mg L ⁻¹]	Stärke (% w/w)
1	21.10.2014	4,15		5,10
	24.10.2014	4,3	104,50	5,90
	27.10.2014	4,74		4,4
2	21.10.2014	10,74		7,90
	24.10.2014	10,78	24,55	8,90
	27.10.2014	10,63		8,70
3	21.10.2014	5,67		6,50
	24.10.2014	7,36	29,55	7,20
	27.10.2014	5,73		8,00
4	21.10.2014	3,60		8,10
	24.10.2014	3,83	7,2	8,30
	27.10.2014	4,63		12,70

Die erneute Inokulation der Anlage im Jahr 2015 erfolgte am 05. März in Linie 2. Die Linie 1 wurde am 30.04.2015 inokuliert. Im Vergleich zum Jahr 2014 konnten im Frühling und im Sommer 2015 stabile repeated fed-batch Kultivierungen von *C. sorokiniana* SAG 211-8k mit vergleichsweise hoher Produktivität etabliert werden. Die erreichte Produktivität

schwankte je nach Wetterlage zwischen $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und $1,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. In den Sommermonaten konnte eine durchschnittliche Produktivität von $0,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bei Biomassekonzentration zwischen 8 g L^{-1} und 14 g L^{-1} erzielt werden. Diese ist im Vergleich zu den im Labor erhobenen Daten zwar reduziert, spiegelt aber die natürlichen, täglichen Schwankungen von Kultivierungstemperatur, Lichtintensität und nächtlichen Respirationsphasen wieder und ist somit für eine photoautotrophe Algenkultivierung in Deutschland als durchaus positiv zu bewerten, speziell in Anbetracht der erreichten hohen Biomassekonzentrationen. Die Wachstumsverläufe der Linien im Jahre 2015 sind in Abbildung 56 und Abbildung 57 unter Nennung ausgewählter Produktivitäten (ermittelt als Anstieg der linearen Regressionsgerade) dargestellt. Der Verlauf der durchschnittlichen Kultivierungstemperatur (Tagesdurchschnitt) ist exemplarisch in Abbildung 57 (Linie 2) dargestellt.

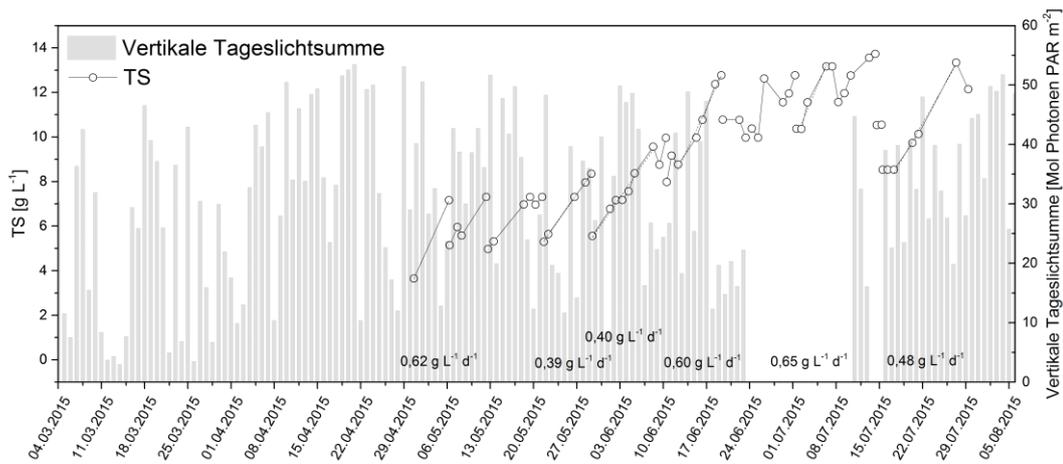


Abbildung 56: Linie 1 – Kultivierungsverlauf von *C. sorokiniana* SAG 211-8k im Jahr 2015 unter Darstellung der vertikalen Tageslichtsummen und Produktivitäten über ausgewählte Perioden (siehe Trendlinien ---).

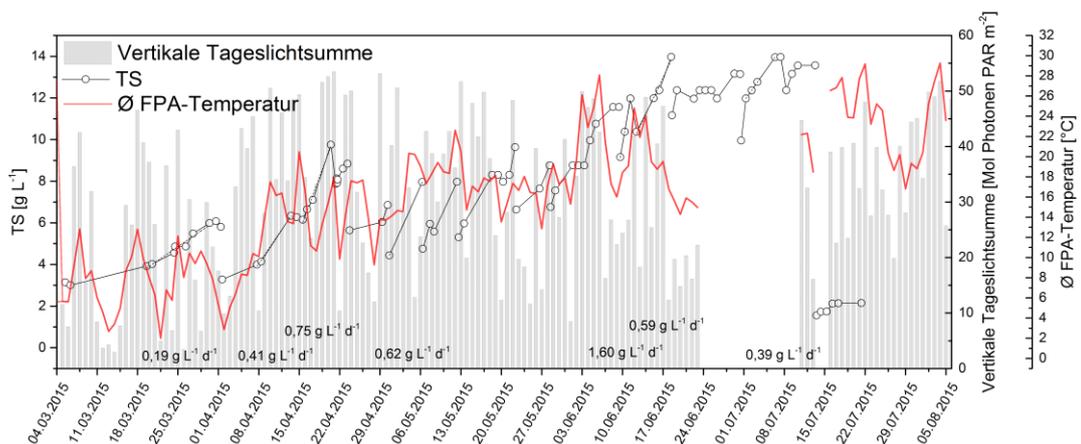


Abbildung 57: Linie 2 – Kultivierungsverlauf von *C. sorokiniana* SAG 211-8k im Jahr 2015 unter Darstellung der vertikalen Tageslichtsummen und Produktivitäten über ausgewählte Perioden (siehe Trendlinien ---) sowie durchschnittlicher Kultivierungstemperatur.

Die Linien 3 und 4 wurden ab dem 13.05.2015 für Limitierungsversuche zur Stärkeproduktion genutzt. Insgesamt wurden bis zum 21.07.2017 sieben Limitierungen pro Linie durchgeführt. Hierfür wurde die Biomasse aus den Linien 1 und 2 genutzt und, sofern nicht anders angegeben, mit DSN Medium ohne N-Quelle verdünnt. Verdünnungen resultierten in initialen Biomassekonzentration von 1,0 – 3,6 g L⁻¹. Nach der Verdünnung wurde, basierend auf den Ergebnissen vom Fraunhofer IGB aus AP1, das Phosphatlevel der Reaktoren auf 100 mg L⁻¹ angehoben. Ammonium konnte bereits ab dem ersten Tag nach der Verdünnung nicht mehr nachgewiesen werden, sodass eine sofortige Stickstofflimitierung der Kulturen auftrat.

Während diverser Limitierungsphasen konnte ein maximaler Stärkegehalt der Biomasse von 30% (bezogen auf die Trockensubstanz) erreicht werden. Die maximale Stärkekonzentration der Kultur betrug 1,3 g L⁻¹. Obwohl die Werte im Vergleich zu den vom Fraunhofer IGB ermittelten um 25 – 30% niedriger waren (40% Stärke w/w und eine maximale Konzentration von 1,9 g L⁻¹), stellt dies, in Anbetracht der Tatsache, dass der Produktionsreaktor eine um den Faktor 1,7 höhere Schichttiefe hat (5 cm versus 3 cm), ein durchweg positives Projektergebnis dar. Die Daten von drei Limitierungen sind in Abbildung 58 und Abbildung 59 dargestellt. Eine Korrelation zwischen Stärkeproduktion und Lichtverfügbarkeit konnte auf Grund eines hardwareseitigen Fehlers der Datenaufzeichnung nicht hergestellt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass es für die Limitierung nicht notwendig ist kostenintensives Kulturmedium zu verwenden, sondern dass die Verwendung von Prozesswasser (aufbereitetes Wasser mit Trinkwasserqualität) zu identischen Resultaten führt (siehe Abbildung 60). Der Verlauf der Stärkeakkumulation war in beiden Linien identisch. Insgesamt konnten mehr als 38 kg limitierter Trockenmasse in Form von Algensuspension dem Projektpartner Südzucker zur Verfügung gestellt werden.

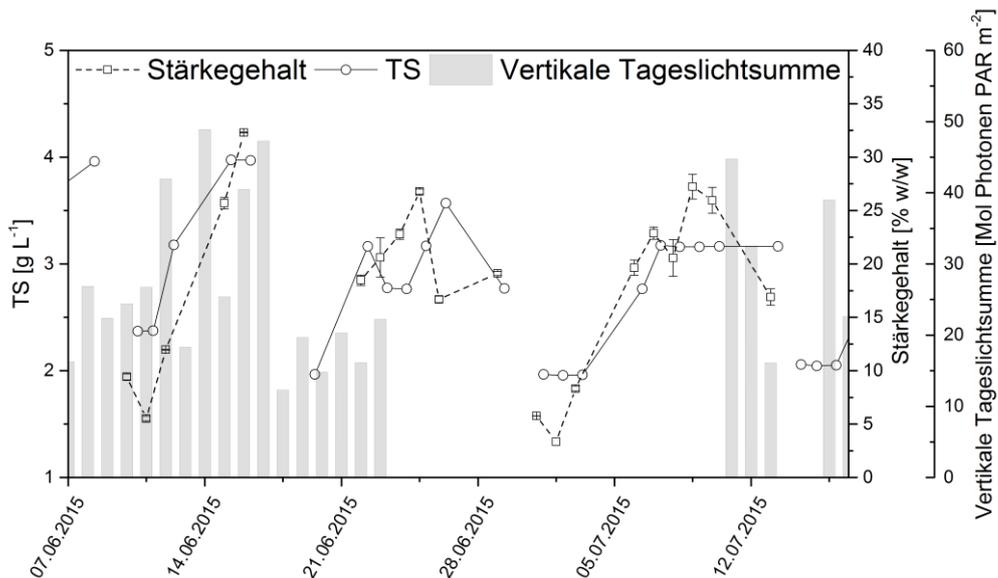


Abbildung 58: Linie 3 – Stärkeproduktion von *C. sorokiniana* SAG 211-8k im Jahr 2015 unter Darstellung der vertikalen Tageslichtsummen. Fehlende Daten resultierten aus einem Ausfall der Datenaufzeichnung.

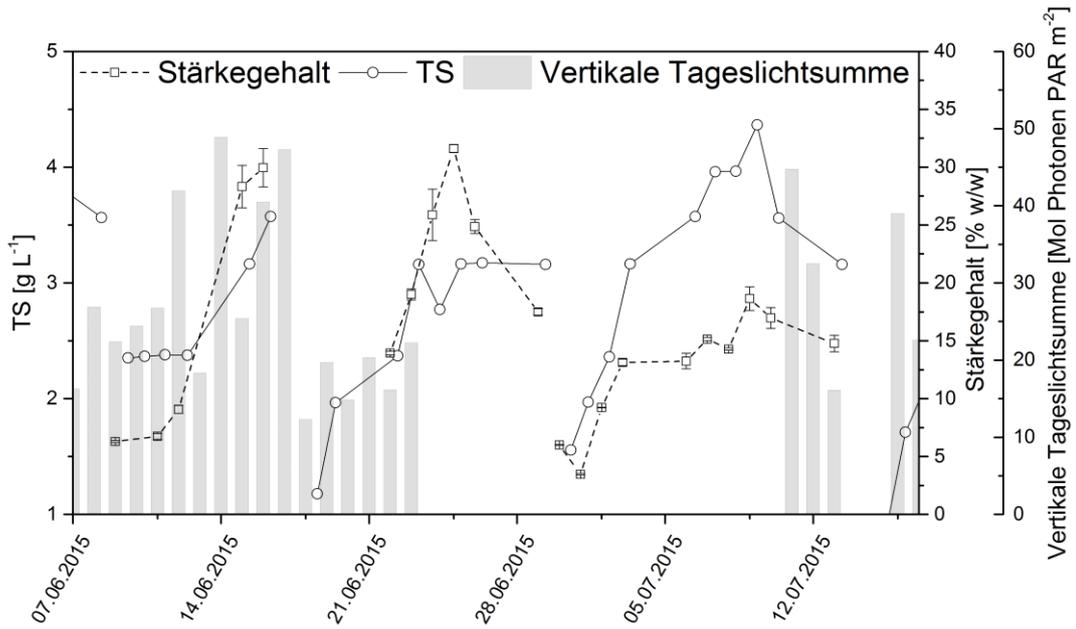


Abbildung 59: Linie 4 – Stärkeproduktion von *C. sorokiniana* SAG 211-8k im Jahr 2015 unter Darstellung der vertikalen Tageslichtsummen. Fehlende Daten resultierten aus einem Ausfall der Datenaufzeichnung.

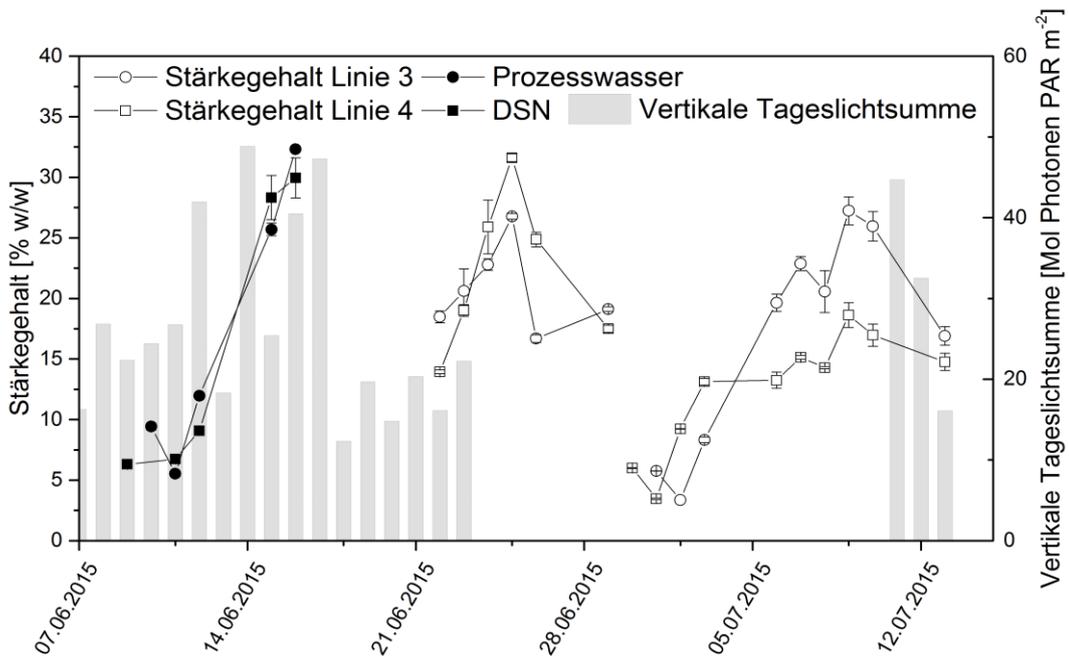


Abbildung 60: Linie 3 und 4 – Vergleich der Stärkeproduktion von *C. sorokiniana* SAG 211-8k im Jahr 2015 unter Darstellung der vertikalen Tageslichtsummen. Fehlende Daten resultierten aus einem Ausfall der Datenaufzeichnung. Während der ersten Limitierungsphase wurde die Kultur mit Prozesswasser (Linie 3) bzw. DSN Medium (Linie 4) verdünnt.

7.2.2 Online Messung der Trockensubstanz

Die in Kapitel „2.3.1 Trockensubstanzgehalt“ beschriebene Trübungssonde der Firma Hach Lange GmbH wurde, wie bereits am 28 L FPA-Photobioreaktor evaluiert, über einen Bypass am 180 L FPA-Photobioreaktorsystem integriert (siehe Abbildung 61) und eine Dreipunktkalibration durchgeführt. Pro Linie wurde eine Trübungssonde verwendet. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 62 dargestellt. Ähnlich wie bei der *online* Trockensubstanzbestimmung im Technikumsmaßstab geben die Messwerte der eingesetzten Sensorik, mit Ausnahme der Linie 3, den Kultivierungsverlauf in erster Näherung wieder. Obwohl eine identische Einbauweise gewählt wurde, unterlagen die Messdaten allerdings täglichen Schwankungen. So verringerte sich die *online* gemessene Trockensubstanz im Tagesverlauf ab dem Sonnenaufgang bis zur Mittagszeit, und nahm dann sukzessive wieder zu. Da ein Einfluss von Licht ausgeschlossen werden konnte, wurde die Hypothese einer potenziellen Beeinflussung durch die Temperatur überprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass die verwendete Sonde im Gegensatz zu den Herstellerangaben offensichtlich über keine Temperaturkompensation verfügt. So nimmt das Messsignal mit



Abbildung 61: 180 L FPA-Photobioreaktoren während der Inokulation. Die Integration der Hach Lange Trübungssonde war über einen Bypass (rechter Bildrand) möglich.

steigender Reaktortemperatur linear ab und normalisiert sich während die Kultur am Nachmittag wieder abkühlt (siehe Abbildung 63 und Abbildung 64). Obwohl erste ergänzende im Labor durchgeführte Untersuchungen darauf hinweisen, dass man eine nachträgliche Temperaturkompensation mittels mathematischer Anpassung erzielen kann (der Einfluss der Temperatur wirkt sich linear auf den Messwert aus), ist dies für die im Projekt erhobenen Daten nicht möglich, da die vorherrschende Temperatur zum Zeitpunkt der einzelnen Kalibrierpunkte divergierte und folgerichtig die erhobenen Daten auf nicht prädiktive Art und Weise verfälschte. Dennoch ist dies als ein wichtiges und positives Projektergebnis zu betrachten, da gezeigt werden konnte, dass die Messmethodik und Implementierung in das Photobioreaktorsystem an sich solide Messdaten liefert (Labor) und eine nachträgliche Temperaturkompensation möglich ist.

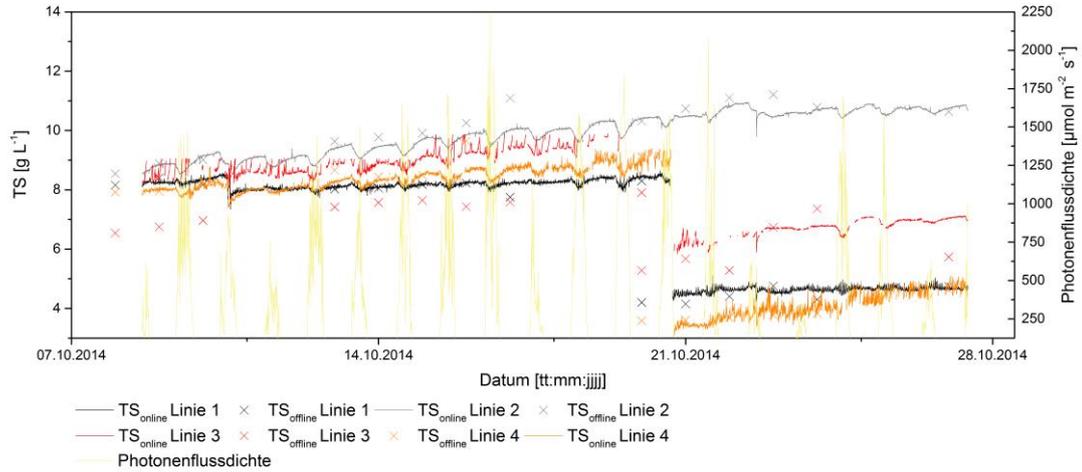


Abbildung 62: Vergleich der mittels Hoch Lange Trübungssonde online und offline gemessenen Trockensubstanzen während der *outdoor* Kultivierung von *C. sorokiniana* SAG 211-8k unter Darstellung der Photonenflussdichte.

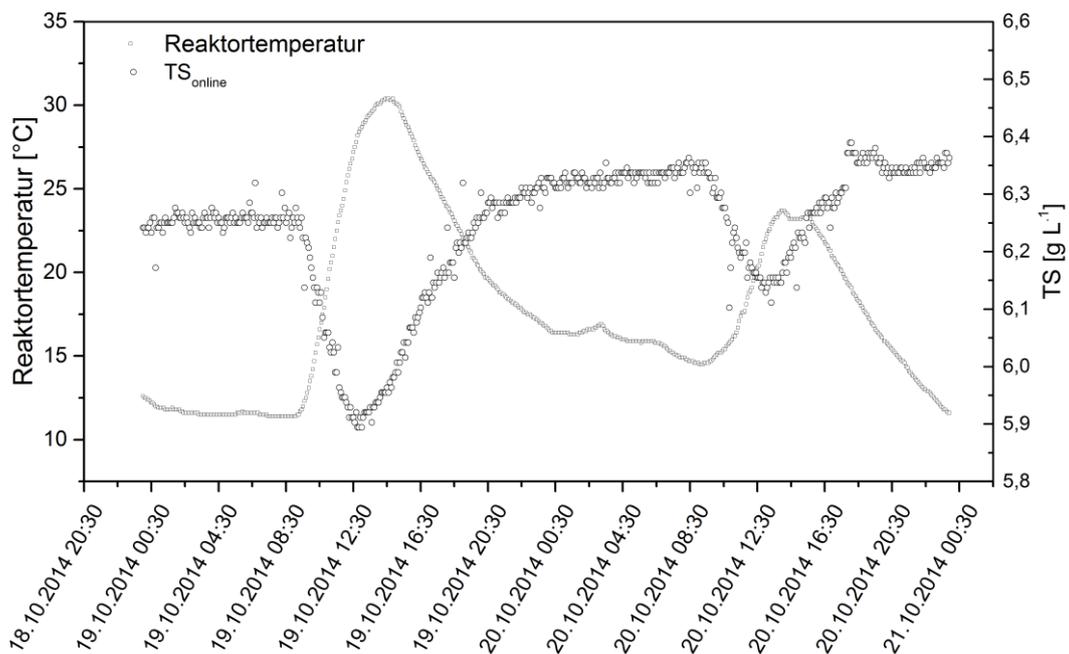


Abbildung 63: Verlauf von *online* gemessener Trockensubstanz und Reaktortemperatur über einen Zeitraum von 2 Tagen.

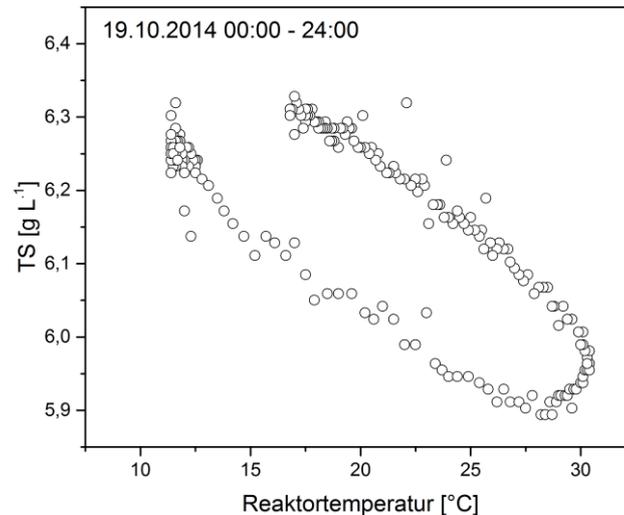


Abbildung 64: Korellation zwischen online gemessener Trockensubstanz und Reaktortemperatur.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass es während der Projektlaufzeit gelungen ist, eine Pilotanlage (4,3 m³) zur Kultivierung phototropher Mikroorganismen auf dem Gelände der CropEnergies in Zeit zu etablieren und zu betreiben. Hierbei konnte die Kultivierung von *C. sorokiniana* SAG 211-8k über den Verlauf eines gesamten Jahres (exklusive witterungsbedingtem Winterstillstand der Freilandanlage) dargestellt werden.

Während die Produktivitäten im Frühling und Herbst nur mäßig waren, konnten in den Sommermonaten durchschnittliche Produktivitäten von 0,6 g L⁻¹ d⁻¹, auch bei Biomassekonzentrationen größer als 10 g L⁻¹, erzielt werden. Sowohl Produktivitäten als auch finale Biomassekonzentrationen waren somit identisch zu den durch das Fraunhofer IGB erzielten Ergebnissen während der Freilandversuche in 28 L FPA-Photobioreaktoren. Die erzielten Resultate verdeutlichen daher die Skalierbarkeit des verwendeten Systems, zumindest während der Wachstumsphase von *C. sorokiniana*.

Die Induktion der Akkumulation von Speicherstärke konnte ebenfalls erfolgreich auf das Freiland übertragen werden. Hierbei war allerdings eine um 25% reduzierte von sowohl Produktivität als auch finaler Konzentration zu verzeichnen. Eine Erklärung hierfür ergibt sich aus der reduzierten spezifischen Lichtverfügbarkeit während der Limitierungen, die aus einer um den Faktor 1,6 größeren Schichttiefe des Produktionsreaktors resultiert (3 cm versus 5 cm).

Die Übertragung des indoor getesteten und adaptierten online-Monitorings auf das Freiland erwies sich als problematisch. Obwohl die erzielten Ergebnisse der Trübungssonde für die Überwachung des Algenwachstums unzureichend waren, konnten dennoch wichtige Ergebnisse zur Integration und Funktionsweise selbiger gewonnen werden. Mittels leichter Anpassungen wird es in Zukunft möglich sein die vorherrschenden Zellkonzentrationen, auch im Freiland, online zu erfassen und das Sondersignal zur Steuerung relevanter Kultivierungsprozesse zu nutzen.

AP 8 Projektkoordination

Während der Gesamtlauzeit des Projektes wurden insgesamt 10 Projekttreffen bei den verschiedenen Partnern abgehalten. Die Koordination der Treffen sowie die Erstellung des Protokolls der Besprechungen erfolgte durch das Fraunhofer IGB.

- 1. Projektmeeting beim Fraunhofer IGB in Stuttgart am 10.1.2013
- 2. Projektmeeting beim Fraunhofer IGB in Stuttgart am 6.5.2013
- 3. Projektmeeting bei Südzucker AG in Offstein am 12.9.2013
- 4. Projektmeeting bei Subitec GmbH in Stuttgart am 16.1.2014
- 5. Projektmeeting bei CropEnergies in Zeitz organisiert durch Südzucker AG am 2.6.2014. Die Inbetriebnahme der Pilotanlage ist erfolgt. Vom Projektträger FNR haben Frau Spittel und Frau Sternberg am Projekttreffen teilgenommen.
- 6. Projektmeeting beim Fraunhofer IGB in Stuttgart am 13.10.2014
- 7. Projektmeeting bei Subitec GmbH in Stuttgart am 9.2.2015
- 8. Projektmeeting bei Südzucker AG in Offstein am 18.5.2015
- 9. Projektmeeting bei CropEnergies in Zeitz organisiert durch Südzucker AG am 22.7.2015
- 10. Projektmeeting beim Fraunhofer IGB in Stuttgart am 18.11.2015

II.2 Verwertung

II.2.1 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Ein wirtschaftliches Risiko einer rein energetischen Nutzung von Algenbiomasse zu Energieträgern wie Ethanol oder Biogas ist der wirtschaftliche Ertrag für Ethanol versus der Kosten für die Algenproduktion. Deshalb kann aus wirtschaftlichen Gründen in naher Zukunft die energetische Nutzung nur über eine Kopplung der Produktion des Energieträgers und der stofflichen Nutzung weiterer Biomassefraktionen wie Proteine erfolgen, weil damit die Produktionskosten für Mikroalgen durch zwei Einnahmequellen erwirtschaftet werden können. Die Erträge für die Produkte Ethanol und Biogas liegen, pro kg erzeugter Algenbiomasse, bei weniger als 0,5 €. Proteine haben demgegenüber einen deutlich höheren Preis beispielsweise als Ersatz für Fischmehl mit 1,2 €/kg Fischmehl (FAO, 2008), oder membrangebundene oder lösliche Proteine in der Lebensmittelindustrie mit 1 € bis 6 € pro kg (Norsker et al., 2011²).

Um einen Beitrag zu dieser Problematik zu leisten ist eine integrale Betrachtung von Prozessen vom Labor- bis zum Produktionsmaßstab erforderlich. Daher waren im Projekt Partner entlang der gesamten Wertschöpfungskette beteiligt, was eine integrale Betrachtung von Prozessen vom Labor- bis zum Pilotproduktionsmaßstab ermöglicht. Auf Grund der Dimension und der Ziele des Vorhabens kam der Einbindung eines integrierten Chemieverbund-Standortes wesentliche Bedeutung zu, insbesondere um den Ansatz der Bio-raffinerie und der Kreislaufführung von Stoffen zu realisieren.

Die Kosten der Algenbiomasseproduktion und deren Aufarbeitung werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst, die im Rahmen des Projektes optimiert und verbessert wurden:

- Der Biomasseproduktivität, die sowohl von der eingesetzten Reaktortechnologie und der damit einhergehenden erzielbaren Biomassekonzentration im Reaktor, als auch der Lichtausbeute beeinflusst wird. Die Biomassekonzentration im Wachstums- als auch im Stärkeproduktionsprozesses wurde hinsichtlich des Stärkegehalts und der Stärkeproduktivität optimiert. Ein gegensätzlicher Einfluss der Lichtausbeute auf die Biomasse- und Stärkeproduktivität zeigten die Freilandversuche. Über die Prozesskontrolle konnte die Langzeitstabilität des Prozesses, und damit die Gesamtproduktivität positiv beeinflusst werden. Die Ergebnisse des Fraunhofer IGB wurden am Standort der CropEnergies in Zeitz von der Subitec GmbH auf die Freilandanlage im Pilotmaßstab (größere Schichtdicke) übertragen.
- Die Betriebskosten beinhalten die Kosten für Nährstoffe, CO₂, Wasser, Energie etc., aber auch den Personalaufwand für Betrieb und Ernte. Die Möglichkeit der Schließung

² Norsker N.H., Barbosa M.J., Vermuë M.H., Wijffels R.H. (2011) Microalgal production – a close look at the economics. *Biotechnol. Adv.* 29: 24-27

von Stoffkreisläufen für Nährstoffe konnte im Fraunhofer IGB aufgezeigt werden. Subitec hat Gärgas der Ethanolfermentation bei CropEnergies als alleinige CO₂-Quelle bis in den Pilotmaßstab eingesetzt. Die getesteten Geräte und Adaptionen an das Online-Monitoring der Biomassekonzentration reduziert nicht nur den Arbeitsaufwand, sondern kann auch für die Automatisierung eingesetzt werden, die zu weiteren Kostenreduktionen insbesondere beim Personalbedarf führt.

- Durch hohe Algenbiomassekonzentrationen in den FPA-Reaktoren konnte der Energiebedarf für die Zellernte reduziert werden.
- In der Aufarbeitung von Algenbiomasse bestimmen Produktgehalt und Aufarbeitungstechnologie sowie die gewünschte/benötigte Reinheit des Endproduktes den Kostenaufwand.

Die gewonnenen Erkenntnisse erweitern die Datenbasis entlang der gesamten Wertschöpfungskette sowohl hinsichtlich eines Langzeitbetriebes einer Algen-Pilotanlage, und der erzielbaren Biomasse- und Stärkeproduktivitäten in 180-Liter FPA-Reaktoren, als auch hinsichtlich energieeffizienter Aufarbeitungsschritte. Diese Datenbasis stellt eine wertvolle Grundlage für Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen und Dimensionierung von geplanten Algenanlagen dar. Diese Erkenntnisse wurden vom Fraunhofer IGB in der am Fraunhofer CBP errichteten Algenproduktionsanlage umgesetzt und die Anlage wurde erfolgreich in Betrieb genommen. Das Konzept der zweistufigen Produktion von stärkereichen Algen kann auf andere Produkte wie Lipide oder Carotinoide übertragen werden. Dieses wird vom Fraunhofer IGB in Projektanträge auf nationaler und europäischer Ebene (Horizon 2020) eingebracht, und damit kann erworbenes Knowhow auf diesem Gebiet europaweit erfolgversprechend eingesetzt werden. Damit ermöglichen die Ergebnisse dieses Projektes dem Fraunhofer IGB, die Fachkompetenz auf dem Gebiet der Prozessentwicklung für die Algenproduktion auszubauen und seinen Bekanntheitsgrad als innovativer Forschungspartner zu erhöhen. Darüber können dann weitere Projekte mit KMU oder Großunternehmen akquiriert und weitere Drittmittel eingeworben werden.

Seitens der **Subitec GmbH** können die im Projekt erzielten Ergebnisse mit sowohl wissenschaftlich-technischem, als letztendlich auch wirtschaftlichem Nutzen verwertet werden.

Als Technologielieferant im Bereich der Mikroalgenbiotechnik ist eine fortwährende Entwicklung und Optimierung relevanter Prozesse von sowohl technischer als auch wissenschaftlicher Seite unabdingbar. Bis dato sind nur eine begrenzte Anzahl industrieller Prozesse basierend auf der photoautotrophen Kultivierung photosynthetisch aktiver Mikroorganismen dargestellt. In Bezug auf optimale Lichtversorgung und Durchmischung, speziell für das verwendete Reaktorsystem fehlt die industrielle/technische Datenbasis weitgehend ganz. Dies gilt im selben Ausmaß für die Implementation von Monitoring des biotechnologischen Prozesses sowie zur Gewährleistung seiner Stabilität, speziell bei schwankenden Prozessparametern (vor allem Lichtintensität und Temperatur), welche im Freiland nicht zu vermeiden sind.

Die in diesem Projekt erarbeitete Datenlage erlaubt es kongruente Prozesse fundiert auszulegen. Dies betrifft vor allem das Zusammenspiel von Lichtverfügbarkeit und Biomassekonzentration, welches ausschlaggebend sowohl für Wachstum als auch Produktbildung ist. Global betrachtet lassen sich hieraus auch Erkenntnisse zur technischen Planung wei-

terer Anlagen ableiten, um zum Beispiel den Reihenabstand zwischen den Linien sowie das benötigte Kultivierungsvolumen von Anlagenteilen zum vegetativen Wachstum versus Limitierung zur Produktakkumulation anzupassen und somit einen weiteren Schritt hin zur Wirtschaftlichkeit der Algenproduktion zu machen.

Seitens der Sensorik ist es gelungen das online *Monitoring* der Biomassekonzentration zu etablieren. Obwohl bis dato im Freiland nur bedingt anwendbar, ist eine Adaptation der Integration der Sensorik sowie eine Implementation einer nachgeschalteten mathematischen Anpassung der Messdaten kurzfristig möglich. Dies wird es erstmalig ermöglichen, Prozesse in Abhängigkeit des Wachstums der Kulturen sowie der vorherrschenden Biomassekonzentration zu steuern. Mittelfristig wird es somit automatisiert möglich sein, die Biomassekonzentration an vorherrschende Lichtverhältnisse anzupassen und damit auch bei niedriger Lichtintensität Limitierungen zu induzieren. Des Weiteren kann z.B. die Zugabe von Nährmedium dem Wachstum entsprechend angepasst werden. Die Prozesse werden somit, bei reduziertem Personalaufwand und betrieblichen Aufwendungen, wesentlich effizienter.

Durch eine prognostizierte Reduktion der Produktionskosten werden somit mittelfristig neue Märkte erschlossen werden können und es der Subitec ermöglichen, nicht nur ihre Wettbewerbsfähigkeit im Bereich der Mikroalgenbiotechnologie in geschlossenen Systemen zu steigern, sondern sich als Branchenführer zu etablieren.

Südzucker verfolgt an großen eigenen Standorten Bioraffinerie-Konzepte. Diese gilt es auch zukünftig weiter auszubauen. Das Projekt hatte als wesentliches Element die Pilotierung der Algen-Reaktoren am Standort Zeitz inklusive einer Investition in die Algenanlage. Mit dem Projekt wurden die Grundlagen für eine weitere Befassung mit der Technologie gelegt. Die Kultivierung von Algen im Photobioreaktor mit Gär-CO₂ einer Bioethanolanlage ist ein neues Verfahren zur Nutzung des biogenen Kohlendioxids. Im Laufe des Projekts mussten zunächst die Photobioreaktoren installiert und die Kultivierung unter Ausschluss von Kontaminationen umgesetzt werden. Die Projektlaufzeit reichte jedoch nicht aus, ausreichende Ergebnisse zu sammeln, mit deren Hilfe sich eine detaillierte Wirtschaftlichkeitsrechnung durchführen ließe. Jedoch sind die Einschätzungen des IGBs und Subitecs sehr wertvoll. Durchaus positiv war es, dass die Kultivierung zweier Algenstämme gelang, sodass sich das Verfahren auch auf die Herstellung anderer Produktengruppen anwenden ließe. Eine unterschätzte Schwierigkeit innerhalb des Projektes war die Verfügbarkeit von Biomasse zum weiteren Downstream-Processing. Hier wäre zukünftig noch deutlich mehr Wert auf die Produktaufarbeitung zu legen.

II.2.2 Wissenschaftliche und technische Erfolgsaussichten

Die Ergebnisse der zweistufigen Prozessführung, insbesondere die gezielte Optimierung der Lichtverfügbarkeit (Verhältnis Licht auf der Reaktoroberfläche zur Gesamtbiomasse im Reaktor) wurden bereits in Konferenzbeiträgen und Proceedings vorgestellt (siehe Kapitel II.4). Diese Optimierungsstrategie für Wachstums- und Limitierungsphase wurde durch das **Fraunhofer IGB** bereits für die Produktion lipidreicher Algen erfolgreich getestet (Münkel et al. 2013³) und in diesem Vorhaben gezielt eingesetzt. Die Ergebnisse bestätigten wieder den Erfolg dieser Vorgehensweise. Bekannte Arbeitsgruppen wie die Universität Wageningen, AlgaePARC haben diese Vorgehensweise inzwischen ebenfalls angewendet und publiziert (Benvenuti et al. 2015⁴). Damit wurde die im Fraunhofer IGB entwickelte Optimierungsstrategie von international renommierten Arbeitsgruppen übernommen und bestätigt. Dies stärkt die wissenschaftliche Reputation auf dem Gebiet der Prozessentwicklung für die Produktion von Algenbiomasse im Freiland und stärkt somit nachhaltig den Wissenschaftsstandort Deutschland.

Die Kultivierung von *Chlamydomonas reinhardtii* im Freiland ist bisher nur von Geier et al. 2012, für die Wasserstoffproduktion nach mixotropher Kultivierung beschrieben, nicht aber photoautotroph, wie sie in diesem Projekt erfolgte. Somit konnte in diesem Forschungsvorhaben erstmals die photoautotrophe Kultivierung und Stärkeproduktion im Freiland über knapp zwei Monate mit mehreren Stärkeproduktionsphasen gezeigt werden.

Auf wissenschaftlich-technischer Seite konnte gezeigt werden, dass die Nutzung von CO₂ resultierend aus einer industriellen Ethanolproduktion ohne Einschränkung als Kohlenstoffquelle zur Algenproduktion zu verwenden ist. Hierfür bedarf es lediglich einer marginalen Aufarbeitung in Form einer Trocknung. Die Nutzung dieses biogenen CO₂ ist somit bedingungslos auf weitere Algen und Prozesse, z.B. der Produktion lipid- oder carotenoidreicher Algenbiomasse, übertragbar und wird mittelfristig zur Etablierung der Mikroalgenbiotechnologie in Bioraffinerie-Anlagen führen.

Vor allem die Langzeitstabilität der Freilandversuche sind ein Resultat der Prozessführung. Bereits 2014 wurden die Ergebnisse für die Freilandkultivierung von *Chlorella sorokiniana* im 28L-Maßstab erfolgreich auf die Pilotanlage (40 x 180L) des Fraunhofer CBP in Leuna übertragen. Auch mit dem Betrieb der Pilotanlage auf dem Gelände von CropEnergies konnte gezeigt werden, dass der gesamte Prozess skalierbar ist. Dementsprechend resultierten Versuche, durchgeführt im sowohl 28 L als auch 180 L FPA-PBR, in vergleichbaren Ergebnissen. Eine Darstellung dieser Skalierbarkeit, welche die Grundvoraussetzung zur Entwicklung biotechnologischer Prozesse im Labor darstellt und oft als Flaschenhals betrachtet wird, wird mittelfristig die Akzeptanz gegenüber den im Technikkmaßstab erhobenen Prozessdaten erhöhen und die Hemmschwelle gegenüber der Inbetriebnahme einer Pilot- oder gar Industrieanlage senken und somit Verkaufszahlen zu

² Münkel R., Schmid-Staiger U., Werner A., Hirth T. (2013): Optimization of outdoor cultivation in flat panel airlift reactors for lipid production by *Chlorella vulgaris*. *Biotechnology and Bioengineering* 110, (11), 2882–2893.

⁴ Benvenuti G.; Bosma R.; Klok A.J.; Ji F.; Lamers P.; Barbosa M.J.; Wijffels R. (2015): Microalgal triacylglycerides production in outdoor batch-operated tubular PBRs. *Biotechnology for Biofuels*. 8:100 (DOI 10.1186/s13068-015-0283-2).

steigern. Dies ist auch dadurch bedingt, dass während der Projektlaufzeit ein umfassender Datenpool generiert wurde, welcher es erlaubt erste ökonomische Betrachtungen eines Prozesses durchzuführen.

Abschließend ist zu folgern, dass die Ergebnisse des Projektes es der Subitec GmbH erlauben, ihre Fachkompetenz im Bereich des Engineering und des Betriebes von Anlagen zur Kultivierung phototropher Mikroorganismen auszubauen. Hierbei wurde während des Projektes ein wesentlicher Schritt in Richtung eines kunden- bzw. produktspezifischen Engineerings getan. Das Produktportfolio der Subitec wird um wesentliche Sensorik und Steueraktuatorik ausgebaut. Nach erfolgreicher Implementation, die kurzfristig angestrebt wird, wird die Subitec ihren nationalen und internationalen Bekanntheitsgrad, bedingt durch anspruchsvolle Steueraktuatorik die in effizienten und stabilen Prozessen resultiert, steigern.

Die Fragestellung der Prozessentwicklung und Langzeitstabilität für die Algenproduktion in ein- oder zweistufigen Prozessschritten ist nicht nur von nationalem sondern auch von europäischen Interesse. Die Projektergebnisse dienen somit auch der Erhöhung der Sichtbarkeit des Institutes im europäischen Raum. Die Ergebnisse werden zusätzlich zu den in Kapitel II.4 genannten zukünftig auf europäischen Konferenzen vorgestellt (EN-CAPP April 2016, Malta; EABA Algae Biomass 2016 in London) mit dem Ziel, als attraktiver Partner, Folgeprojekte mit europäischer Finanzierung (Horizon2020) zu akquirieren. Auch eine Publikation in einer renommierten Fachzeitschrift (z.B. Algal Research) ist für 2016 geplant.

Aus den Ergebnissen des Forschungsvorhabens haben sich für das Fraunhofer IGB folgende Fragestellungen und Ansatzpunkte ergeben, die in einem Folgeprojekt erarbeitet werden könnten. Insbesondere die Reduktion der Betriebskosten und Langzeitstabilität von Algenprozessen stehen hier im Fokus:

1. Erhöhung der Prozesskontrolle im Pilotmaßstab und Betrieb der Anlage bei optimalen Biomassekonzentrationen bezüglich Biomasseproduktivität, Produktkonzentration und – gehalt in Abhängigkeit von den klimatischen Bedingungen.
2. Weitere Möglichkeiten die Betriebskosten zu senken sind die Klarschlempe, die bei der Ethanolfermentation aus Getreide anfällt, direkt als Quelle für Nährstoffe und organische C-Quelle (enthält 10-15 g/l Glycerin) einzusetzen. Für diese mixotrophe Betriebsweise wären entsprechende Fütterungsstrategien zu entwickeln, die in Kombination mit einem Automatisierungskonzept für Fütterung und Ernte den Betrieb der Anlage unabhängig von klimatischen Bedingungen ermöglicht. Gleichzeitig kann durch diese mixotrophe Betriebsweise die Biomasseproduktivität erheblich erhöht werden.
3. Bisher standen die Produkte Stärke und Biogas für die Energieerzeugung im Vordergrund, hinzu kam, um die Wertschöpfung zu erhöhen, die Gewinnung von Proteinen. Um die Wertschöpfung aus der Algenbiomasse zu erhöhen, sollte die Produktpalette erweitert werden. Bei der Auswahl der Extraktionstechnologien sollte darauf geachtet werden, dass sie für feuchte Biomasse geeignet sind, um so energieaufwändige Trocknungsschritte zu vermeiden.

II.3 Erkenntnisse von Dritten

Während des Projektverlaufs sind einige Reviews und wissenschaftliche Veröffentlichungen zum Thema zweistufige Speicherproduktproduktion mit Mikroalgen erschienen, die Projektergebnisse bestätigen. So wurde in Benvenuti et al. (2015) der Einfluss der Startbiomassekonzentration in vertikalen und horizontalen outdoor Röhrenreaktoren auf die Speicherlipidproduktion untersucht, wie bereits zuvor im Fraunhofer IGB für die Speicherlipidproduktion (Münkel et al., 2013) und auch, wie es sich gezeigt hat, für die Stärkeproduktion gilt. Danach hat die Startbiomassekonzentration, und damit die Lichtverfügbarkeit pro g Biomasse im Reaktorvolumen bei gegebenen Lichtverhältnissen einen wesentlichen Einfluss auf den Stärkegehalt als auch Stärkeproduktivität von *Chlorella sorokiniana* und *Chlamydomonas reinhardtii* hat.

Von Geier et al. ist 2012 die Wasserstoffproduktion im Freiland für *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben worden, allerdings unter mixotrophen Kulturbedingungen durch Zugabe von Acetat ins Medium. Laborexperimente, in denen die Lichtbedingungen im Freiland simuliert wurden sind bei Yarnold et al., 2016 zu finden. Jedoch wurde hier mit 7 mL Kultivierungsvolumen in sehr kleinem Maßstab gearbeitet. In diesem Projekt konnte somit erstmalig *Chlamydomonas reinhardtii* unter photoautotrophen Bedingungen erfolgreich im Freiland kultiviert werden, wobei auch das Scale-up bis in den 28-L FPA-Reaktor gelang.

Mizuno et al. 2013 beschreiben die Stärkeproduktion unter mixotrophen Bedingungen (mit Acetat als Kohlenstoffquelle) bei einer Schwefellimitierung für verschiedene *Chlorella*-Stämme. Dies wurde auch schon von der tschechischen Arbeitsgruppe von Branyikova im Jahr 2009 für einen *Chlorella vulgaris* Stamm beschrieben.

Zu *Tetraselmis suecica* sind einige Arbeiten zur Kultivierung im Freiland von Michels erschienen (Michels et al., 2014a, 2014b, 2014c). Dabei wird die Kultivierung in einem Rohrreaktor beschrieben, wobei eine optimale Biomassekonzentration von 0,7 g/L mit einer Produktivität von 0,35 g L⁻¹ d⁻¹ ermittelt wurde. Es ergab sich bei höheren Strahlungsmengen ein höherer Kohlenhydratgehalt von bis zu 25 % (w/w) und ein erniedrigter Proteingehalt. Zudem wurde ermittelt, dass die Kultivierung auf Abwasser aus einer Fischfarm möglich ist und eine vollständige Entfernung von N und P aus diesem Abwasser möglich ist, wenn diese im passenden Verhältnis vorliegen, oder der fehlende Nährstoff zugegeben wird. Die Ergebnisse zeigen, dass auch mit *Tetraselmis suecica* möglich ist eine Freilandkultivierung durchzuführen, Kohlenhydrate zu produzieren und die Alge auf Abwasser zu kultivieren. Dieses Abwasser muss jedoch einen ausreichenden Salzgehalt aufweisen, da Salinität ein wichtiger Faktor bei der Kultivierung von *Tetraselmis suecica* ist. Dies zeigte sich auch für eine andere Tetraselmis-Art, für die beschrieben ist, dass die Salinität des Mediums Einfluss auf den Stärkegehalt der Zellen hat (Yao et al. 2013).

Zur Nutzung von Flüssiggärrest als Nährstoffquelle in Kulturmedien sind verschiedene Publikationen erschienen, die zeigen, dass die verwendeten Stämme sehr unterschiedlich auf Flüssiggärrest reagieren, und für jeden Gärrest-Typ und jeden Stamm separate Untersuchungen vorzunehmen sind (Kobayashi et al., 2013; Xia et al. 2016). Speziell zu *Chlorella sorokiniana* sind Untersuchungen durchgeführt worden, in denen die Alge zur Reinigung von Abwasser bzw. Flüssiggärrest genutzt wurde (Lizzul et al., 2014). Hierbei wurde im 1-Liter-Maßstab eine komplette Entfernung des Stickstoffs aus der Kultur er-

reicht, es wurden jedoch nur maximale Biomassekonzentrationen von 330 mg/l erzielt und die Kultivierung wurde nur über 96 h durchgeführt.

Sowohl zum Stärkemetabolismus in Mikroalgen als auch die Nutzung von Speicherkohlenhydraten aus Algen für die Biokraftstoffproduktion sind verschiedene Publikationen erschienen (Chen et al. 2013; Zhao et al. 2013).

Postma et al. 2014 haben den Zellaufschluss von *Chlorella vulgaris* in Rührwerkskugelmöhlen untersucht wobei sie einen Aufschlussgrad von über 97 % erreichten. Eine Erhöhung der Biomassekonzentration und Rührerdrehzahl führte zu erhöhten kinetischen Geschwindigkeitskonstanten des Zellaufschlusses.

Ursu et al. 2014 untersuchte die Extraktion und Fraktionierung von Proteinen aus *Chlorella vulgaris*. Bei pH 12 und anschließender Behandlung im Hochdruckhomogenisator (2 x 2,7 kbar) konnten 98 % der Proteine aus den Zellen freigesetzt werden. Die Proteine konnten anschließend sowohl über Säurefällung als auch Ultrafiltration gewonnen werden. Das Optimum der Säurefällung lag bei pH 4.

Die Isolierung von Proteinen aus entfetteter und nicht-entfetteter Nannochloropsis Algenbiomasse wurde von Gerde et al. 2013 beschrieben. Maximale Mengen an Protein wurden bei 60 °C und pH 11 freigesetzt und konnten bei pH 3,2 gefällt werden. Die isolierten Proteinfractionen enthielten 56,9 % (entfettete Biomasse) bzw. 40,5 % Protein (nicht-entfettete Biomasse). Die Proteinausbeuten betragen 16 % bzw. 30 %. Die Fettentfernung mittels Isopropanol reduzierte die Proteinausbeuten somit deutlich.

Zur Verzuckerung von Kohlenhydraten aus Mikroalgenbiomassen wurde von Hernández et al 2015 ein Paper veröffentlicht, in dem sie physikalische, chemische und enzymatische Methoden zur Vorbehandlung von Algenbiomasse zur Produktion von Bioethanol untersuchten. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Zellwandzusammensetzung der Mikroalgenspezies entscheidend für die Vorbehandlungseffizienz ist. Eine Kombination von saurer Hydrolyse gefolgt von enzymatischer Hydrolyse erzielte die höchsten Monosaccharidkonzentrationen.

Münkel R., Schmid-Staiger U., Werner A., Hirth T. (2013): Optimization of outdoor cultivation in flat panel airlift reactors for lipid production by *Chlorella vulgaris*. *Biotechnology and Bioengineering* 110, (11), 2882–2893.

Geier S.C.; Sabine Huyer S., Praebst K., Husmann M., Walter C., Buchholz R. (2012): Outdoor cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* for photobiological hydrogen production. *J Appl Phycol* (2012) 24:319–327

Mizuno Y., Sato A., Watanabe K., Hirata A., Takeshita T., Ota S., Sato N., Zachleder V., Tsuzuki M., Kawano S. (2013): Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. *Bioresource Technology* 129, 150-155

Yao C.-H., J.-N., X.-P., Song Xue S. (2013): Salinity manipulation as an effective method for enhanced starch production in the marine microalga *Tetraselmis subcordiformis*. *Bioresource Technology* 146, 663–671 (doi:10.1016/j.biortech.2013.07.134)

- Kobayashi N., Noel E.A., Barnes A., Watson A., Rosenberg J.N., Erickson G., Oyler G.A. (2013): Characterization of three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure. *Bioresource Technology* 150 (2013) 377–386
- Xia A., Murphy J.D. (2016): Microalgal Cultivation in Treating Liquid Digestate from Biogas Systems. *Trends in Biotechnology*, doi:10.1016/j.tibtech.2015.12.010 Available online 8 January 2016
- Lizzul, A.M., Hellier, P., Purton, S., Baganz, F., Ladommatos, N., Campos, L., 2014. Combined remediation and lipid production using *Chlorella sorokiniana* grown on wastewater and exhaust gases. *Bioresour. Technol.* 151, 12–18. doi:10.1016/j.biortech.2013.10.040
- Busi M.V., Barchiesi J., Martin M., Diego F. Gomez-Casati D.F. (2013): Starch metabolism in green algae. *Starch/Stärke* 2013, 00, 1–13 (DOI 10.1002/star.201200211)
- Chen C.-Y., Zhao X.-Q., Yen H.W., HoS.-H., Cheng C.-L., Lee D.-J., Bai F.-W., Chang J.-S. (2013): Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal* 78 (2013) 1–10
- Yarnold, J., Ross, I.L., Hankamer, B., 2016. Photoacclimation and productivity of *Chlamydomonas reinhardtii* grown in fluctuating light regimes which simulate outdoor algal culture conditions. *Algal Res.* 13, 182–194. doi:10.1016/j.algal.2015.11.001
- Postma P.R., Miron T.L., Olivieri G., Barbosa M.J., Wijffels R.H., Eppink M.H.M. (2015): Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresource Technology* 184, 297–304.
- Ursu A.-V., Marcati A., Sayd T., Sante-Lhoutellier V., Djelveh G., Michaud P. (2014): Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 157, 134-139.
- Gerde J. A., Wang T., Yao L., Jung S., Johnson L. A., Lamsal B. (2013): Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. *Algal Research* 2, 145-153.
- Hernández D., Riaño B., Coca M., García-González M.C. (2015): Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal* 262, 939–945.

II.4 Veröffentlichungen

Die Produktion stärkereicher Algenbiomasse, die Nutzung von Fermentationsabgasen und die Gewinnung von Proteinen aus Algenbiomasse wurde durch die Projektpartner Fraunhofer IGB, Subitec und Südzucker in Form von Vorträgen und Postern publiziert:

Poster:

C. Holdmann, U. Schmid-Staiger, R. Munkel, A. Laug, T. Hirth; A New Control System for Growth Optimization; Alg'n'Chem/Young Algaeneers Symposium; Montpellier/Narbonne 31.3.-3.4./3.-5.4.14

C. Holdmann, U. Schmid-Staiger, R. Munkel, A. Laug, T. Hirth; A New Control System for Growth Optimization; 7. Bundesalgenstammtisch; Köthen 3.-4.6.14

C. Holdmann, U. Schmid-Staiger, K. Frick, C. Hering, T. Hirth; Biorefinery Based on Carbon-rich Algae Biomass – Comparison of Indoor and Outdoor Algae Cultivation; Bioökonomiekongress Baden-Württemberg; Stuttgart 29.-30.10.14

S. Weickert, S. Welzmilller, P. Bergmann, P. Ripplinger, W. Trösch; Utilization of fermentation off-gas from a co-located bioethanol plant and production of starch-designed microalgae in flat panel airlift photobioreactors; 5th Congress of the International Society for Applied Phycology; Sydney, Australia 22.6.-27.6.14

S. Weickert, S. Welzmilller, P. Bergmann, P. Ripplinger, W. Trösch; Utilization of fermentation off-gas from a co-located bioethanol plant and production of starch-designed microalgae in flat panel airlift photobioreactors; Algae Biomass Summit; San Diego, California 30.9.-2.10.14

S. Weickert, S. Welzmilller, P. Bergmann, P. Ripplinger, W. Trösch; Utilization of fermentation off-gas from a co-located bioethanol plant and production of starch-designed microalgae in flat panel airlift photobioreactors; EABA Global Conference 2014, 8th International Algae congress; Florenz 1.12.-3.12.14

C. Holdmann, U. Schmid-Staiger, G. Brinitzer, K. Frick, C. Hering, T. Hirth; Biorefinery based on carbohydrate-rich algae biomass – Scale-up of a production process for starch-rich algal biomass; Algae event 2015; Wien, 2.6.15

H. Haußmann, C. Holdmann, U. Schmid-Staiger, W. Wach, M. Klingenberg, T. Hirth; Bio-raffinerie auf Basis kohlenhydratreicher Algenbiomasse; 8. Bundesalgenstammtisch, München 7.-8.9.15

Vorträge:

C. Holdmann, H. Haußmann, U. Schmid-Staiger, W. Wach, S. Weickert, P. Ripplinger, T. Hirth; Bio-raffinerie auf Basis kohlenhydratreicher Algenbiomasse; 7. Bundesalgenstammtisch; Köthen 3.-4.6.14

S. Weickert, P. Bergmann, A. Richter, Dr. P. Ripplinger, Prof. Dr. W. Trösch; Productivity comparison of the green alga *Chlorella sorokiniana* cultivated on fermentation gas and technical carbon dioxide using Flat Panel Airlift Photobioreactors; Young Algaeneers Symposium; Narbonne 3.-5.4.14

U. Schmid-Staiger; Ethanol aus Algen – eine neue Produktionsroute; BMEL Fachtagung Neue Biokraftstoffe; Berlin 2.-3.3.15

C. Holdmann, U. Schmid-Staiger, G. Brinitzer, K. Frick, C. Hering, T. Hirth; Biorefinery based on carbohydrate-rich algae biomass – Scale-up of a production process for starch-rich algal biomass; Biorefinery for Food, Fuels and Materials 2015 Symposium; Montpellier 15.-17.6.15

C. Holdmann, H. Haußmann, S. Weickert, U. Schmid-Staiger, W. Wach, M. Klingeberg, P. Ripplinger, T. Hirth, P. Bergmann; Bioraffinerie stärkehaltiger Mikroalgen; 8. Bundesallgenstammtisch, München 7.-8.9.15

U. Schmid-Staiger; Biorefinery based on starch-rich algae biomass; Close-out Conference EnAlgae; 29.9.15, Brüssel

Pressemitteilungen:

Eine Pressemitteilung wurde von Subitec und Südzucker in verschiedenen online-Medien lanciert.

http://subitec.com/_upl/de/_d/pm_subitecsuedzucker_final.pdf
(letzter Zugriff, 15.02.2016)

http://subitec.com/_upl/de/_d/gastbeitrag_e21magazin_subitec-1.pdf
(letzter Zugriff, 15.02.2016)

Literatur:

Barbarino E.; Lourenço S.O. (2005): An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *Journal of Applied Phycology* 17, 447–460.

Becker, E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25, 207–210. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.11.002

Behrens, P.W., Bingham, S.E., Hoeksema, S.D., Cohoon, D.L., Cox, J.C., 1989. Studies on the incorporation of CO₂ into starch by *Chlorella vulgaris*. *J. Appl. Phycol.* 1, 123–130.

Bondioli, P., Della Bella, L., Rivolta, G., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Rodolfi, L., Casini, D., Prussi, M., Chiaramonti, D., Tredici, M.R., 2012. Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. *Bioresour. Technol.* 114, 567–572. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.123

Brányiková, I., Maršáľková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., Vítová, M., 2011. Microalgae-novel highly efficient starch producers. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 766–776. doi:10.1002/bit.23016

Choi, S.P., Nguyen, M.T., Sim, S.J., 2010. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresour. Technol.* 101, 5330–5336. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.026

Geier, S.C., Huyer, S., Praebst, K., Husmann, M., Walter, C., Buchholz, R., 2012. Outdoor cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* for photobiological hydrogen production. *J. Appl. Phycol.* 24, 319–327. doi:10.1007/s10811-011-9729-5

Jakob, T., Wagner, H., Stehfest, K., Wilhelm, C., 2007. A complete energy balance from photons to new biomass reveals a light- and nutrient-dependent variability in the metabolic costs of carbon assimilation. *J. Exp. Bot.* 58, 2101–2112.

- doi:10.1093/jxb/erm084
- Liu, C.-P., Lin, L.-P., 2005. Morphology and eicosapentaenoic acid production by *Monodus subterraneus* UTEX 151. *Micron* 36, 545–550.
doi:10.1016/j.micron.2005.05.001
- Metting Jr, F.B., 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J. Ind. Microbiol.* 17, 477–489.
- Pirt, M.W., Pirt, S.J., 1977. Photosynthetic production of biomass and starch by *Chlorella* in chemostat culture. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 27, 643–650.
- Pohl, P., Ohlhase, M.K., Rautwurst, S.K., Baasch, K.L.-K., 1987. An inexpensive inorganic medium for the mass cultivation of freshwater microalgae. *Phytochemistry* 26, 1657–1659.
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Le Gouic, B., Couzinet-Mossion, A., Legrand, J., 2011. Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. *Bioresour. Technol.* 102, 150–158.
doi:10.1016/j.biortech.2010.06.153
- Vårum, K., M., Mykkestad, S., 1984. Effects of Light, Salinity and nutrient limitation on the production of beta-1,3-D-Glucan and exo-D-Glucanase activity in *Sekeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J Exp Mar Biol Ecol* 83, 13–25.
- Yao, C., Ai, J., Cao, X., Xue, S., Zhang, W., 2012. Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation. *Bioresour. Technol.* 118, 438–444. doi:10.1016/j.biortech.2012.05.030
- Yao, C.-H., Ai, J.-N., Cao, X.-P., Xue, S., 2013. Salinity manipulation as an effective method for enhanced starch production in the marine microalga *Tetraselmis subcordiformis*. *Bioresour. Technol.* 146, 663–671. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.134