

Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Verbundvorhaben: Antivirale Substanzen und Pigmente

Akronym:

AnViPi

Zuwendungsempfänger:

Teilvorhaben 1: Kultivierung

Institut: Ostbayerische Technische Hochschule Amberg-Weiden

Projektleiter: Prof. Dr. Christoph Lindenberger

Teilvorhaben 2: Downstream

Institut: TU-Berlin Lebensmittelbiotechnologie und -prozesstechnik

Projektleiter: Prof. Dr. habil. Cornelia Rauh

Förderkennzeichen:

Teilvorhaben 1: 22017518

Teilvorhaben 2: 2219NR287

Laufzeit:

01.10.2020 bis 30.09.2024

Monat der Erstellung:

12/2024

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 Nachhaltige Erneuerbare Ressourcen unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorenschaft.

Inhaltsverzeichnis

I. Kurzbericht	1
1. Aufgabenstellung	1
2. Planung und Ablauf des Vorhabens	1
3. Resümee der wesentlichen Ergebnisse	4
a) Arbeitspakete und Meilensteine	4
b) Zusammenfassung	7
II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse	8
1. Erzielte Ergebnisse	8
Arbeitspaket 1: Prozessführung aquatischer Bioprozesse	8
Arbeitspaket 2: Adaptive Prozessmodellierung	17
Arbeitspaket 3: Nutzung von Zelldebris als Substrat in Biogasanlagen	20
Arbeitspaket 4: EPS-Gewinnung	22
Arbeitspaket 5: Zellaufschluss und Wertstoff-Extraktion	25
Arbeitspaket 6: Untersuchung und Nutzung der Extrakte	43
Arbeitspaket 7: EPS Untersuchungen (OTH-AW Unterauftrag Anhang 2)	47
Arbeitspaket 8: Freilandbetrieb Technikumsanlage	48
Arbeitspaket 9: Bilanzierung und Bewertung der Wertschöpfungskette	53
2. Verwertung	58
a) Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen	58
b) Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende	58
c) Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende	58
d) Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit	59
e) Stand der Erreichung der in der Vorhabenbeschreibung aufgeführten Verwertungsoptionen, Forschungsdaten	59
3. Erkenntnisse von Dritten	64
4. Veröffentlichungen	65
ANHANG	66
Teilvorhaben 1: Kultivierung	66
1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens	66
2. Bearbeitete Arbeitspakete	66
Arbeitspaket 1: Prozessführung aquatischer Bioprozesse	66
Arbeitspaket 3: Nutzung von Zelldebris als Substrat in Biogasanlagen	67
Arbeitspaket 4: EPS-Gewinnung	67
Arbeitspaket 6: Untersuchung und Nutzung der Extrakte	68
Arbeitspaket 7: EPS Untersuchungen (OTH-AW Unterauftrag Anhang 2)	68
Arbeitspaket 8: Freilandbetrieb Technikumsanlage	68
Arbeitspaket 9: Bilanzierung und Bewertung der Wertschöpfungskette	68
3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens	69
Teilvorhaben 2: Downstreamprozesse	70
1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens	70
2. Bearbeitete Arbeitspakete	70

Arbeitspaket 2: Adaptives Prozessmodell.....	70
Arbeitspaket 5: Zellaufschluss und Wertstoffextraktion	70
Arbeitspaket 6: Produktcharakterisierung	72
Arbeitspaket 8: Testbetrieb unter Freilandbedingungen	72
3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens	73

I. Kurzbericht

1. Aufgabenstellung

Zielsetzung

Das Forschungsprojekt hatte das Ziel, eine dezentrale und ökonomisch tragfähige Wertschöpfungskette für *Arthrospira platensis* zu entwickeln und in einer relevanten Umgebung zu erproben. Dabei sollten zwei Hauptprodukte gewonnen werden: zum einen Exopolysaccharide (EPS) mit antiviraler Wirkung, die insbesondere in der Süßwasserfischzucht zur Bekämpfung des Koi-Herpes-Virus (KHV) Anwendung finden könnten, und zum anderen ein Phycocyanin-Extrakt, welcher als färbendes Lebensmittel für die Industrie Relevanz hat. Der für die Extraktion notwendige Zellaufschluss sollte mit Hilfe der innovativen Pulsed Electric Fields (PEF)-Technologie durchgeführt werden. Diese Technologie versprach energetische und prozesstechnische Vorteile.

Ein weiterer zentraler Aspekt des Projekts war die Integration dieser Wertschöpfungskette in bestehende Biogasprozesse. Dabei sollte untersucht werden, inwieweit sich die Rückführung der organischen Zelldebris nach der Wertstoffgewinnung für den Einsatz im Biogasprozess eignet. Zudem lag ein Schwerpunkt auf der Evaluierung und Optimierung verschiedener Kultivierungsverfahren und Reaktorsysteme, um eine möglichst effiziente Produktion beider Zielprodukte sicherzustellen. Ergänzend dazu war die Entwicklung eines selbstlernenden Prognosewerkzeugs geplant, das auf Basis von Wetterdaten optimale Erntezeitpunkte und -mengen vorhersagen konnte.

Im Bereich des Downstream-Processings wurde angestrebt, durch eine Kombination mechanischer Trennmethode, PEF-Technologie und wässriger Extraktion eine signifikante Effizienzsteigerung zu erzielen. Abschließend sollte eine umfassende Bilanzierung und Bewertung der gesamten Wertschöpfungskette erfolgen, welche die Stoff- und Energiebilanzen sowie eine ökonomische und ökologische Gesamtbewertung einschloss.

Rahmenbedingungen für die Durchführung

Die Durchführung des Vorhabens stützte sich auf eine Reihe günstiger wissenschaftlicher und infrastruktureller Rahmenbedingungen. An den beteiligten Forschungsstellen – der OTH Amberg-Weiden und der TU Berlin – standen zunächst Versuchseinrichtungen im Labormaßstab für die Kultivierung, Aufbereitung und Analyse von *A. platensis* sowie für erste Versuche zur PEF-Behandlung zur Verfügung. Auf dieser Grundlage konnte im Verlauf des Projekts ein Prozess im Technikumsmaßstab aufgebaut werden, um die entwickelten Prozesse im größeren Maßstab zu erproben und unter praxisnahen Bedingungen zu validieren.

Darüber hinaus bestanden etablierte Kooperationen mit Fischzuchtbetrieben, die als potenzielle Abnehmer der EPS-Produkte infrage kamen, sowie Kontakte zu Betreibern von Biogasanlagen, die grundsätzlich ein Interesse an einer Zusammenarbeit auf diesem Gebiet signalisiert hatten. Diese Partnerschaften ermöglichten es, wesentliche Fragen zur praktischen Einbindung der Wertschöpfungskette direkt an realen Schnittstellen zu adressieren.

Stand von Wissenschaft und Technik

Der Stand der Technik umfasste etablierte Verfahren zur Kultivierung von Mikroalgen in offenen und geschlossenen Systemen, wie etwa Raceway-Ponds, Blasensäulen oder Flat-Panel-Reaktoren, sowie mechanische Verfahren zum Zellaufschluss und zur Produktabtrennung, darunter Hochdruckhomogenisation und Ultraschall. Auch die Verwendung von Mikroalgenbiomasse in Biogasanlagen war grundsätzlich bekannt, stieß jedoch häufig aufgrund ungünstiger C/N-Verhältnisse an ihre Grenzen. Neuartig war im Rahmen dieses Projekts die gezielte Kombination dieser Einzelverfahren zu einer integrierten Prozesskette, die sowohl die Gewinnung extrazellulärer EPS aus dem Kulturüberstand mittels Filtrations- und Zentrifugationsverfahren als auch den Zellaufschluss durch PEF-Technologie zur schonenden Extraktion von Phycocyanin umfasste. Ergänzt wurde dies durch die anschließende Nutzung der entwerteten Restbiomasse als Co-Substrat in Biogasanlagen. In dieser Form einer abgestimmten Kaskadennutzung von *A. platensis* war ein vergleichbarer Ansatz in der internationalen Literatur bislang kaum beschrieben. Bestehende Projekte konzentrierten sich meist auf Teilaspekte wie die Kultivierung oder die Gewinnung einzelner Wertstoffe, ohne eine durchgehende Verknüpfung antiviraler EPS-Produktion, natürlicher Farbstoffgewinnung und energetischer Reststoffverwertung zu verfolgen.

2. Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen des Projekts, das in zwei Teilvorhaben untergliedert war, fokussierte sich das Teilvorhaben der OTH-AW auf die Kultivierung, während das der TU Berlin auf das Downstream-Processing ausgerichtet war. Diese Trennung zwischen Upstream- und Downstream-Prozessen war jedoch nicht strikt; einige Fragestellungen wurden standortübergreifend bearbeitet. Eine effiziente Zusammenarbeit und ein reger Wissensaustausch zwischen den Forschungsstellen waren durch kurze Kommunikationswege gesichert.

Das Projekt umfasste neun Arbeitspakete (APs), die entweder von einer Forschungsstelle allein oder in Zusammenarbeit bearbeitet wurden. Zusätzlich wurde das AP 7 in Kooperation mit dem Unternehmen Angewandte Biologie Kallert (im Unterauftrag) durchgeführt.

Übersicht der Arbeitspakete:

- AP 1: Prozessführung aquatischer Bioprozesse (OTH-AW) – Auswahl und Vergleich verschiedener Reaktortypen zur Optimierung der Kultivierung von *Arthrospira platensis* unter Berücksichtigung von Produktivität, Wirtschaftlichkeit und Nachhaltigkeit.
- AP 2: Adaptive Prozessmodellierung (TUB) – Entwicklung eines neuronalen Netzmodells zur prädiktiven Steuerung der Prozessparameter auf Basis von Wetterprognosen zur Maximierung der Biomasseproduktion.
- AP 3: Nutzung von Zelldebris als Substrat in Biogasanlagen (OTH-AW) – Untersuchung der Verwertung von Zellresten in Biogasanlagen zur Verbesserung der Kohlenstoffnutzung und Ertragsoptimierung.
- AP 4: EPS-Gewinnung (OTH-AW) – Entwicklung eines Filtrationsprozesses zur effizienten Gewinnung antiviraler Exopolysaccharide (EPS) aus der Kultivierung.
- AP 5: Zellaufschluss und Wertstoff-Extraktion (TUB) – Nutzung der PEF-Technologie zur effizienten Extraktion von Phycocyanin und Vergleich mit alternativen Zellaufschlussmethoden.
- AP 6: Untersuchung und Nutzung der Extrakte (TUB 80 %, OTH-AW 20 %) – Charakterisierung des Phycocyanin-Extrakts und Bewertung der Eignung als färbendes Lebensmittel unter Berücksichtigung ökonomischer und lebensmittelrechtlicher Aspekte.
- AP 7: EPS-Untersuchungen (OTH-AW) – Prüfung der Wirksamkeit der gewonnenen EPS in Tierversuchen zur Bekämpfung von Koi-Herpes-Viren (KHV) bei Karpfen.
- AP 8: Freilandbetrieb Technikumsanlage (OTH-AW 70 %, TUB 30 %) – Langzeittest der gesamten Prozesskette im Freilandmaßstab zur Überprüfung der Wirtschaftlichkeit und Nachhaltigkeit.
- AP 9: Bilanzierung und Bewertung der Wertschöpfungskette (OTH-AW 50 %, TUB 50 %) – Erstellung einer Öko- und Kostenbilanz basierend auf experimentellen und modellbasierten Untersuchungsdaten.

Jedes Arbeitspaket ist mit mindestens einem Deliverable verknüpft. In APs, die grundlegende Fragen für andere Arbeitspakete klären, wurden mehrere Deliverables definiert. Das Projekt umfasst außerdem drei Meilensteine:

- Meilenstein 1: Festlegung auf ein Reaktorsystem und ein mechanisches Downstream-Verfahren (bezogen auf AP 1).
- Meilenstein 2: Entwicklung eines Prozesses im Technikumsmaßstab (bezogen auf AP 8 und 9).
- Meilenstein 3: Abschluss des Projekts und erfolgreiche Umsetzung aller Arbeitspakete.

Aufgrund der COVID-19-Pandemie musste der anfängliche Zeitplan angepasst werden, und das Projekt wurde um 12 Monate verlängert. Dieser Bericht basiert auf dem zuletzt bewilligten Zeit- und Arbeitsplan (siehe Tabelle 1)

Projektkonsortium und Kommunikation:

Das Projekt wurde wissenschaftlich von Frau Prof. Cornelia Rauh (TU Berlin) und Herrn Prof. Christoph Lindenberger (OTH-AW) geleitet. An der Forschungsstelle der OTH-AW arbeiteten in den ersten zwei Projektjahren zwei wissenschaftliche Mitarbeiter in Teilzeit (jeweils 50 %). Im dritten und vierten Jahr wurde das Projekt durch eine Vollzeitstelle unterstützt. An der TU Berlin wurde das Projekt durch einen wissenschaftlichen Mitarbeiter in Vollzeit bearbeitet.

Die Kommunikation auf Arbeitsebene wurde von den wissenschaftlichen Mitarbeitern eigenständig organisiert. Regelmäßige Treffen zwischen wissenschaftlicher Leitung und wissenschaftlichen Mitarbeitern an den jeweiligen Forschungsstellen stellten die vertikale Kommunikation sicher. Zusätzlich fanden in regelmäßigen Abständen Online-Treffen statt, an denen alle Projektbeteiligten vertreten waren. Diese horizontalen und vertikalen Kommunikationsstrukturen wurden durch Forschungsaufenthalte der wissenschaftlichen Mitarbeiter an den jeweiligen Forschungsstellen unterstützt, die als wesentliches Instrument zur Vereinheitlichung der Arbeitsmethoden und zur Stärkung des Teamgeists dienten.

Die Berichterstattung und Kommunikation mit dem Fördergeber oblagen der wissenschaftlichen Leitung. Finanzielle Fragen wurden in Abstimmung mit der administrativen Ansprechperson der jeweiligen Forschungsstelle geregelt.

3. Resümee der wesentlichen Ergebnisse

a) Arbeitspakete und Meilensteine

Arbeitspakete (AP) (lt. Planung im Antrag)	Bearbeitungszeitraum (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
<p>AP 1 Prozessführung aquatischer Bioprozesse</p>	<p>10/2020 bis 05/2022</p>	<p>Ziel des AP1 war die Optimierung des Prozesses zur Steigerung der Produktivität der beiden Hochwertprodukte EPS und PC. Untersuchte Optimierungsparameter waren Temperatur, Licht, Reaktorgeometrie und Prozessfahrweise. Zudem wurde die Wirkung einer potenziellen Nährstofflimitierung auf den Prozess analysiert. Basierend auf den Ergebnissen wurde für den Technikumsmaßstab ein vertikaler Röhrenreaktor entwickelt (siehe AP8). Die optimale Prozessführung zeigte sich bei einer Betriebstemperatur von 35 °C, wobei eine Temperaturabsenkung in den Dunkelphasen keine signifikante Produktivitätssteigerung brachte. Kontinuierliche Prozesse wiesen eine geringfügig höhere Produktivität auf (unter 5 %), was jedoch innerhalb der biologischen Schwankung lag; daher wurde ein Repeated-Batch-Prozess bevorzugt. Die Erntezyklen wurden an die Lichtverhältnisse angepasst und betragen an sonnigen Tagen zwei Tage.</p> <p>Ein an dieses AP gekoppelter Meilenstein (M1) wurde erfolgreich nach dem zweiten Projektjahr erreicht. (Zielerreichung: 100%)</p>
<p>AP 2 Adaptive Prozessmodellierung</p>	<p>10/2020 bis 07/2022</p>	<p>Ziel des AP war die Entwicklung eines adaptiven Prozessmodells zur Vorhersage von Wachstumsraten und Biomassekonzentrationen von <i>A. platensis</i> basierend auf Licht, Temperatur und Biomassekonzentration. Mechanistische Wachstumsmodelle wurden implementiert und mit Wetterdaten des Deutschen Wetterdienstes gekoppelt, um realistische Umwelteinflüsse zu simulieren. Zur Kalibrierung wurden künstliche Trainingsdaten generiert, wodurch ANN- und kNN-Algorithmen trainiert und getestet wurden. kNN zeigte die beste Eignung zur zeitkontinuierlichen Vorhersage im Differenzialgleichungssystem. In ersten Freilandtests in einem 100-Liter-Reaktor konnten Harvesting-Strategien verglichen werden. Die Vorhersagequalität verbesserte sich nach sieben Tagen Training deutlich, und der relative Fehler stabilisierte sich bei 10–20 %. Komplexere Optimierungsalgorithmen, wie RL, wurden konzeptionell getestet, überstiegen jedoch den Projektumfang. (Zielerreichung: 100 %)</p>
<p>AP 3 Nutzung von Zelldebris als Substrat für die Biogasanlage</p>	<p>08/2022 bis 07/2023</p>	<p>Die Zielsetzung im AP3 war die Evaluierung, ob die Restbiomasse nach Entfernung der Hochwertprodukte zur Produktion von Biogas verwendet werden kann. Versuche zur Verwendung von Algenbiomasse mit unterschiedlichen Phycocyanin-Gehalten nach wässriger Extraktion zeigten, dass bei reduzierten PC-Gehalten eine Verwendung von Algenbiomasse durchaus als alleiniges Substrat in Biogasanlagen möglich ist. Jedoch zeigten maßstabmäßige Skalierungen, dass für einen Betrieb von Biogasanlagen ausschließlich mit Algenbiomasse eine Kulturgröße von 1.500 m³ erforderlich ist.</p> <p>Das Ziel des Arbeitspakets wurde erreicht, indem gezeigt wurde, dass eine Reduzierung des Proteingehalts (Phycocyanin-Extraktion) die Biogasproduktion positiv beeinflusst. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Verwertung der Algenbiomasse durch Zufütterung zu anderen Biogassubstraten noch besser ist.</p>
<p>AP 4 EPS-Gewinnung</p>	<p>09/2022 bis 03/2024</p>	<p>Das Ziel des AP war die Entwicklung einer Aufreinigungsstrategie für EPS aus dem Kulturüberstand. Hierzu wurden verschiedene mechanische Verfahren zur Abtrennung der Biomasse und zur Konzentrierung von EPS untersucht. Die kontinuierliche Zentrifugation erwies sich als am besten geeignet für die Biomasseabtrennung, da sie die</p>

Arbeitspakete (AP) (lt. Planung im Antrag)	Bearbeitungszeitraum (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
		Integrität der Biomasse am wenigsten beeinträchtigte. Für die Konzentrierung der EPS zeigte sich die dynamische Querstromfiltration als die effektivste Methode. (Zielerreichung: 100 %)
AP 5 Zellaufschluss und Wertstoff-Extraktion	10/2020 bis 09/2023	Das Ziel des AP 5 war der Zellaufschluss mit gepulsten elektrischen Feldern zur Extraktion des Wertstoffes Phycocyanin. Zentrales Ergebnis dieses Arbeitspakets war die große Wechselwirkung zwischen Kultivierungsbedingungen (Medienkomposition und Wachstumsphase) und dem Erfolg der PEF-Behandlung. So zeigte sich, dass der Ertrag nach der PEF-Behandlung von Zellen, die in salzreduziertem Nährmedium kultiviert wurden, größer war als bei Zellen, die in Standard-Medium kultiviert wurden. Dies hat zum einen den Vorteil, dass während der Kultivierung bis zu 95 % Salz eingespart werden kann und zum anderen die PEF-Behandlung dadurch unmittelbar im Nährmedium durchgeführt werden kann. Zur Maßstabsübertragung von Laborergebnissen auf den Technikumsmaßstab wurde im Rahmen dieses AP ein Modell entwickelt, mit dem sich Energieeinträge, mittlere elektrische Feldstärken und die Inhomogenität des elektrischen Feldes vom Labormaßstab auf größere Behandlungszellen übertragen lassen. Versuche im Technikum haben gezeigt, dass die im Labor ermittelten Prozessparameter (elektrische Feldstärke, spezifischer Energieeintrag) auch im Technikumsmaßstab für die kontinuierliche Behandlung Gültigkeit haben. Die Ergebnisse dieses Arbeitspakets haben außerdem gezeigt, dass die im Projektantrag formulierte Hypothese, dass die Zellmorphologie nach der PEF-Behandlung erhalten bleibt, nicht haltbar ist. (Zielerreichung: 100 %)
AP 6 Untersuchung und Nutzung der Extrakte	07/2023 bis 06/2023	Ziel des Arbeitspakets war es, die in AP5 gewonnenen Extrakte hinsichtlich ihrer Qualität und ihrer Eignung für den Einsatz in Lebensmitteln zu untersuchen. Als Vergleich wurden ebenso Extrakte mittels Hochdruckhomogenisator, Hochleistungsultraschall sowie Sprühtrocknung in Kombination mit einer wässrigen Extraktion hergestellt. Es konnte festgestellt werden, dass PEF im Vergleich zu den anderen Methoden einen vergleichbaren Ertrag bei ähnlichem bzw. niedrigerem spezifischen Energieeintrag brachte. Im Hinblick auf die qualitativen Eigenschaften war die PEF-Behandlung den anderen Methoden überlegen, was sich vor allem in einer deutlich höheren antioxidativen Kapazität zeigte. Untersuchungen zur Sekundärstruktur der Proteine im Extrakt zeigten außerdem, dass das PEF-Verfahren einen sehr geringen Einfluss auf die Struktur der Proteine hatte. Die hergestellten Extrakte zeigten eine Reinheit >0,7, womit sie aus rechtlicher Sicht als Lebensmittelfarbstoff zulässig sind. Weiterhin wurde der hergestellte Extrakt in Gummibärchen als färbende Lebensmittelzutat getestet. Dabei zeigte sich, dass der PEF-Extrakt als Farbstoff geeignet ist. (Zielerreichung: 100 %)
AP 7 EPS Untersuchungen (OTH-AW Unterauftrag Anhang 2)	10/2020 bis 12/2022	Durch die Firma ABK wurden die EPS zur Anwendung in der Teichwirtschaft untersucht. Hierzu sind unabhängige Versuchsreihen 2021 und 2022 durchgeführt worden. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass sich EPS nicht negativ auf die Teichwirtschaft auswirken; es konnte sogar eine signifikante Reduzierung im parasitären Befall festgestellt werden. (Zielerreichung: 100 %)
AP 8 Freilandbetrieb	03/2023 bis 08/2023	Für den Betrieb der Technikumsanlage wurde basierend auf den Ergebnissen aus AP1 ein Photobioreaktor (horizontaler Röhrenreaktor) konzipiert, aufgebaut und

Arbeitspakete (AP) (lt. Planung im Antrag)	Bearbeitungszeitraum (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
Technikumsanlage		<p>verfahrenstechnisch charakterisiert. Der Reaktor wurde unter Freilandbedingungen über einen Zeitraum von 25 Monaten betrieben, wobei verschiedene Ergebnisse aus AP1 erfolgreich reproduziert und verifiziert wurden. Hierbei wurde auch das Zusammenspiel zwischen Upstream- und Downstream-Processing untersucht. Es zeigte sich, dass das Repeated-Batch-Verfahren klare Vorteile für das Downstream-Processing bietet. Die Aufreinigung im Satzbetrieb erleichtert die Handhabung und sorgt für eine gleichbleibende Biomassequalität. Im Vergleich zum normalen Batchbetrieb reduziert der Repeated-Batch das zu verarbeitende Volumen, was die Effizienz und Handhabbarkeit weiter verbessert.</p> <p>Experimente mit zwei 120-Liter-Photobioreaktoren im Freilandbetrieb zeigten, dass das Vorhersagemodell aus AP2 die Produktivität steigern kann. Der durch das Modell optimierte Reaktor erzielte insgesamt höhere Produktivität, insbesondere unter wechselnden Umweltbedingungen, da das Modell Lichtverfügbarkeit und Wachstum besser berücksichtigte. Hitzestress reduzierte das Wachstum im Referenzreaktor stärker. Die Erntestrategie hatte keinen negativen Einfluss auf die Gehalte von EPS und Phycocyanin. Künftig sollte das Modell durch Integration von Wettervorhersagen und präziseren Analysemethoden weiter verbessert werden, um Wertstoffprodukte gezielt zu optimieren.</p> <p>(Zielerreichung: 100 %)</p>
AP 9 Bilanzierung und Bewertung der Wertschöpfungskette	10/2022 bis 09/2024	<p>Zum Bewerten der Wertschöpfungskette wurde eine Lebenszyklusanalyse für den Gesamtprozess erstellt. Diese Analyse ist für verschiedene Szenarien durchgeführt worden, um zu sehen, welche Erntezyklen sich am stärksten auf die Umweltbelastung und die CO₂-Bilanz auswirken. Aus diesen Ergebnissen ist auch abzusehen, dass die Prozessführung, die in AP1 entwickelt wurde, eine bessere Umweltverträglichkeit aufwies als Batchprozesse.</p> <p>(Zielerreichung: 100 %)</p>

Meilensteine (M) (lt. Planung im Antrag)	Fälligkeit (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
M 1 Festlegung Reaktortyp, Prozessführung und Downstream Processing	05/2022	<p>Das Ziel des Meilensteins wurde zu 100 % erreicht. Für die Kultivierung wurde ein Rohrreaktor nach dem Airlift-Prinzip ausgewählt, der im Repeated-Batch-Modus betrieben wurde. Im Bereich des Downstream-Prozesses fiel die Wahl auf eine Kombination von Tellerzentrifuge für die Biomasseabtrennung, dynamischer Querstromfiltration für die Konzentrierung von EPS und PEF-Technologie für die effiziente Extraktion von Phycocyanin.</p>
M 2 Freilandkultivierung im Technikumsmaßstab	09/2024	<p>Auf Grundlage der Ergebnisse der ersten Projektjahre wurde ein umfassendes Reaktorkonzept sowie eine optimierte Prozessfahrweise für den Technikumsmaßstab entwickelt. Langzeittests bestätigten, dass eine störungsfreie Kultivierung über einen längeren Zeitraum möglich war und die Ergebnisse unabhängig von der Prozessdauer reproduzierbar blieben. Die erfolgreiche Übertragung in den Outdoor-Betrieb wurde an der Forschungsstelle in Berlin durchgeführt. Das Ziel des Meilensteins wurde somit zu 100 % erreicht.</p>
M 3 Projektabschluss und Projektbericht	09/2024	<p>Das Projekt wurde aus wissenschaftlicher Sicht erfolgreich abgeschlossen, und die im Projektantrag definierten Zielsetzungen wurden vollständig erreicht. Der Projektbericht befindet sich derzeit in der Evaluierungsphase. Zielerreichung: 100 %.</p>

b) Zusammenfassung

Das Gesamtvorhaben konzentrierte sich auf die Entwicklung nachhaltiger und effizienter Prozesse zur Kultivierung von *Arthrospira platensis* sowie auf die Gewinnung von Phycocyanin (PC) und extrazellulären Polysacchariden (EPS). Dabei wurden zylindrische Glasreaktoren mit Wärmetauschern als optimale Kultivierungssysteme identifiziert. Unter Bedingungen von $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität und 35°C wurden hohe Produktivitäten erzielt, unterstützt durch die Entwicklung eines Medium-Recycling-Systems, das eine dreifache Wiederverwendung ohne Produktivitätsverluste ermöglichte. Die Restbiomasse erwies sich als effizientes Substrat für die Biogasproduktion, wobei PC-reduzierte Biomasse bis zu 300 L Biogas/kg lieferte. Ein selbst konstruierter vertikaler Röhrenreaktor mit Airlift-Prinzip bestätigte im Technikummaßstab seine Eignung für stabile Langzeitkultivierungen und erreichte maximale PC- und EPS-Produktivitäten von $1,28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ bzw. $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

Parallel dazu wurden innovative Verfahren zur Gewinnung der Wertstoffe entwickelt. Ein adaptives Prozessmodell, basierend auf Wetterdaten, optimierte die Erntesteuerung und erhöhte die Produktivität. Die PEF-Technologie (gepulste elektrische Felder) erwies sich als besonders energieeffizient und ermöglichte eine vollständige Freisetzung von PC bei hoher Produktqualität. Dafür war eine Feldstärke von 20 kV/cm und ein spezifischer Energieeintrag von 100 kJ/kg vorteilhaft. Die Behandlungstemperatur sollte nach Möglichkeit so hoch wie möglich, jedoch nicht über 45°C gewählt werden. Dies verbesserte zum einen den Behandlungserfolg und verhinderte die Schädigung des temperatursensitiven Phycocyanins. Mithilfe von Daten, die mittels CFD-Simulationen gewonnen wurden, konnte gezeigt werden, dass sich wichtige Prozessparameter wie die mittlere elektrische Feldstärke oder die Inhomogenität des elektrischen Feldes gut mit einfachen Modellgleichungen beschreiben lassen. Die Anpassung der Kultivierungsmedien reduzierte den Ressourceneinsatz und erleichterte die PEF-Behandlung direkt im Medium. PEF-Extrakte zeigten eine hohe antioxidative Kapazität und unveränderte Proteinstruktur, wodurch sie besonders für funktionelle Lebensmittel geeignet sind.

Die Ergebnisse der beiden Teilvorhaben unterstreichen die technische und wirtschaftliche Machbarkeit der nachhaltigen Produktion von *A. platensis*-basierten Wertstoffen. Die Kombination aus optimierten Kultivierungs- und Extraktionsverfahren maximiert sowohl die Ressourceneffizienz als auch die Produktqualität und legt eine solide Grundlage für industrielle Anwendungen.

II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

Arbeitspaket 1: Prozessführung aquatischer Bioprozesse

AP1 ist eines der umfangreichsten Arbeitspakete im Gesamtvorhaben und bezieht sich auf die Entwicklung des Upstream-Prozesses mit starker Rückkopplung aus den AP, die sich speziell mit der Aufarbeitung der Wertstoffe und dem Aufbau der Technikumsanlage beschäftigen.

An dieses AP waren auch die ersten Meilensteine des Projektes geknüpft: Festlegung Reaktortyp, Prozessführung und Downstream-Verfahren.

Neben der Erreichung der Meilensteine war von besonderem Interesse die Auswirkung von Licht, Temperatur und Prozessfahrweise auf die Produktivität der Hochwertprodukte.

Reaktoren

Zur Untersuchung des Einflusses der Reaktorgeometrie stehen mehrere Reaktorsysteme zur Verfügung, die sich in Geometrie, Lichteintrag, Mischverhalten, Material und Volumeninhalt unterscheiden. In Tabelle 2 sind die Reaktorsysteme, die im Rahmen des Projektes getestet wurden/werden sollen dargestellt.

Tabelle 2: Reaktorsysteme, die im Vorhaben auf Ihre Eignung untersucht werden.

Reaktor	Material	Abkürzung	Radius/ Eindringtiefe [cm]	V [l]	Wachstumsraten [d ⁻¹]
Blasensäule	Glas	PSM	2,5	1	1,7 (T = 30°C)
	Glas	BCR (15l)	7,5	15	1,4 (T = 26°C)
Hanging Bag Reaktor	PE	HBR(s)	3,3	variabel	1,7 (T = 30°C)
	PE	HBR(M)	5	variabel	1,7 (T = 30°C)
Flat Panel Reaktor	PC	FPR	0,2-2,5	6	1,7 (T = 30°C)
Closed Pond	Glas	CP(s)	variabel	variabel	1,4 (T = 26°C)
Horizontaler Airlift	Glas	PA	variabel	120	1,7 (T = 30°C)

Die erste Gruppe an Reaktoren, die getestet wurde, beinhaltet zwei zylindrische Reaktoren aus Glas (PSM) und PE (HBR(S)) sowie den Flat-Panel-Reaktor aus PC. Alle Reaktoren wurden bei identischen Prozessbedingungen betrieben und wiesen über den gesamten Kulturverlauf kaum Unterschiede in den Wachstumscharakteristiken und der EPS-Produktivität auf.

Somit ist die Lichtversorgung der Zellen in zylindrischen Reaktoren (Durchmesser 5 und 6,6 cm) vergleichbar mit dem Flat-Panel-Reaktor der Firma Subitech. Außerdem scheinen die verschiedenen Materialien (Glas, PE und PC) keinen Einfluss auf Wachstum und EPS-Produktion zu haben. Aufgrund der ähnlichen Leistungsfähigkeit der beiden Bauformen wurden die zylindrischen Reaktoren für weiterführende Versuche verwendet, da diese eine Temperaturregulierung mittels integrierter Wärmetauscher ermöglichen, was für die spätere Freilandkultivierung ausschlaggebend ist.

Eine weitere Gruppe von Reaktoren, die unter vergleichbaren Bedingungen miteinander verglichen wurden, waren Closed Ponds (Füllhöhe max. 20 cm) und zylindrische Reaktoren (Durchmesser 15 cm). Die Durchmischung der Closed Ponds wurde durch Begasung mit Tropfschläuchen (Bioverträglichkeit wurde separat getestet) erreicht. Die Beleuchtung des Closed Pond erfolgte direkt von oben, der Glaszylinder wurde einseitig beleuchtet. Die Kultivierungen im Glaszylinder zeigten ähnliche spezifische Wachstumsraten, jedoch konnte im BCR (15l) bis zu einer Biomassekonzentration von ca. $0,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ein exponentielles Wachstum erreicht werden, wohingegen im CP(s) bei einer Biomassekonzentration von $0,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ erste Limitierungen auftraten. Dieses Ergebnis und die Tatsache, dass ein variierender Sonnenstand bei den Freilandversuchen die Lichtversorgung von zylindrischen Reaktoren weniger negativ beeinflusst, als es bei Closed Ponds zu erwarten ist, führten dazu, dass in diesem Projekt von der Verwendung von Pond-Reaktoren im Freilandbetrieb abgesehen wurde.

Anhand der gesammelten Daten entstand ein Konzept für den Photobioreaktor im Technikumsmaßstab (vgl. AP 8). Alle Reaktoren, welche in dem Projekt verwendet wurden sind in Abbildung 1 dargestellt.

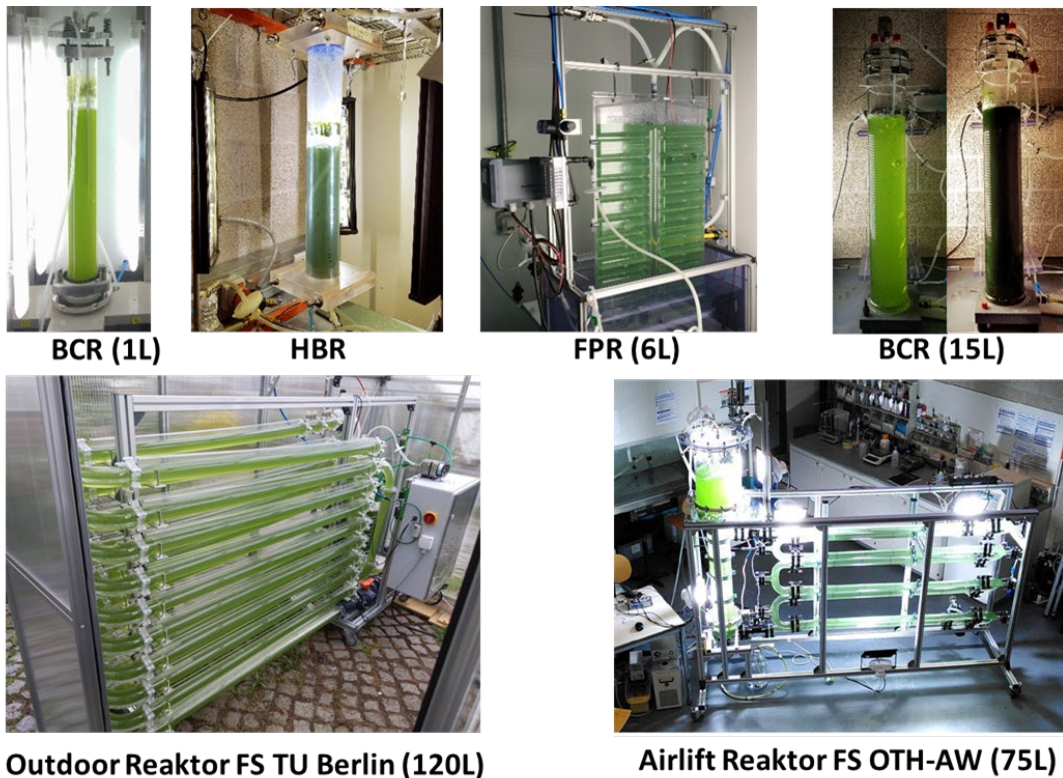


Abbildung 1 Darstellung verschiedener Reaktorsysteme, die im Rahmen des Forschungsprojektes verwendet wurden

Einfluss von Prozessparameter auf die Produktivität der Hochwertprodukte

Zur Untersuchung der Einflussfaktoren Licht und Temperatur auf die Produktivität der Biomasse, die Produktion von EPS und Phycocyanin sowie die Verbrauchsdaten von Phosphat und Nitrat wurde ein 4x4-faktorielles Design verwendet, das verschiedene Kombinationen von Temperatur und Lichtintensität abdeckte. Die niedrigsten getesteten Werte – eine Temperatur von 15 °C und eine Lichtintensität von $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ – lieferten jedoch keine verwertbaren Ergebnisse. Wie erwartet zeigte die Auswertung der Daten einen signifikanten Einfluss beider Parameter auf die Produktivität.

Die erhobenen Daten zum Biomassewachstum wurden außerdem zur Entwicklung eines einfachen kinetischen Modells herangezogen (nach J. Hahm, 2021). Dieses Modell diente im Projektverlauf immer wieder als Grundlage, um anhand von Kultivierungsdaten festzustellen, ob eine Limitierung durch Licht oder Nährstoffe vorlag. Im Folgenden werden die Parameter Licht und Temperatur getrennt voneinander analysiert. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass optimale Bedingungen bei einer Lichtintensität von $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und einer Temperatur von 35 °C gegeben waren.

Lichtintensität

Wachstumskinetik

Um den Einfluss der Lichtintensität auf Wachstums-, Substratverbrauchs- und EPS-Produktionsraten zu untersuchen, wurden Mitras Lightbars von GHIL (daylight 2) als Lichtquellen verwendet. Für die Untersuchungen des Einflusses der Lichtintensität auf die Wachstumskinetik wurde eine kontinuierliche Beleuchtung gewählt. Alle Versuche wurden unter Verwendung von SOT-Medium in Blasensäulen (HBR(s)) durchgeführt.

Der untersuchte Bereich richtete sich hierbei nach den Begebenheiten am Standort Amberg in Bayern, wo an sonnigen Tagen maximale Lichtintensitäten von $473 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ gemessen wurden.

Für die Bestimmung der Wachstumsparameter wurde das Wachstumsmodell durch eine nichtlineare generalisierte reduzierte Gradienten-Methode gleichzeitig an die Messergebnisse aller Kultivierungsversuche bei den variierten Lichtintensitäten und Temperatureinstellungen angepasst. Zielwert der Optimierung war ein Minimum der gewichteten Residuenquadratsumme, um die Unsicherheiten der aufgenommenen Trockenbiomassekonzentrationen für jeden einzelnen Messpunkt objektiv in die Regression miteinzubeziehen. Für die globalen Wachstumsparameter bei einer Temperatur von 30 °C ergaben sich $\mu_{\text{max}} = 0,071 \text{ h}^{-1}$ und $K_I = 41 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Mit diesen Werten konnte nun der Einfluss von Licht auf das Wachstumsverhalten vorhergesagt werden.

Bei allen Kultivierungen trat zu Beginn direkt ein exponentielles Wachstum auf, das je nach Lichtintensität durch den Self-Shading-Effekt in ein lineares Wachstum überging. In der stationären Phase wurde eine Biomassekonzentration von ca. $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erreicht. Bei allen Experimenten zum Lichteinfluss ließen sich die Kulturverläufe bis zur stationären Phase sehr gut durch die numerische Simulation beschreiben. Dadurch, dass keine Nährstoffe limitierend sind (siehe Verbrauchsdaten), kann hieraus geschlossen werden, dass das chemische Gleichgewicht von Hydrogencarbonat (HCO_3^-) und Carbonat (CO_3^{2-}) für die stationäre Phase verantwortlich gemacht werden kann. Diesem Effekt wird durch Medium-Recycling Rechnung getragen.

Phycocyanin

Für die Quantifizierung von Phycocyanin ist in diesem Projekt eine Extraktions- und Reinigungsmethode entwickelt worden. Die Entwicklung dieser Methode inklusive Verifizierung und Vergleiche mit anderen Methoden ist in diesem Bericht nicht explizit aufgeführt.

Zur Untersuchung des Einflusses von Licht auf die Phycocyanin-Bildung wurden Batch- und kontinuierliche Prozesse untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 und Tabelle 3 dargestellt. Für Lichtintensitäten unter $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ wurden bei beiden Betriebsarten ähnlich hohe spezifische Phycocyaninkonzentrationen (ca. $105 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) ermittelt. Bei höheren Lichtintensitäten wurden im kontinuierlichen Prozess höhere PC-Gehalte gemessen als in vergleichbaren Batch-Prozessen.

Werden anstatt der spezifischen Konzentrationen die Ausbeuten betrachtet, ergeben sich für Batch-Prozesse bei $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ die höchsten Konzentrationen mit $140 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Im kontinuierlichen Betrieb wurden bei $457 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ die höchsten Konzentrationen mit $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ festgestellt.

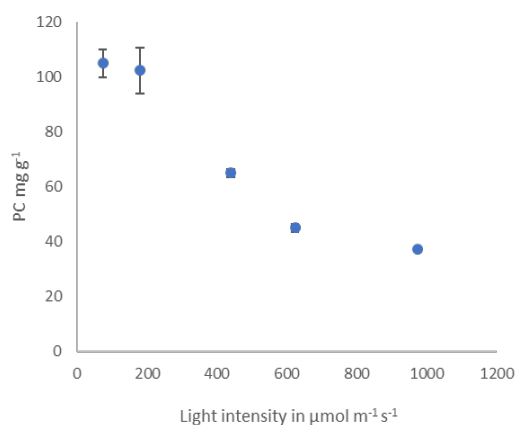


Tabelle 3 Lichteinfluss auf Phycocyanin Konzentration im kontinuierlichen Betrieb ($T=35 \text{ }^\circ\text{C}$)

Lichtintensität [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	Verdünnungsrate [d^{-1}]	PC-Konzentration [mg g^{-1}]
134	0,7	105,0
277	1,0	84,8
457	0,86	80,2

Abbildung 2 Einfluss der Lichtintensität auf die Phycocyaninproduktion im Batch Prozess ($T=35 \text{ }^\circ\text{C}$)

Bei den Kultivierungen unter Tageslichtbedingungen wurden bei simulierter Bewölkung höhere PC-Konzentrationen ($100,9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ bzw. $120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) gemessen als bei Kulturverläufen mit sonnigen Bedingungen ($79,1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ bzw. $94,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

EPS

Bei den Untersuchungen zum Einfluss der Lichtintensitäten wurde sowohl im Batchbetrieb als auch im kontinuierlichen Betrieb gearbeitet (Abbildung 3). Im kontinuierlichen Betrieb konnte kein signifikanter Einfluss der Lichtintensität auf die EPS-Konzentration und -Ausbeute gemessen werden, jedoch erreichte die Produktivität mit $0,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ bei $450 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ einen maximalen Wert. Die Ergebnisse aus dem Batchbetrieb zeigen einen deutlichen Einfluss der Lichtintensität auf Konzentration und Ausbeute der segregierten EPS, wohingegen der Einfluss auf die Produktivität nicht signifikant war. Die höchsten Konzentrationen wurden bei Lichtintensitäten von unter $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ gemessen ($>0,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); im kontinuierlichen Betrieb lagen in diesem Bereich der Lichtintensitäten die Konzentrationen um ca. 50 % niedriger.

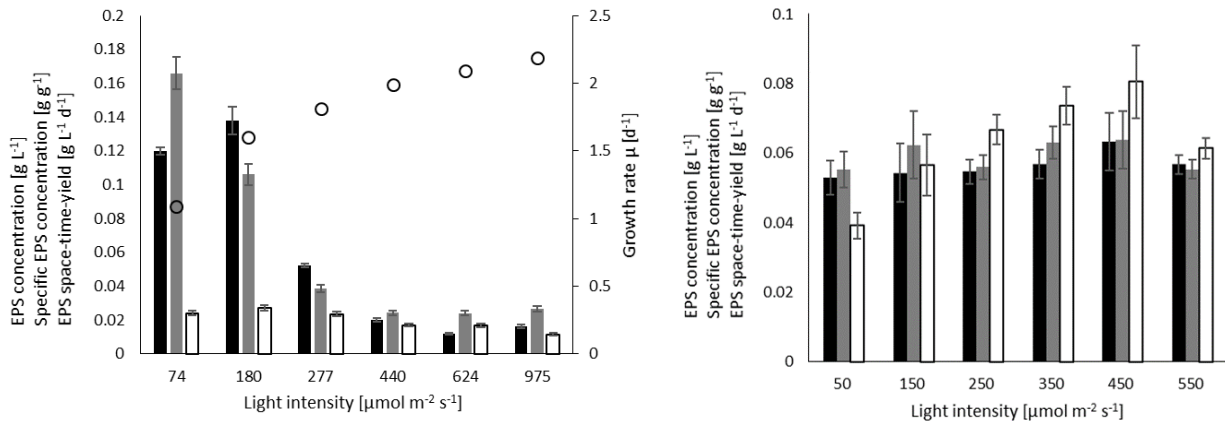


Abbildung 3 Einfluss von Lichtintensitäten auf die EPS Konzentration (schwarz), EPS Ausbeute (grau) und EPS Produktivität bei 35 °C (weiß) in Batchbetrieb (links) und im kontinuierlichen, turbidostaten Betrieb (rechts).

Bei den Untersuchungen zum Einfluss von Tageslichtbedingungen sind unterschiedliche Wetterphänomene durch Anpassung der Lichtintensitäten untersucht worden (vgl. Abbildung 3). An sonnigen Tagen war die Gesamtausbeute von EPS mit $0,17 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ trotz höherer Lichtintensität größer als an Tagen mit niedriger Lichtintensität, bei welchen $0,13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ gemessen wurden. Insgesamt war die Konzentration von EPS bei Kulturen unter Tageslichtbedingungen höher als bei den Versuchen mit kontinuierlichem Licht.

Temperatureinfluss

Wachstumskinetik

Beim Einfluss der Temperatur wurde das beste Wachstum der Kultur bei 38 °C beobachtet. Es wurde jedoch auch festgestellt, dass Temperaturen von 40 °C einen irreversiblen negativen Effekt auf das Wachstum hatten. Der Einfluss der Temperatur auf die Wachstumsgeschwindigkeit kann durch die Arrhenius-Gleichung

$$\mu_{max} = \mu_0 e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (1)$$

beschrieben werden.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass Kultivierungen bei Temperaturen höher als 25 °C keine Adaptierung der Vorkultur erforderten.

Phycocyanin

Der Einfluss der Temperatur auf den spezifischen PC-Gehalt der Zellen zeigt bei unterschiedlichen Lichtintensitäten ein Optimum bei 35 °C auf.

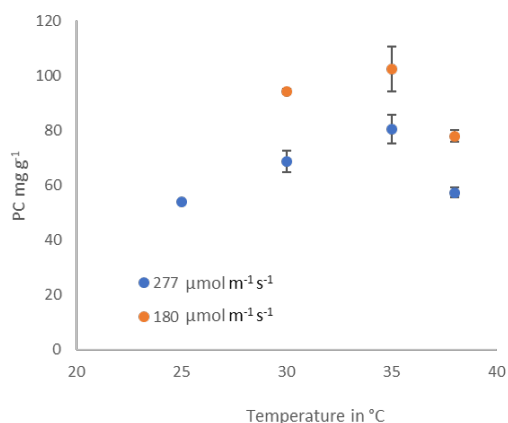


Abbildung 4 Temperaturabhängigkeit der spezifischen PC-Konzentration im Batchprozess (● 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; ● 277 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

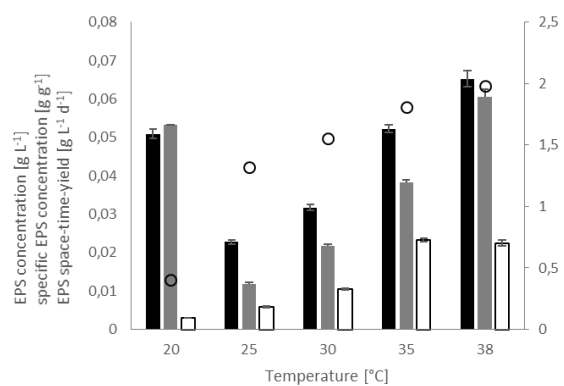


Abbildung 5 Einfluss der Temperatur auf die EPS-Produktivität bei einer Lichtintensität von 440 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

EPS

Die Untersuchungen zum Temperatureinfluss zeigen, dass Temperaturen zwischen 35 °C und 38 °C die höchsten Werte für EPS-Konzentration, -Ausbeute und -Produktivität liefern. Auch wenn bei 20 °C hohe Konzentrationen an EPS gebildet werden, ist die erreichte Produktivität zehnfach niedriger als bei 35 °C und 38 °C (vgl. Abbildung 4 und Abbildung 5).

Substratverbrauchsraten

Zur Bestimmung der Verbrauchsdaten von Phosphat und Nitrat wurden aus den Batchversuchen zum Temperatur- und Lichteinfluss Rückstellproben genommen, um den Einfluss der Prozessparameter auf die Substratausverbrauchsdaten zu untersuchen. Zur Untersuchung der Verbrauchsdaten wurde die Abnahme der Nährstoffe mit dem Biomassezuwachs verglichen.

Der Verbrauch von Phosphat korrelierte direkt mit der Biomassezunahme, und aus den Experimenten ($T \geq 25 \text{ °C}$) ließ sich ein Phosphatausbeutekoeffizient von $Y_{X/S} = 25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (g Biomasse pro g Phosphat) mit einer relativen Standardabweichung von 10 % ermitteln.

Bei keiner der durchgeführten Kultivierungen wurde mehr als 30 % der Phosphatquelle verbraucht.

Tabelle 4: gemessene und theoretische (in Klammern) Phosphat- und Nitratverbrauchsdaten

Phosphatverbrauchsdaten / $\frac{\text{mg}_{\text{Phosphat}}}{\text{g}_{\text{Biomasse}} \cdot \text{t}}$				Nitratverbrauchsdaten / $\frac{\text{mg}_{\text{Nitrat}}}{\text{g}_{\text{Biomasse}} \cdot \text{t}}$			
Temperatur / °C	Lichtintensität / $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$			Lichtintensität / $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$			
		427	271	130	427	271	130
	30	15,6 (8,6)	6,9 (6,1)	6,1 (5,4)	135(145,8)	84,1 (109,1)	106 (68,7)
	25	8,3 (5,8)	5,2 (3,3)	4,2 (3,1)	79,9 (109,9)	65,2 (69,6)	95 (88,3)
20	ND	5,9 (1,2)	ND	ND	49,4 (32,4)	ND	

Werden die Nitratausbeutekoeffizienten aus den experimentellen Daten ($T \geq 25 \text{ °C}$) ermittelt, so besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den am Ende des exponentiellen Wachstums errechneten Ausbeutekoeffizienten ($Y_{X/S_gemittelt} = 3,1 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$; g Biomasse pro g Nitrat) und den Ausbeutekoeffizienten am Ende der stationären Phase ($Y_{X/S_gemittelt} = 2,2 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$). Dieser Unterschied kann auf eine verstärkte Phycocyanin-Bildung in der stationären Phase zurückgeführt werden. Derartige Veränderungen sind in den theoretischen Werten nicht berücksichtigt, da von einer konstanten elementaren Zusammensetzung der Biomasse ausgegangen wird.

Im Zuge des Kultivierungsversuchs bei 20 °C wurden 75 % des Nitrats verbraucht, bei allen anderen Kultivierungen wurden maximal ein Drittel der Stickstoffquelle aus dem Kulturmedium entfernt. Die theoretischen Werte in Tabelle 4 beziehen sich auf die mittlere elementare Zusammensetzung von *A. platensis* ($\text{CH}_{1,650}\text{O}_{0,531}\text{N}_{0,170}\text{S}_{0,007}\text{P}_{0,006}$). In den meisten Fällen kann der Substratverbrauch über die theoretischen Werte abgeschätzt werden, um mögliche Verarmungen von Medienbestandteilen während der Kultivierungen vorherzusagen.

Einfluss Tag Nachzyklus

Das Biomassewachstum unter Tageslichtbedingungen lässt sich unter Verwendung der gleichen kinetischen Parameter, die für kontinuierliche Lichtverhältnisse ermittelt wurden, beschreiben. Lediglich für den Verlust von Biomasse während der Dunkelphasen muss eine Sterberate von $0,1 \text{ d}^{-1}$ in die Wachstumsgleichung einbezogen werden. In Abbildung 6 (links) sind die Wachstumsverläufe unter simulierten Tageslichtbedingungen dargestellt. Die Biomasse wurde auf zwei unterschiedliche Weisen gemessen, zum einen durch eine kontinuierliche In-situ-Messung mit einem Trübungssensor, und zum anderen über die $\text{OD}_{750 \text{ nm}}$ durch Probenahmen. Bemerkenswert ist hierbei die gute Übereinstimmung unseres Modells mit den Daten der Kultivierungen unter Tageslichtbedingungen, die ein mittleres Residuenquadrat (MQR) von 0,008 aufweisen.

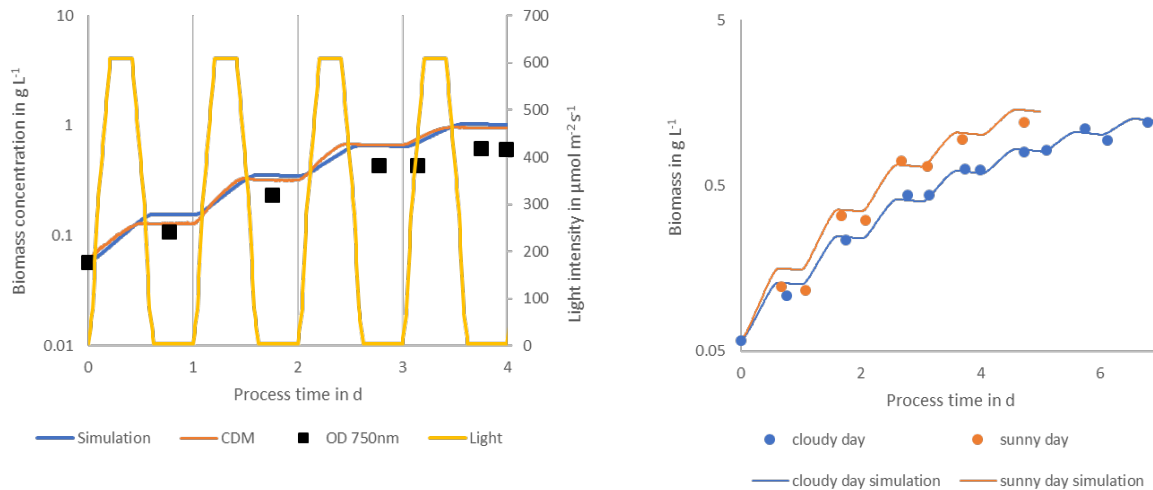


Abbildung 6 Links: Wachstumskurve (— Trübungssensor; ■ OD 750nm) unter Tageslichtbedingungen (— Lichtintensität mit $I_{max}=609\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) und zugehöriger Simulation (— Simulation); rechts: Gegenüberstellung Wachstumskurven unter sonnigen Bedingungen (● mit $I_{max}=609\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) und bewölkten Bedingungen (● mit $I_{max}=305\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) mit den jeweiligen Simulationsergebnissen (durchgezogene Linien).

Dieses Modell ermöglicht auch die Vorhersage von Biomassewachstum bei verschiedenen Wetterlagen. Abbildung 6 (rechts) zeigt eine Gegenüberstellung des Biomassewachstums an einem sonnigen und einem bewölkten Tag. Bei den Simulationen beider Kulturverläufe wurden die gleichen kinetischen Daten verwendet, jedoch unter unterschiedlichen Lichtbedingungen.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde untersucht, inwieweit sich die Temperatur während der Dunkelphasen auf die Konzentration und die Produktivität von Biomasse, EPS und Phycocyanin auswirkt. Um die Vorkulturführung zu vereinheitlichen, wurden die Kulturen bei kontinuierlichem Licht bis auf eine OD von 2 gezogen und anschließend zwei Dunkelphasen von jeweils 8 h (mit einer 14 h Hellphase bei $35\ ^\circ C$) induziert. Die erste Dunkelphase zeigte keine signifikanten Trends.

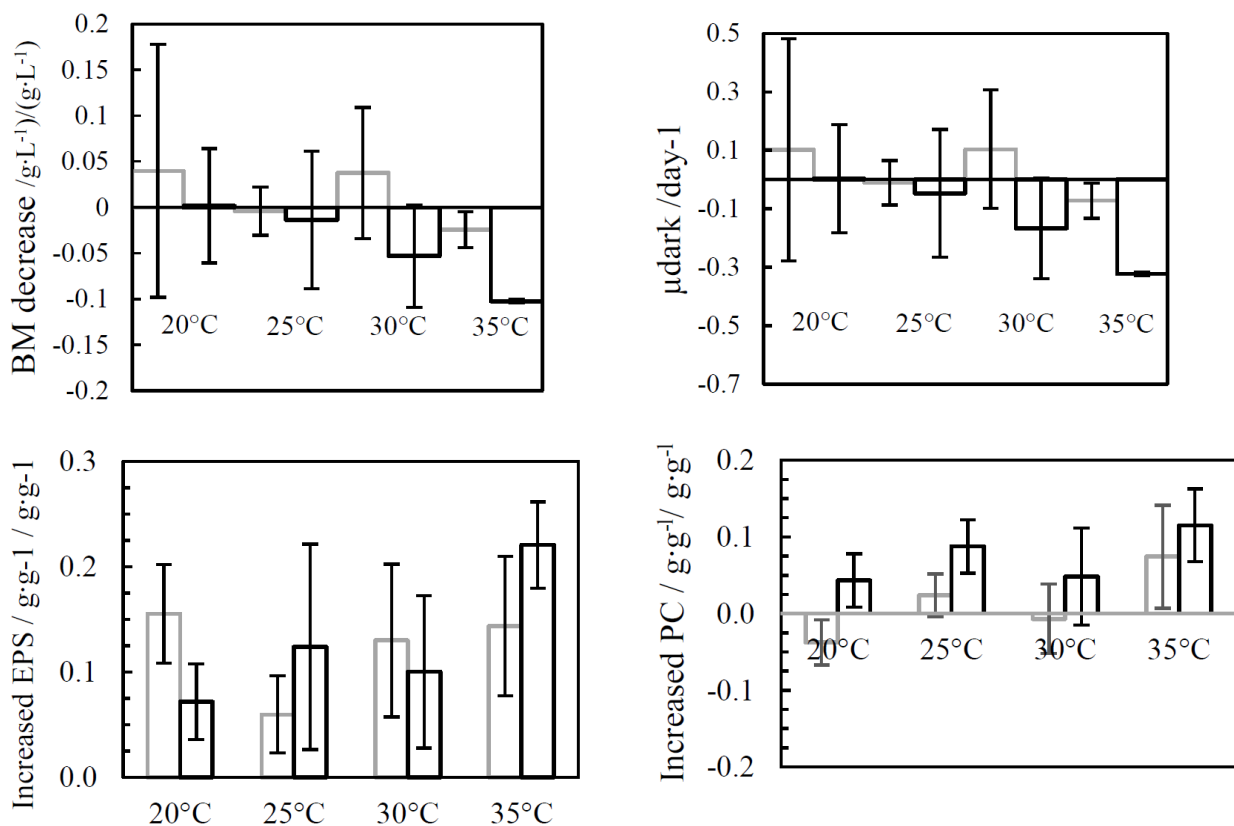


Abbildung 7 Einfluss der Temperatur während der zwei Dunkelphasen (erste Dunkelphase ■, zweite Dunkelphase ■) auf die Biomassenkonzentration (oben links), das Wachstum (oben rechts), EPS-Konzentration (unten links) und Phycocyanin Konzentration (unten rechts). Die Temperatur während der Hellphasen betrug $35\ ^\circ C$. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte von mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Bei der zweiten Dunkelphase waren bei 20 °C keine Verluste messbar, wohingegen sich die Biomasse bei einer Dunkelphase von 35 °C um 10 % verringerte. Bei den EPS gab es in beiden Dunkelphasen, unabhängig von der Temperatur, einen Anstieg der spezifischen EPS-Konzentration, der bei 35 °C am größten war. Bei Phycocyanin wirkte sich die zweite Dunkelphase ebenfalls positiv auf die spezifische Konzentration aus (Abbildung 7). Hier konnte gemittelt über alle Temperaturen eine Steigerung des PC-Gehaltes von 5 % erreicht werden.

Um zu sehen, wie sich diese Effekte auf den Gesamtprozess auswirken, wurden Versuche mit Dunkelphasentemperaturen von 35 °C und 25 °C durchgeführt und der Gesamtprozess betrachtet. Die Auswirkung der Temperatur auf den Phycocyanin-Gehalt in der Biomasse ist nicht signifikant, die erreichte spezifische EPS-Konzentration ist bei 35 °C ca. 50 % höher als bei 25 °C (vgl. Abbildung 8).

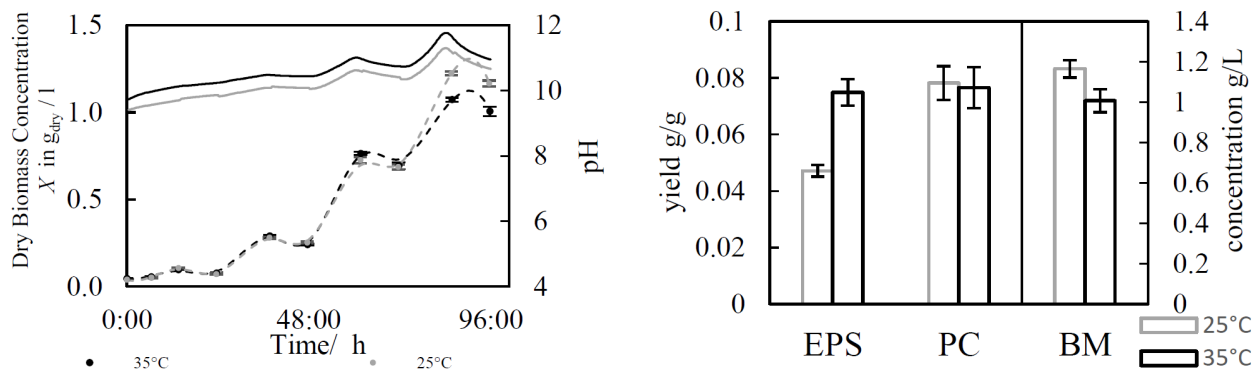


Abbildung 8 Tageslicht Kultivierungen bei Dunkelphasentemperaturen von 25°C (■) und 35°C (■) (links) und die erreichten spezifischen Konzentrationen von EPS, Phycocyanin und Biomasse (rechts).

Diese Versuche zeigen, dass ein Abkühlen des Reaktors während der Dunkelphasen, wie es von verschiedenen Literaturstellen empfohlen wird¹, keinen Verbesserungspotenzial für die in diesem Projekt gewählten Produkte hat.

Prozessführung

Wie schon bei der Simulation der Biomasseproduktivität postuliert, konnte auch in den experimentellen Versuchen im kontinuierlichen Betrieb (Chemostat) bei allen untersuchten Lichtintensitäten eine höhere Produktivität erreicht werden als im Batch-Betrieb (vgl. Abbildung 9).

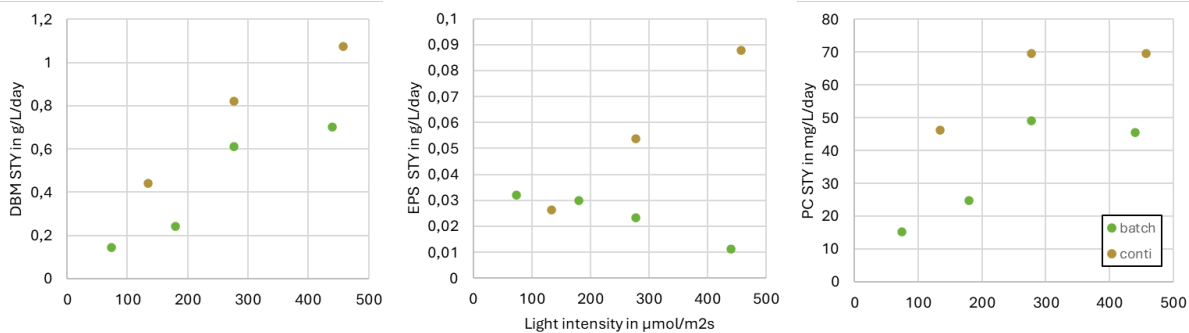


Abbildung 9 Vergleich der Produktivität für Biomasse, EPS und PC für Batch (●) und kontinuierliche Prozesse (chemostat) (●) bei verschiedenen Lichtintensitäten (T=35 °C, kontinuierliche Beleuchtung).

Während bei der spezifischen Produktivität (STY für space time yield) von Biomasse und PC der Unterschied zwischen den beiden Prozessstypen unabhängig von der Lichtintensität war, wurde die Differenz bei der EPS-Produktivität mit steigender Lichtintensität größer (vgl. Abbildung 9). Im Batch-Betrieb fiel die Produktivität mit steigender Lichtintensität um 70 % auf 0,01 g·L⁻¹·d⁻¹, wohingegen sich im kontinuierlichen Prozess die Produktivität der Polysaccharide auf 0,09 g·L⁻¹·d⁻¹ verdreifachte.

Der Unterschied zwischen Repeated-Batch- und chemostater Prozessführung unter Tag/Nachtzyklen wurde mithilfe des erstellten Wachstumsmodells evaluiert (vgl. Abbildung 10). Beide Betriebsarten wurden durch ein Gradientenverfahren hinsichtlich ihrer maximalen Biomasseproduktivität optimiert, wobei bei chemostaten Prozessen die Verdünnungsrate und im Repeated-Batch der Erntezyklus bzw. die Inokulationsbiomasse die Optimierungsvariablen darstellen.

¹ F. Arahou, R. Hassikou, M. Arahou, L. Rhazi, I. Wahby, *Aquacult Int*, DOI 10.1007/s10499-021-00730-5.

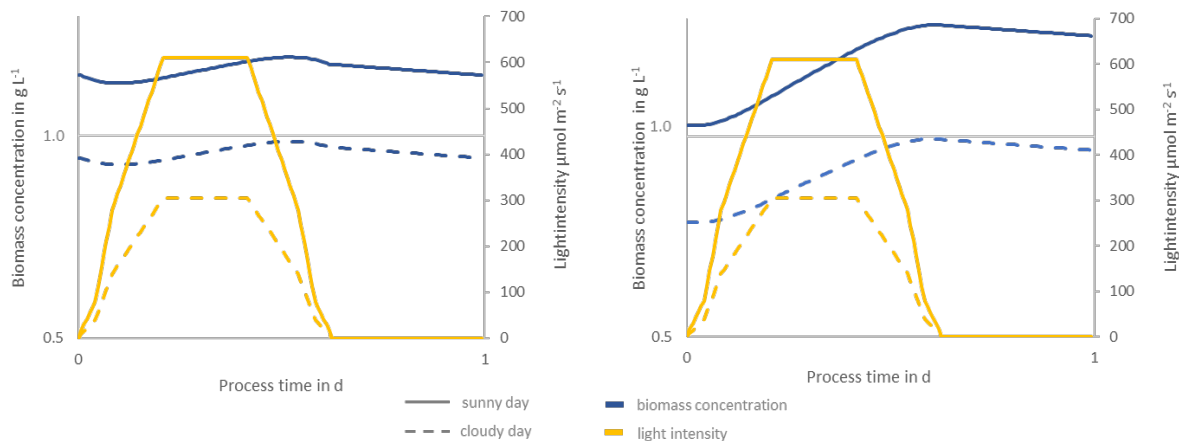


Abbildung 10 Simulationen zur optimalen kontinuierlichen Prozessführung (links) und optimalen Fed-Batch-Betrieb (rechts) bei verschiedenen Tageslichtbedingungen.

An sonnigen Tagen ergab sich bei chemostater Prozessführung eine Raum-Zeit-Ausbeute von $0,386 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, im Repeated-Batch wurden $0,375 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ erreicht, was einen Unterschied von 3 % ergibt. An bewölkten Tagen lag der Unterschied bei 2 %. Diese Unterschiede sind angesichts der biologischen Standardabweichungen nicht signifikant. Wegen der einfacheren Handhabung wurde daher der Repeated-Batch als Prozessfahrweise gewählt.

Anschließend wurden die Ergebnisse zu den Optimierungsvariablen (Erntezeitpunkt, Inokulationskonzentration und Mediumzusammensetzung) bezüglich der Bildung von Hochwertprodukten experimentell untersucht. Werden die Raum-Zeit-Ausbeuten betrachtet (vgl. Abbildung 11), so folgen die experimentellen Daten denen der Simulation, wobei die höchste Raum-Zeit-Ausbeute bei einem Erntezyklus von einem Tag und hohen Start-Biomassekonzentrationen erreicht wird. Vergleicht man jedoch die Produktivität ($\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$), so zeigt sich, dass bei Erntezyklen von zwei bis drei Tagen die höchsten Werte erzielt werden. Hier ist anzumerken, dass bezüglich des Downstream-Processings ein größeres Volumen, also längere Erntezyklen, vorteilhaft sind.

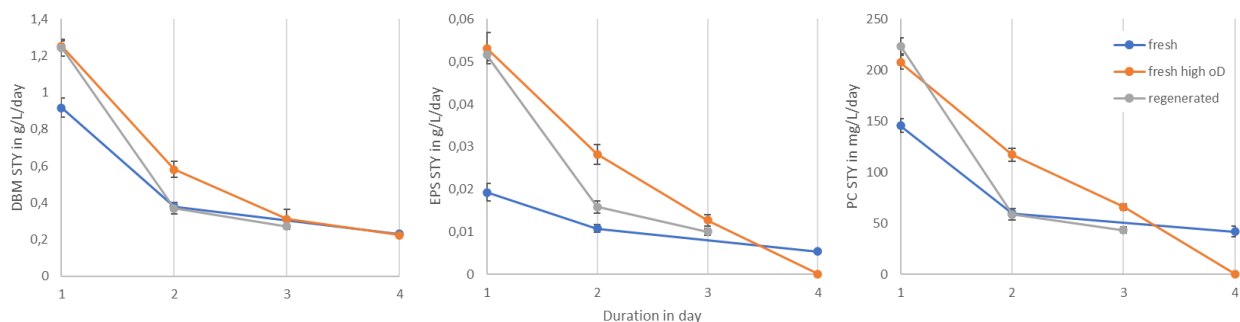


Abbildung 11 Auswirkung des Erntezyklus auf die Raum-Zeit-Ausbeute von Biomasse (links), EPS (mitte) und PC (rechts). Variiert sind die Biomassekonzentration zum Erntezeitpunkt (ca. $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ● bzw. $1,4 \text{ g L}^{-1}$ ●) als auch die Medien Komposition (regeneriertes Medium ●). Die Lichtversorgung erfolgte im Tageslichtmodus ($T=35^\circ\text{C}$, $I_{\text{max}}=475 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $I_{\text{avr}}=167 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Die Fehlerbalken beziehen sich auf drei unabhängige Versuchsreihen.

Ausgehend von diesen Daten kann die Produktivität eines Prozesses durch die Multiplikation mit dem Erntevolumen errechnet werden (vgl. Abbildung 12). Anders als bei der spezifischen Produktivität steigt die Gesamtproduktivität des Systems für Biomasse, EPS und Phycocyanin bei einer Verlängerung des Erntezyklus.

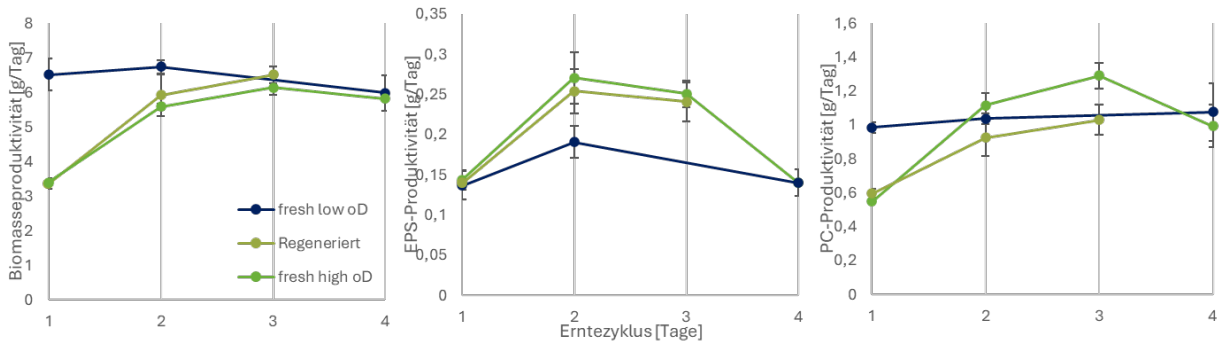


Abbildung 12 Auswirkung des Erntezyklus auf die Produktivität in $g\ d^{-1}$ von Biomasse (links), EPS (mitte) und PC (rechts). Variiert sind die Biomassekonzentration zum Erntezeitpunkt (ca. $1,0\ g\ L^{-1}$ • bzw. $1,4\ g\ L^{-1}$ ●) als auch die Medien Komposition (regeneriertes Medium ●). Werte sind errechnet für ein Arbeitsvolumen von 70 L. Die Fehlerbalken beziehen sich auf drei unabhängige Versuchsreihen.

Medium Recycling

Für den Betrieb des Hauptprozesses ist eine CO_2 -Zufuhr aus der Gasphase nicht vorgesehen. Dies führt dazu, dass der ansteigende pH-Wert die verfügbare Kohlenstoffquelle in einer Gleichgewichtsreaktion zu Carbonat umwandelt, wodurch sie für das Wachstum nicht mehr verfügbar ist. Da die Versuche zur Nährstofflimitierung zeigten, dass weder die Stickstoff- noch die Phosphatquelle begrenzend wirken, wurde untersucht, ob eine Regenerierung des Mediums durch permselektive Kationenaustauschermembranen möglich ist. Das Prinzip, schematisch in Abbildung 12 dargestellt, basiert auf dem Austausch von einwertigen Kationen (Na^+/K^+ aus der Nährlösung und H^+ aus einer gegenläufigen Säure). Dadurch kann der pH-Wert der Nährlösung auf den Ausgangswert von 8 bis 9 zurückgesetzt werden, bei dem das Hydrogencarbonat im Carbonatgleichgewicht dominiert.

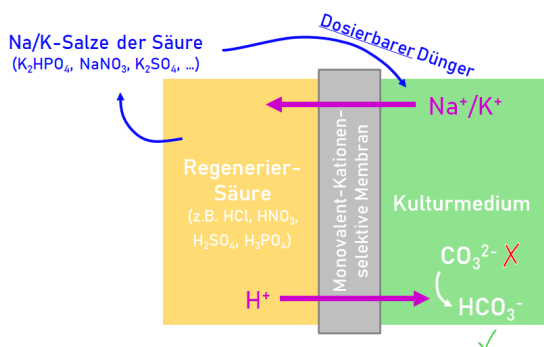


Abbildung 13: Schematisches Prinzip des vorgeschlagenen Regenerationsverfahrens „H⁺-Düngung mittels Säure-Diffusionsdialyse“

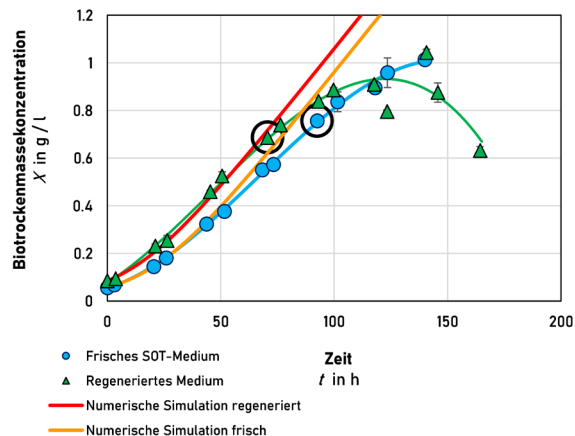


Abbildung 14: Vergleich der Wachstumsversuche von *A. platensis* in frischem und säure-regeneriertem SOT-Medium inklusive des Vergleichs mit der numerischen Wachstumssimulation

Die Versuche zur Wiederverwendbarkeit des regenerierten Mediums zeigten, dass das Medium bis zu dreimal regeneriert werden kann, ohne die Wachstumsrate zu beeinträchtigen. Lediglich die verringerte Pufferkapazität aufgrund des Hydrogencarbonatverbrauchs führt zu einem früheren Wachstumsstopp² (vgl. Abbildung 13). Dies kann jedoch durch eine gezielte Nachdosierung von Hydrogencarbonat ausgeglichen werden. Die Verwendung permselektiver Membranen stellt somit eine wirtschaftliche Methode dar, um den Einsatz von Nährstoffen zu optimieren und ermöglicht zudem einen geringeren Frischwasserverbrauch, was den ökologischen Fußabdruck reduziert.

² N. K. Z. AlFadhly, N. Alhelfi, A. B. Altemimi, D. K. Verma, F. Cacciola, *Plants (Basel, Switzerland)*, DOI 10.3390/plants11223063.

Arbeitspaket 2: Adaptive Prozessmodellierung Prozesssimulation von Photobioreaktoren

Es existieren bereits einige Publikationen, die sich mit der Prozesssimulation von Photobioreaktoren auseinandersetzen. Daher wurden geeignete, bereits publizierte mechanistische Wachstumsmodelle für *A. platensis* identifiziert und implementiert³⁴. Die Simulation beinhaltet gekoppelte Modelle zur Berechnung der Entwicklung der Biomasse- und Phycocyaninkonzentration anhand von Nitratgehalt, Lichtintensität und Temperatur. Die externen Einflussfaktoren Lichtintensität und Temperatur sind bei einer Outdoor-Kultivierung abhängig von den Wetterbedingungen des Standortes. Um Simulationen für unterschiedliche realistische Wettergegebenheiten durchführen zu können, wurden aus der Datenbank des Deutschen Wetterdienstes Datensätze für den stundenweisen Temperatur- und Helligkeitsverlauf innerhalb eines Jahres herangezogen. Anhand der in den Wetterdaten angegebenen Globalstrahlung wurde die für die Modelle notwendige photosynthetically active radiation (PAR) in $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ approximiert.

Kalibrierung eines bestehenden mechanistischen Modells und Erzeugung artifizierlicher Trainingsdaten

Zur Entwicklung eines adaptiven Prozessmodells ist es notwendig, verschiedene Sätze artifizierlicher Trainingsdaten zu generieren. Es wurde daher darauf verzichtet, reguläre Kalibrierungen an experimentellen Daten vorzunehmen. Das angestrebte adaptive Prozessmodell zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, während des Betriebs des Zielprozesses dessen Eigenschaften zu erlernen. Es wurden also verschiedene plausible Kalibrierungen der mechanistischen Modelle erstellt, die verschiedene Prozessvarianten darstellen und anhand derer die Übertragbarkeit des adaptiven Modells sichergestellt werden kann.

Zur Erstellung der artifizierlichen Trainingsdaten wurden die oben genannten Wetterdaten für die verschiedenen Temperatur- und Helligkeitsverläufe im Laufe eines Jahres verwendet. So konnten für einen individuellen Standort Wachstumskurven für die unterschiedlichen Wetterverhältnisse innerhalb eines Jahres simuliert werden. Diese konnten verwendet werden, um neben künstlichen neuronalen Netzen (engl. Artificial Neural Network: ANN) verschiedene Algorithmen zu trainieren, die für die Bildung eines adaptiven Prozessmodells in Betracht kommen. Es wurden ANN sowie k-nearest neighbors regression (kNN) Algorithmen trainiert. Die kNN ersetzen dabei die zu Anfang in Betracht gezogenen self-organizing maps (SOM), da die letzteren sich als nicht geeignet erwiesen. kNN ist als zugrunde liegender Algorithmus von SOM für die Approximation einer Ausgabe anhand der nächstliegenden bekannten Messpunkte verantwortlich und konnte daher hier verwendet werden. Die Algorithmen wurden jeweils verwendet, um die Wachstumsrate von *A. platensis* in Abhängigkeit von Licht, Temperatur und Biomassekonzentration zu approximieren. Die Approximation kann anschließend im Kontext eines Differenzialgleichungssystems genutzt werden, um die Biomassekonzentration zeitkontinuierlich vorherzusagen.

Validierung des trainierten KNN im Laborversuch

Die Qualität eines adaptiven Prozessmodells wird vor allem dadurch bemessen, wie gut ein Prozess prognostiziert werden kann, wenn nur eine limitierte Menge Trainingsdaten für die Bildung des Prozessmodells zur Verfügung steht. Daher konnte die Validierung der verschiedenen Prozessmodelle zunächst in silico erfolgen, indem die Prozessmodelle an den oben beschriebenen artifizierlichen Trainingsdatensets sukzessive für eine gewisse (simulierte) Zeitspanne trainiert wurden und anschließend die Vorhersagequalität für den (simulierten) Folgetag quantifiziert wurde. Die Vorhersagequalität des Folgetages wurde anhand der Differenz von prognostizierter und tatsächlicher (simulierter) Wachstumsrate quantifiziert sowie anhand der prozentualen Abweichung der prognostizierten Biomassekonzentration zur (simulierten) Biomassekonzentration des Folgetages. Das Training wurde jeweils für 30 (simulierte) Tage durchgeführt und die Fehler über alle Monate des Jahres gemittelt.

Zusätzlich wurden die entwickelten adaptiven Prozessmodelle an Wachstumsverläufen aus AP 1 getestet. Die Daten umfassen mehrere Wachstumsverläufe mit konstanter Temperatur und wechselnder Beleuchtung. In Abbildung 15 ist zu sehen, dass kNN und ANN sehr ähnliche Ergebnisse liefern. Die zunächst hohen relativen Fehler der Biomasseprognose sind auf die Akkumulation des Prognosefehlers über den Prognosezeitraum von 24 h zurückzuführen. Da die Modelle über kein Prozesswissen oder Vortraining verfügen, sind die Fehler anfangs entsprechend groß, werden aber nach einigen Tagen Training deutlich reduziert. Dieses Verhalten war zu erwarten. Spätestens nach 7 Tagen sind die Modelle so weit trainiert, dass sich der relative Fehler der Biomasseprognose im Bereich von 10–20 % einpendelt.

³ Dynamic Simulation and Optimization for *Arthrospira platensis* Growth and C-Phycocyanin Production E. A. del Rio-Chanona, D. Zhang, Y. Xie, E. Manirafasha, and K. Jing, Industrial & Engineering Chemistry Research 2015 54 (43), 10606-10614, DOI: 10.1021/acs.iecr.5b03102

⁴ O. Bernard, B. Rémond, Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth, Bioresource Technology, Volume 123, 2012, Pages 520-527, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.022>

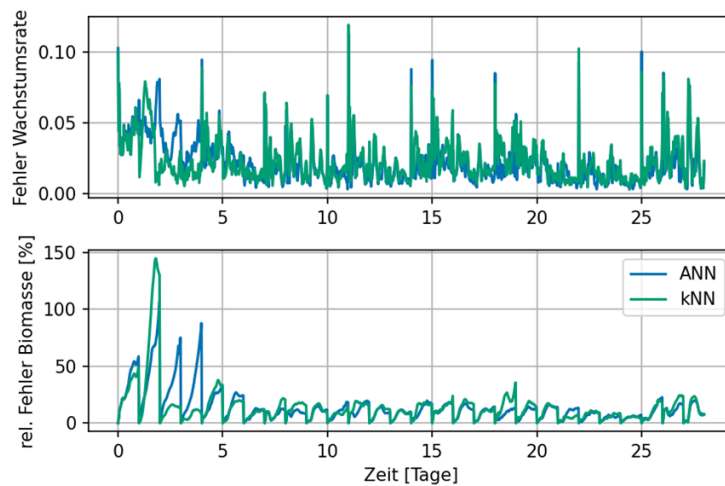


Abbildung 15: mittlere Fehler der Prognosen der adaptiven Prozessmodelle für den jeweiligen Folgetag, für die experimentellen Wachstumsdaten aus AP 1; Oben: Fehler der Wachstumsrate; Unten: relativer Fehler der Biomasseprognose

Erweiterung des KNN mit einem Optimierungsalgorithmus und Validierung der Prognose

Die Online-Optimierung von Bioprocessen und Freilandbedingungen hat sich als deutlich komplexer herausgestellt als in der Antragstellung vorhergesehen. Unter der Annahme einer kontinuierlichen oder semi-kontinuierlichen Prozessführung hängt die Profitabilität von Prozesspfaden immer auch von den in Zukunft gewählten Steuerentscheidungen und Prozesspfaden ab. Es entsteht eine rekursive Abhängigkeit von zukünftigen Prozesszuständen und -steuerentscheidungen.

Bildlich gesprochen ist von einem Bioprocess, der anfangs nicht abgeerntet wird, mehr Ertrag zu erwarten als von einem, der permanent geerntet und verdünnt wird. Ersterer ist aber nur dann profitabler als Letzterer, wenn zu einem zukünftigen Zeitpunkt t die gewachsene Biomasse auch abgeerntet wird. Diese Art rekursives Kontrollproblem kann durch bestärkendes Lernen (Reinforcement Learning, RL) gelöst werden. Allerdings sind die notwendigen Algorithmen ausgesprochen komplex und benötigen viele Iterationen, um tatsächlich profitable Steuerstrategien zu entwickeln. Die Erweiterung des KNN durch einen Optimierungsalgorithmus zur Maximierung der Produktivität eines Bioprocesses bei Freilandbedingungen übersteigt daher deutlich den in diesem Arbeitspaket gegebenen Zeit- und Aufwandsrahmen.

Zur Verifizierung dieses Ansatzes wurden Tests mit modellbasiertem RL durchgeführt. Dieser Teilbereich des RL befasst sich mit dem zeitgleichen Trainieren von Prognosemodell und Steuerungsoptimierung. (vereinfachtes Schema in Abbildung 16).

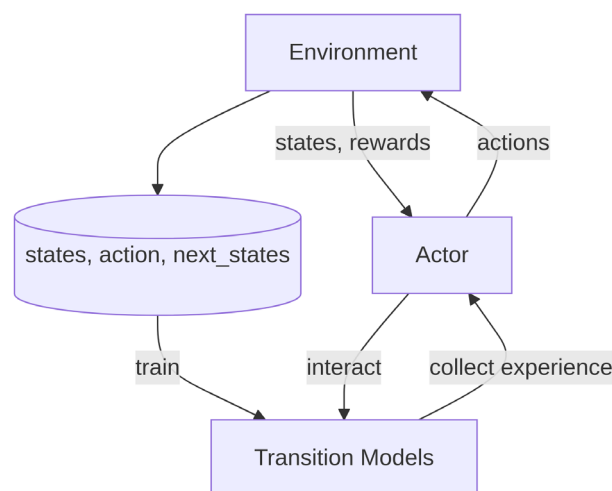


Abbildung 16: vereinfachtes Schema zu modellbasiertem reinforcement learning; Environment: zu steuernder Prozess; Actor: trainierbare Steuerung; Transition Model: adaptives Prozessmodell

Abbildung 17 zeigt beispielhaft den Verlauf eines RL. Da der Agent (trainierbare Steuerung) keinerlei Prozessvorwissen hat, ist es nicht überraschend, dass zunächst zufällige Steueraktionen getestet werden und viele Prozessepisoden scheitern (zu viel Biomasse geerntet wurde und die Biomassekonzentration unter einen Schwellwert fällt). Der Graph veranschaulicht, warum zunächst *in silico* trainiert werden muss, um hohe Kosten und fatale Prozessverläufe zu vermeiden. Man sieht aber auch deutlich, dass der Agent nach einiger Zeit lernt,

den Prozess so zu steuern, dass nachhaltig Ertrag generiert wird (siehe lineare Steigungen im 'reward'-Plot von Abbildung 17).

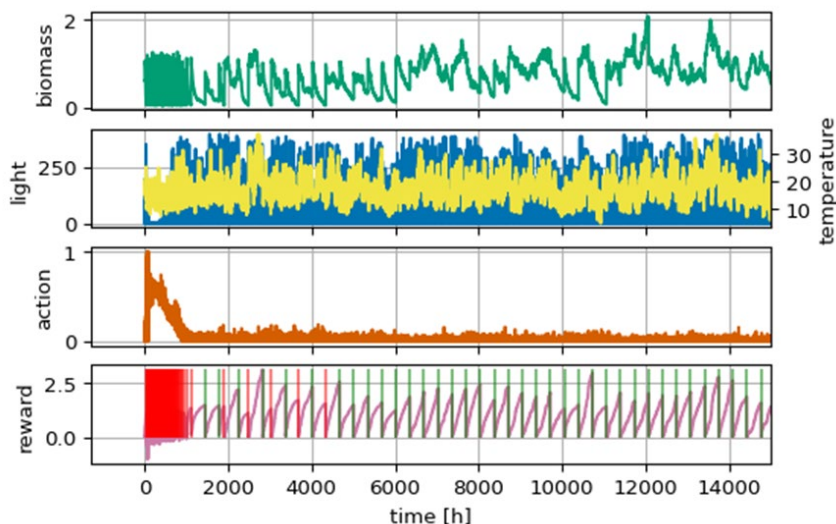


Abbildung 17: Verlauf eines RL bei Biomassewachstum das sich in Abhängigkeit von Temperatur, Licht und Biomassekonzentration verändert. 'action' im dritten Plot beschreibt die erlernte Steueraktion (Anteil Biomasse zu ernten in der nächsten Stunde); 'reward' im vierten Plot ist die kumulierte Belohnung der jeweiligen Episode mit der das RL trainiert wird und skaliert linear mit dem erzielten Ertrag; vertikale Linien im vierten Plot: rot=gescheiterte Episode, grün=erfolgreiche Episode

Test des KNN Modells an verschiedenen Reaktortypen

Durch die Verwendung verschieden kalibrierter mechanistischer Modelle in silico wurde bereits die Übertragbarkeit zwischen verschiedenen Prozessvarianten getestet.

Die Übertragbarkeit des RL wurde ebenfalls in silico getestet, durch eine Veränderung der Parametrisierung des zugrundeliegenden Prozessmodells. Abbildung 18 zeigt, wie schnell ein vortrainierter RL-Agent mit vortrainiertem Prognosemodell an neue Umgebungen angepasst werden kann.

Eine vortrainierte adaptive Prozesssteuerung, die auf RL basiert, sollte also geeignet sein, schnell auf neue Reaktorgeometrien und Organismen übertragen zu werden, sofern genügend Gemeinsamkeiten zwischen Vortraining und neuem Prozess bestehen.

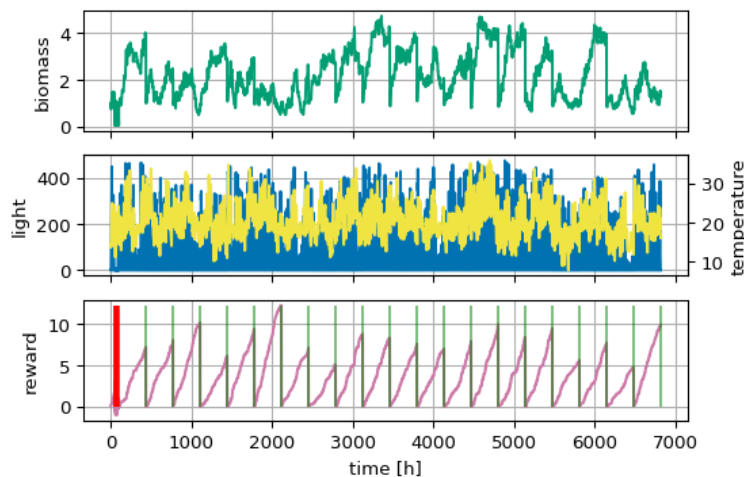


Abbildung 18: Trainingsverlauf des RL-Agenten bei Übertragung auf ein neu parametrisiertes Prozessmodell

Test des KNN Modells unter Freilandbedingungen inkl. Bestimmung der Produktivitätssteigerung

Das Verhalten unter simulierten Freilandbedingungen wurde in den vorangegangenen Abschnitten bereits beschrieben. Die Optimierung der Prozesspfade kann eher als Machbarkeitsstudie angesehen werden und war deutlich komplexer, als im Projektantrag vorhergesehen. Daher, und mangels einer etablierten Referenz, konnten keine konkreten Werte für die Produktivitätssteigerung ermittelt werden.

Das hier beschriebene Vorhersagemodell wurde in AP8 auf einen 100-Liter-Outdoorreaktor angewendet. Als Vergleich diente ein baugleicher Reaktor, bei welchem die Erntemengen mit einem mechanistischen Wachstumsmodell berechnet wurden.

Arbeitspaket 3: Nutzung von Zelldebris als Substrat in Biogasanlagen

Die Übergeordnete Zielsetzung des AP3 war die Verwendbarkeit von der Restbiomasse in Biogasanlagen. Basierend auf den Ergebnissen sollte dann eine Maßstabsabhängige Skalierung stattfinden.

Vorbereitende Analysen und Methodenentwicklung

Um die Verwendbarkeit von Algenbiomasse in Biogasanlagen gezielt zu untersuchen, wurden zunächst umfassende Analysemethoden entwickelt und validiert. Neben der Bestimmung des FOS/TAC-Wertes, der das Verhältnis von flüchtigen organischen Säuren (FOS) zur alkalischen Pufferkapazität (TAC) beschreibt und somit Hinweise auf die Stabilität des Gärprozesses liefert, wurde eine Gaschromatographie-(GC)-Methode zur detaillierten Analyse des Säureprofils der Gärreste etabliert. Zusätzlich wurden Methoden zur Messung des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC) und des gelösten anorganischen Kohlenstoffs (DIC) entwickelt, um den Kohlenstoffgehalt in den Proben präzise zu erfassen. Diese Methoden dienen der Überwachung und Optimierung der Abbauprozesse in der Biogasanlage und stellen sicher, dass eine genaue Bewertung der Abbaupotenziale der Algenbiomasse möglich ist. Für detaillierte methodische und technische Informationen wird auf die entsprechenden Zwischenberichte verwiesen.

Vergärung von Algenbiomassen mit unterschiedlichen Phycocyanin-Gehalten

Im Rahmen der Untersuchungen zur Vergärbarkeit von Algenbiomasse wurde nach VDI 4630 ein Batch-Gärtest in Eudiometern durchgeführt, um das Faulverhalten und die Biogasausbeute von *Arthrospira platensis* mit verschiedenen Phycocyanin-(PC)-Gehalten zu analysieren. Zur Reduktion des PC-Gehalts wurde eine wässrige Extraktion angewendet, sodass Biomassen mit 80 % und 60 % der ursprünglichen PC-Konzentration erreicht wurden. Die verbleibenden Farbstoffgehalte in den Biomassen wurden nach dem Extraktionsschritt quantifiziert.

Für die Gärversuche wurden sowohl Vergleichsschlamm als auch Impfschlamm aus der kommunalen Kläranlage Amberg-Kümmersbruck genutzt. Der Vergleichsschlamm diente als Referenz, während der Impfschlamm neben seiner Funktion als Animpfmaterial auch als Blindwert für die Biogasproduktion verwendet wurde. Die Versuchsreihen wurden mit den Algenbiomassen in PC-Konzentrationen von 100 %, 80 % und 60 % sowie mit dem Vergleichsschlamm und dem Impfschlamm in unabhängigen Triplikaten durchgeführt.

In Abbildung 19 sind die Verläufe der Biogasproduktion über den Prozesszeitraum von 20 Tagen dargestellt. Die kumulierten Biogaserträge, dargestellt im rechten Diagramm, zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Algenproben ($F(2,94) = 2,0$; $p > 0,05$), wie die Varianzanalyse und die Fehlerbalken verdeutlichen. Die Auswertung der Gärtests zeigt jedoch deutliche Unterschiede in den Biogaserträgen: Die Referenzbiomasse erreichte eine Biogasausbeute von $400 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$, die Algenbiomasse mit 60 % des ursprünglichen PC-Gehalts erzielte $300 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$, während die unbehandelte Algenbiomasse lediglich $100 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$ Biogas produzierte. Diese Werte lassen darauf schließen, dass ein höherer Phycocyanin-Gehalt in der Algenbiomasse möglicherweise eine inhibierende Wirkung auf die Biogasproduktion hat, da die Algenproben bei gleichen Aufschlussbedingungen unterschiedliche Erträge aufwiesen.

Obwohl keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden, können erste Aussagen zur Vergärbarkeit von Algenbiomassen getroffen werden. Alle untersuchten Proben zeigen gemäß der VDI-Richtlinie einen verzögerten Abbau, wobei der charakteristische steile Anstieg in den ersten Tagen des Gärtests ausbleibt. Bei den Triplikaten mit den höchsten Biomasseerträgen zeigen sowohl die Referenzprobe als auch die Algenbiomasse mit dem geringsten PC-Gehalt einen normalen Verlauf der Biogasproduktion gemäß VDI-Definition, wobei der Anstieg der Biogasproduktion der Referenzbiomasse stärker ausgeprägt ist als bei den Algenbiomassen.

Die gemittelten Verläufe der Biogasproduktion verdeutlichen, dass die Biogasausbeuten der Algenbiomassen insgesamt geringer ausfielen und mit höherem PC-Gehalt weiter abnahmen. Hier kann festgehalten werden, dass Biomasse von *A. platensis* generell vergärbar ist und eine Verringerung des PC-Gehalts sich positiv auswirkt. Speziell im Falle einer Zufütterung von Algenbiomasse in einen bestehenden Biogasprozess sollten keine Probleme entstehen.

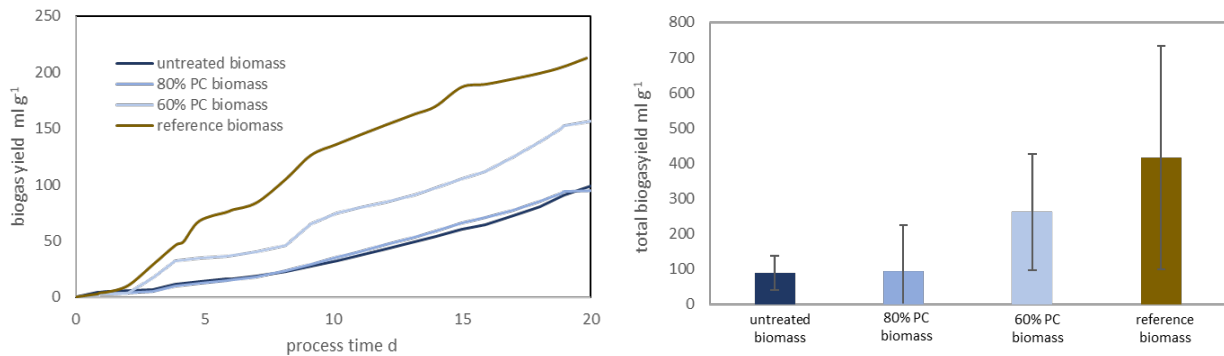


Abbildung 19 Biogasentwicklung für bei der Vergärung von Algenbiomasse (— unbehandelte Biomasse, — Biomasse mit 80% PC-Gehalt, — Biomasse mit 60% PC-Gehalt, — Referenzbiomasse) Biomasse, bereinigt um den Blindwert bezogen auf die Gasentwicklung des Impfschlammes. Biogasentwicklung über einen Zeitraum von 20 Tagen (links) und die akkumulierten Biogasausbeuten (rechts). Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Ergebnisse der Proximate-Analyse und Einfluss von Phycocyanin

Sowohl die unbehandelte als auch die behandelte Algenbiomasse wurde im Rahmen einer umfassenden Proximate-Analyse untersucht, um grundlegende Parameter für die Bewertung der Biogasproduktion zu ermitteln (siehe Abbildung 20). Die Biomassen wurden zunächst lyophilisiert, um sie in einem einheitlich trockenen Zustand zu analysieren. Anschließend erfolgten Untersuchungen zu verschiedenen Kennwerten: Aschegehalt (ASH), flüchtige Feststoffe (VS), Gesamtorganischer Kohlenstoff (TOC) und Brennwert (CV). Diese Parameter bieten wertvolle Einblicke in die Zusammensetzung und das potenzielle Verhalten der Biomasse im Gärprozess⁵.

Die Wassergehaltsangaben (TS und MC) variierten prozessbedingt, wurden jedoch für die Analyse auf einen niedrigeren Feuchtegehalt eingestellt, um Vergleichbarkeit zwischen den Proben zu gewährleisten. Die Analyseergebnisse zeigten Unterschiede zwischen Biomassen mit und ohne Phycocyanin, jedoch waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant.

Ein relevanter Befund war der höhere TOC-Gehalt in Proben mit reduziertem Phycocyanin-Gehalt, was auf eine Verschiebung des N:C-Verhältnisses zugunsten eines erhöhten Kohlenstoffanteils zurückzuführen ist. Dieser höhere TOC-Wert kann einen Einfluss auf die Vergärbarkeit der Biomasse haben, da Kohlenstoff ein wichtiger Energieträger im anaeroben Abbauprozess ist. Auch der Aschegehalt (ASH) war in den behandelten Biomassen geringer, was auf den Zellaufschluss im Rahmen der Vorbehandlung zurückzuführen ist. Ein niedrigerer ASH-Wert kann jedoch auch nachteilig sein, da Asche im anaeroben Gärprozess eine pH-puffernde Funktion besitzt, die für die Stabilität des Prozesses förderlich ist.

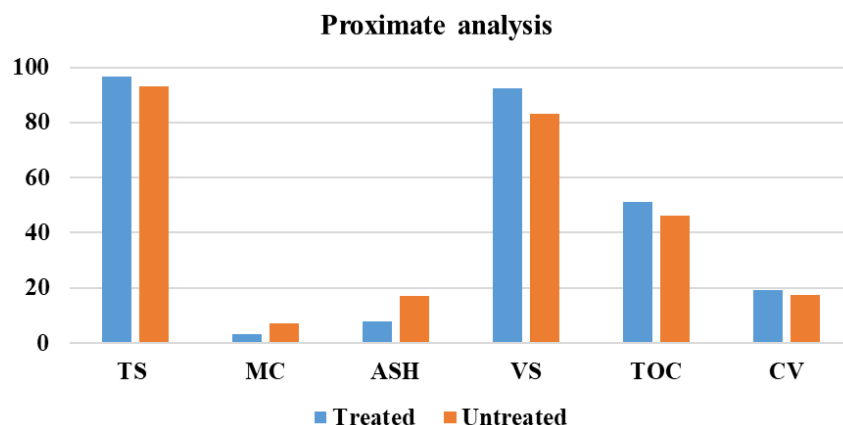


Abbildung 20 Analyse von Aschegehalt (ASH), flüchtigen Feststoffen (TOC) und der Brennwert (CV) der Biomassen.

⁵ H. Watter in *Regenerative Energiesysteme* (Ed.: H. Watter), Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden, 2022, pp. 233–262.

Maßstababhängigen Skalierung der Algenkultivierung

Im Folgenden wird basierend auf den vorliegenden Ergebnissen theoretisch untersucht, wie der Betrieb einer Biogasanlage die Skalierung der Algenkultivierung beeinflusst. Hierfür wurden die experimentellen Daten mit der theoretischen Methode nach Baserga⁶ (vgl. Tabelle 5) kombiniert. Dabei zeigte sich, dass die nach Baserga berechneten Biogasausbeuten höher ausfallen als die in unseren Versuchen gemessenen Werte. Dieses Ergebnis verdeutlicht den Einfluss theoretischer Annahmen und methodischer Unterschiede auf die Bewertung der Biogasausbeute und unterstreicht die Bedeutung experimenteller Validierung bei der Prozessentwicklung.

Tabelle 5 Berechnungsschema nach Baserga

						Baserga					
Title	Gross calorific value CH4	Molar Mass CH4	Molar Mass CO2	Pressure	Gas Constant	Yield Biogas from Fat	% CH4 form Fat	Yield Biogas from Carbohydrates	% CH4 form Fat	Yield Biogas from Proteins	% CH4 form Fat
Dimension	[kWh/m ³]	[g/mol]	[g/mol]	[Pa]	[J/(mol+K)]	[m ³ /kgDM]	[%]	[m ³ /kgDM]	[%]	[m ³ /kgDM]	[%]
Value	9,97	16,04	44,01	101.325	8,31	0,70	71	1,20	67	0,79	50

Überträgt man diese Daten auf eine Biogasanlage mit einer elektrischen Leistung von 50 kW, müsste ein maßstabsabhängiger Kultivierungsprozess einen Reststoffstrom von 2 t pro Woche liefern. Beim vorgeschlagenen Repeated-Batch-Prozess entspricht dies einem wöchentlichen Erntevolumen von etwa 500 m³ (vgl. AP1 Prozessführung). Bei einem Erntezyklus von 2–3 Tagen und einer Entnahme von 30 % ergibt sich ein erforderliches Gesamtkulturvolumen von etwa 1500 m³. Für kleinere Kultivierungsprozesse ist daher eine Zufütterung in bestehende Biogasanlagen unerlässlich, um die erforderlichen Mengen zu gewährleisten.

Tabelle 6 Maßstabsabhängige Skalierung. **Fehler! Keine gültige Verknüpfung.**

Arbeitspaket 4: EPS-Gewinnung

Im Arbeitspaket 4 wurde die Gewinnung von EPS untersucht, wobei zunächst die Abtrennung der Biomasse von der Kulturbrühe erforderlich ist. Dafür wurden verschiedene Filtrationsmethoden – einschließlich Kuchenfiltration, Hohlfaser- und dynamischer Filtration – sowie die Tellerzentrifugation als Zentrifugationsmethode miteinander verglichen. Zur anschließenden Konzentrierung der EPS wurden die Hohlfaserfiltration und die dynamische Querstromfiltration untersucht.

Abtrennung Biomasse

Die Abtrennung der Biomasse vom Kulturüberstand stellt eine zentrale Herausforderung dar, insbesondere um die Zellintegrität zu wahren und die Freisetzung intrazellulärer Substanzen zu vermeiden. Im Rahmen des Projekts wurden mehrere Filtrationsverfahren untersucht, um eine möglichst schonende und effiziente Trennung zu ermöglichen. Neben Kuchenfiltration, Querstromfiltration (Crossflow, CF) und dynamischer Crossflow-Filtration (DCF) wurden auch Zentrifugationsmethoden getestet.

Kuchenfiltration

Die Kuchenfiltration erwies sich als die schonendste Methode für die Filtration von Biomasse. Hierbei wird die Filtrationsmembran senkrecht zur Kulturbrühe angeströmt, wodurch die Biomasse zurückgehalten und in Form eines Filterkuchens abgelagert wird. Durch dieses Verfahren bleibt die mechanische Beanspruchung der Zellen gering, was die Integrität der Biomasse schützt. In verschiedenen Versuchen wurden Siebgewebe mit Porengrößen von 15–42 µm auf ihre Eignung für den Biomasserückhalt getestet. Nylonfilter mit Porengrößen von 15 µm und 25 µm erwiesen sich hierbei als optimal. Filter mit größeren Poren konnten die Biomasse nicht ausreichend zurückhalten.

Für die Effizienz der Kuchenfiltration ist der Widerstand des wachsenden Filterkuchens entscheidend. Die Filtrierbarkeit (vgl. Abbildung 21) der Biomasse variiert mit dem Kulturstatus: Während in der frühen Kulturphase ein niedriger Widerstand gemessen wurde (gute Filtrierbarkeit), erhöht sich dieser signifikant mit steigendem Kulturalter, insbesondere in der späten exponentiellen Phase ($\alpha > 1 \cdot 10^{14} \text{ m}^{-2}$), was einer schlechten Filtrierbarkeit entspricht. Aufgrund dieser Einschränkung ist die Kuchenfiltration für die stationäre Phase des Kulturverlaufs weniger geeignet.

⁶ H. Watter in *Regenerative Energiesysteme* (Ed.: H. Watter), Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden, 2022, pp. 233–262.

Tabelle 7 Auswirkung des Kulturstatus auf die Filtrierbarkeit

Kulturstatus	Filtrierbarkeit	
Frühe exponentielle Phase	gut	$\alpha'v \approx 3 \cdot 10^{12} \text{ m}^{-2}$
Frühe exponentielle Phase	mittel	$\alpha'v \approx 8 \cdot 10^{13} \text{ m}^{-2}$
Späte exponentielle Phase	schlecht	$\alpha'v > 1 \cdot 10^{14} \text{ m}^{-2}$

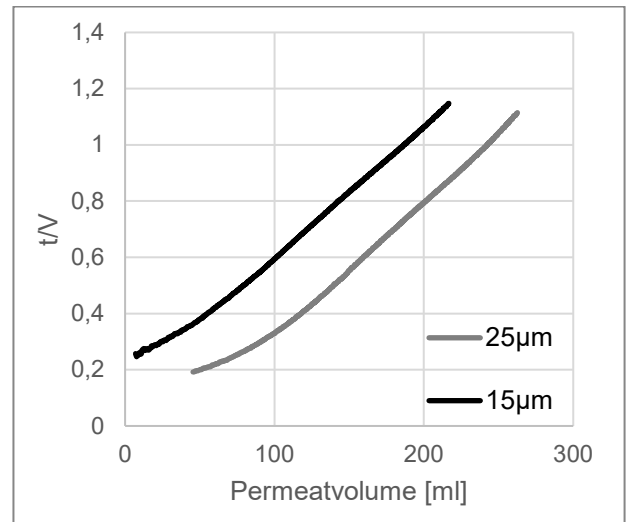


Abbildung 21: Auftragung vom Verhältnis Filtrationszeit zu Permeatvolumen über Permeatvolumen zur Berechnung der Filterkonstante α nach d'Arcy.

Tangentialfiltration

Die Tangential- oder Querstromfiltration (Crossflow, CF) ist ein bewährtes Verfahren zur Biomasseabtrennung, führt jedoch zu einer mechanischen Belastung der Zellen. In diesem Verfahren wird Fouling durch tangentiale, turbulente Strömung vermieden. Bei Hohlfasermodulen wird die erforderliche Turbulenz ausschließlich über die Strömungsgeschwindigkeit des Konzentrats erzeugt, wodurch sich die Verweilzeit der Biomasse im System verlängert. Dies führt zu mehr Pumpendurchläufen und einer steigenden mechanischen Beanspruchung der Zellen. Versuche zeigten einen klaren Zusammenhang zwischen Filtrationsdauer und der Entstehung von Zelldebris im Konzentrat, welcher auch durch Änderungen der Betriebsparameter nicht reduziert werden konnte. Daher wurde die Tangentialfiltration mit Hohlfasermodulen für die Biomasse im Projekt nicht weiterverfolgt.

Als potenziell schonendere Alternative erwies sich die dynamische Crossflow-Filtration (DCF), bei der Turbulenz durch rotierende Filtrationsscheiben erzeugt wird. Diese Konfiguration ermöglicht die Entkopplung von Strömungsgeschwindigkeit und Verweilzeit des Konzentrats, wodurch die Durchflussrate unabhängig von der Turbulenzerzeugung gesteuert werden kann und die mechanische Belastung der Zellen potenziell verringert wird.

Zusätzliche Versuche ergaben jedoch, dass auch bei kontinuierlichen Systemen (CF und DCF) die wiederholte Rezirkulation des Konzentrats zu hoher Zellbelastung führt, besonders bei häufigen Pumpendurchläufen. Diese mechanische Beanspruchung kann irreparable Zellschäden verursachen. Im Labormaßstab konnte dieser Effekt durch den Einsatz schererarmer Schlauchpumpen bis zu einem Konzentrationsfaktor von 10 verringert werden. Mit scherarmeren Pumpentypen wie Zahnradpumpen wäre eine Skalierung theoretisch möglich; für die nachfolgende PEF-Behandlung (Pulsed Electric Field) ist jedoch eine niedrige Leitfähigkeit der Probe erforderlich, die bei einem Konzentrationsfaktor von 10 nicht ausreichend erzielt werden kann.

Kontinuierliche Zentrifugation

Die kontinuierliche Zentrifugation erwies sich als effiziente Alternative zur Filtration für größere Biomassevolumina von *A. platensis*. Die eingesetzte Tellerzentrifuge mit 13 Tellern und einer maximalen Rotationsgeschwindigkeit von $8500 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ ermöglichte Volumenströme bis zu $35 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; bei höheren Volumenströmen verringerte sich jedoch die Trennleistung. Je nach Tellerabstand konnte ein Konzentrationsfaktor bis zu 24 erreicht werden.

Mikroskopische und rekultivierungstechnische Untersuchungen zeigten, dass die für *A. platensis* typische spiralförmige Zellstruktur durch die Zentrifugation unbeschädigt blieb, und auch das Zellwachstum war im Zentrifugationsrückstand nicht beeinträchtigt. Dies bestätigt die Zentrifugation als schonendes Verfahren zur Biomasseabtrennung.

Weitere Vorversuche ergaben, dass gezielte Waschschriffe membrangebundenes EPS effektiv entfernen, was die nachfolgende PEF-Behandlung (Pulsed Electric Field) optimiert, da membrangebundenes EPS die Effizienz der Methode beeinträchtigt. Zudem erlauben die Waschschriffe eine präzise Einstellung der Leitfähigkeit zur optimalen Pufferkapazität für die PEF-Behandlung. Die Waschmethode wird in weiteren Versuchen zur Verbesserung der EPS-Gewinnung und PEF-Effizienz weiterentwickelt.

EPS-Konzentrierung:

Für den Vergleich von Hohlfaserfiltration und dynamischer Querstromfiltration spielt die Porengröße eine wesentliche Rolle. Bei der dynamischen Querstromfiltration mit einer Porengröße von 5 nm wurde ein Kohlenhydratdurchgang von 25 % festgestellt, was den Ergebnissen der Ultrafiltration bei 3 kDa (21 % Durchgang) vergleichbar ist. Zum Vergleich: Reichert et al. (2017) nutzten für Aktivitätstests der EPS von *A. platensis* eine Fraktion größer als 12 kDa. Unsere Analysen zeigten, dass etwa 50 % der EPS die Grenze von 12 kDa überschreiten, wodurch Verluste der aktivitätsrelevanten EPS-Fraktion bei den eingesetzten Konzentrierungsmethoden ausgeschlossen werden können.

Darüber hinaus wurden Versuche zur Präzipitation von EPS mit Ethanol durchgeführt. Diese dienten jedoch lediglich als interner Standard, da die niedrige EPS-Ausgangskonzentration nach der Kultivierung eine Fällung sowohl wirtschaftlich als auch ökologisch für eine großtechnische Anwendung nicht rentabel macht.

Hohlfaserfiltration:

Zur Evaluierung der Hohlfasermodule ist ein traditioneller Ansatz über den Zusammenhang von Transmembrandruck (TMP) und Flux verwendet worden. Dieser Zusammenhang zwischen TMP und Flux kann bei niedrigen TMP als quasilinear bezeichnet werden. Die effizientesten Prozesspunkte sind am Ende des quasilinearen Zusammenhangs zu finden, wo eine Erhöhung des TMP keinen höheren Permeatfluss erzeugt. Dieser Bereich variiert mit steigendem Volumenstrom entlang der Membran. Dieser Bereich liegt bei den getesteten Volumenströmen bei 1,0–1,5 bar TMP (vgl. Abbildung 22, links), wobei Permeatströme von $100 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ erreicht werden. Für einen stabil laufenden Prozess muss auch das Fouling an der Membran untersucht werden. Ausschlaggebend ist hierbei die zeitliche Änderung des TMP. Bei den untersuchten Volumenströmen setzte bei einem TMP von 1,5 bar Fouling ein (vgl. Abbildung 22 rechts). Somit ergibt sich ein maximaler Permeatfluss von $80 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ohne eintretendes Fouling.

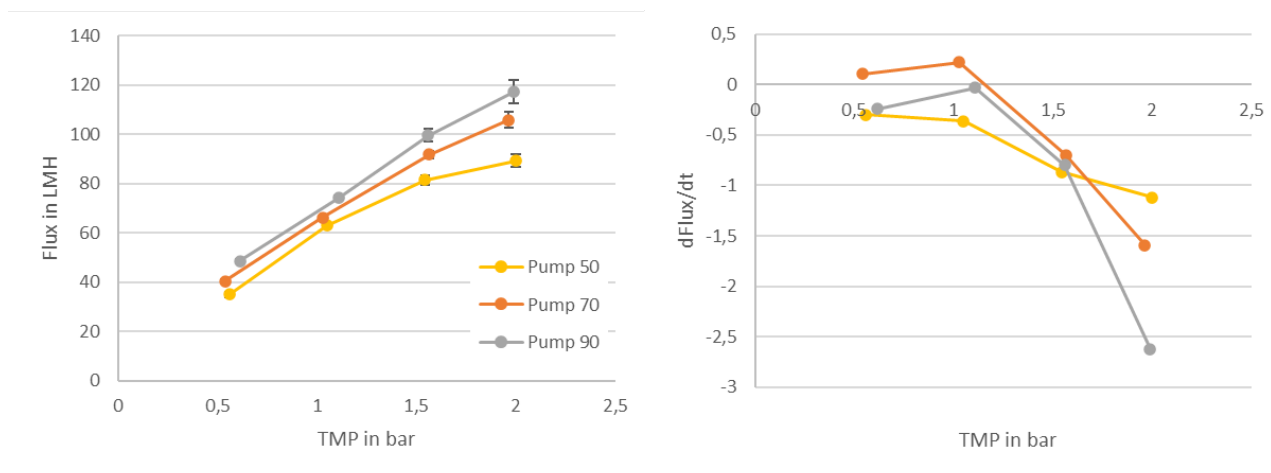


Abbildung 22 Evaluierung von geeigneter Prozesspunkte für die EPS-Konzentrierung mittels Hohlfaser Ultrafiltration (10kDa).

Dynamische Querstromfiltration

Weiterführende Versuche konzentrieren sich auf die Bestimmung optimaler Betriebspunkte der dynamischen Crossflow-Filtration (DCF), wobei neben dem Permeatfluss auch techno-ökonomische Parameter wie der Leistungsbedarf einbezogen werden. Da der Einsatz der DCF zur EPS-Aufbereitung in der Literatur bisher kaum dokumentiert ist, wurden grundlegende Parameterkombinationen, insbesondere das Verhältnis von Transmembrandruck (TMP) zu Flux, untersucht (vgl. Abbildung 23). Dabei stellte sich heraus, dass die Abnahme des Flux nicht durch Fouling verursacht wird, sondern auf die zunehmende Viskosität der Lösung zurückzuführen ist.

Ähnlich wie bei den Hohlfaserversuchen zeigte sich eine lineare Korrelation zwischen Permeatflux und TMP, wobei dieser Bereich bei geringeren Scherraten abnimmt. Dies deutet darauf hin, dass die optimale Prozessführung stark von der Rotationsgeschwindigkeit abhängt. Zusätzlich wurde der Einfluss von TMP und Rotationsgeschwindigkeit auf den Filterkuchenwiderstand untersucht. Die kinetische Analyse der Fluxdynamik ergab, dass die Steigung des Widerstands mit zunehmender Rotationsgeschwindigkeit abnimmt und bei hohen Frequenzen sogar negativ wird. Ab einer Rotationsgeschwindigkeit von 25 Hz bleibt der Filterkuchenwiderstand unabhängig vom TMP und erreicht seinen minimalen Wert.

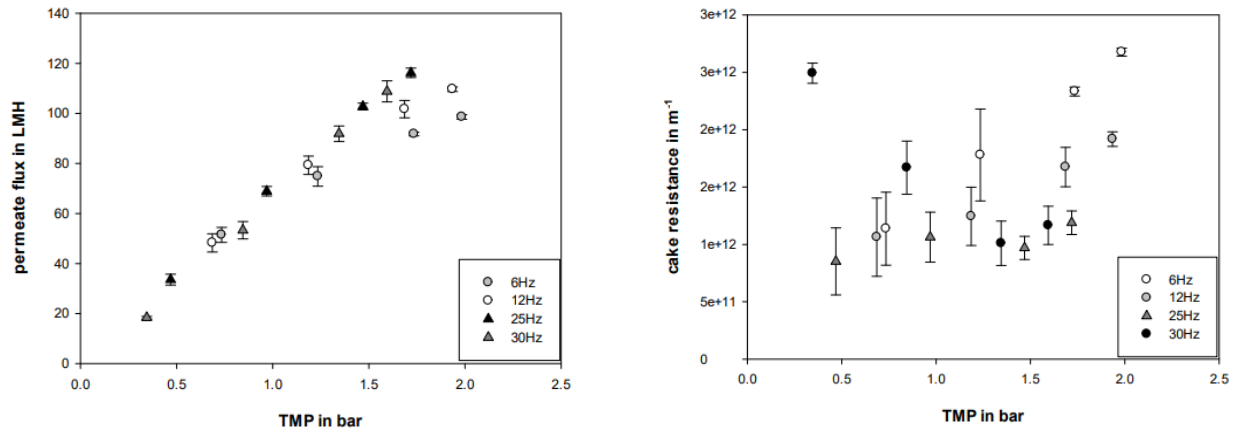


Abbildung 23 Links: Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem Transmembran-Druck (TMP) und dem Permeatfluss in Abhängigkeit von der Rotationsfrequenz der Membranen. Rechts: Darstellung des Zusammenhangs zwischen TMP und dem Filterkuchenwiderstand.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde eine Rotationsgeschwindigkeit von 25 Hz als optimal für den Einsatz der DCF im Gesamtprozess festgelegt. Diese Frequenz ist auch energetisch sinnvoll, da in einem TMP-Bereich von 1–1,7 bar niedrigere Frequenzen geringere Fluxraten erzeugen, während höhere Frequenzen den Flux nicht weiter verbessern. Insgesamt konnten Fluxraten von 120 LMH erreicht werden, ohne dass es zu Foulingeffekten kam. In Abbildung 24 ist der Permeatflussverlauf während einer Aufkonzentrierung dargestellt. Die Parameterachse ‚EPS-Konzentration‘ kann auch durch eine zeitliche Achse aufgetragen werden.

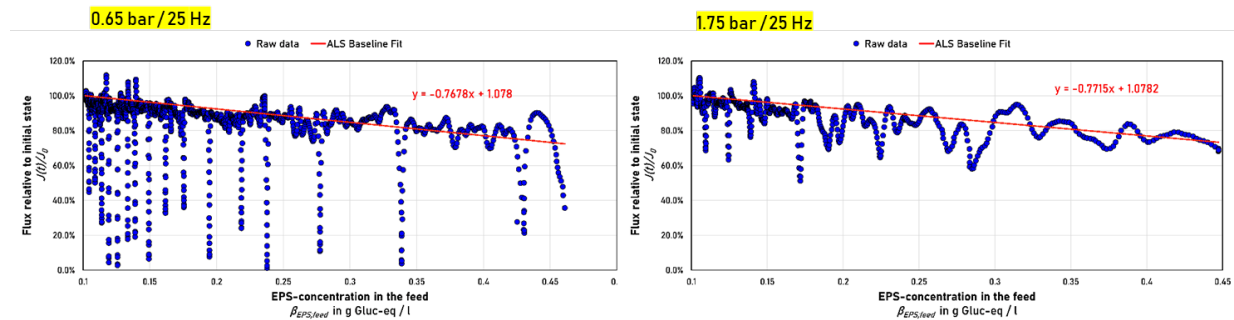


Abbildung 24 Zusammenhang zwischen EPS Konzentration und Permeatfluss bei unterschiedlichen TMP.

Arbeitspaket 5: Zellaufschluss und Wertstoff-Extraktion

Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Extrahierbarkeit von Phycocyanin mittels gepulster elektrischer Felder

Wie bereits im Zwischenbericht vom Frühjahr 2024 erörtert, wurde bereits frühzeitig im Projektverlauf ein starker Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf den Zellaufschluss, mit gepulsten elektrischen Feldern, festgestellt. Da dies einen großen Effekt auf den Gesamtverlauf des Projekts hat (Kulturführung, Mediumrecycling usw.), wurden Versuche zur Untersuchung dieses Effekts geplant, die vom ursprünglichen Plan des Vorhabens abweichen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Kultivierungsdauer sowie Stressfaktoren während der Kultivierung einen Einfluss auf den Zellaufschluss und damit die Freisetzung des Wertstoffes Phycocyanin haben. Um diese Hypothese zu testen, wurde *Arthrospira platensis* in SOT-Medien mit unterschiedlicher Carbonat-Konzentration (5, 20, 50 bzw. 100 % ($16,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) der Originalrezeptur) kultiviert. Außerdem wurden NaNO_3 , NaCl und K_2SO_4 auf jeweils 50 % reduziert. Alle anderen Kultivierungsparameter (pH, Temperatur, Licht) wurden für alle Versuchsreihen konstant gehalten. Kultiviert wurden die Zellen in einer 1,5 L-Blasensäule. Der pH-Wert der Kultur wurde automatisch mittels CO_2 reguliert. Das gewählte Vorgehen ermöglicht nicht nur die Überprüfung der genannten Hypothese, sondern auch die Untersuchung, inwieweit eine Kultivierung in carbonatreduziertem Kultivierungsmedium die Produktivität von Phycocyanin und das Wachstum der Kultur im Allgemeinen beeinflusst. Da *Arthrospira platensis* üblicherweise in Medien mit hohem Salzgehalt kultiviert wird, muss das Kulturmedium vor der PEF-Behandlung vollständig entfernt werden, da eine zu hohe Leitfähigkeit zu hohen elektrischen Strömen führt und der Aufbau von ausreichend starken elektrischen Feldern somit erschwert bzw. durch die begrenzte Leistung der verfügbaren Generatoren unmöglich wird. Die Kultivierung in salzreduziertem Medium würde somit das Downstream-Processing erleichtern und außerdem die Nachhaltigkeit des Gesamtprozesses verbessern (geringerer Einsatz von Salz).

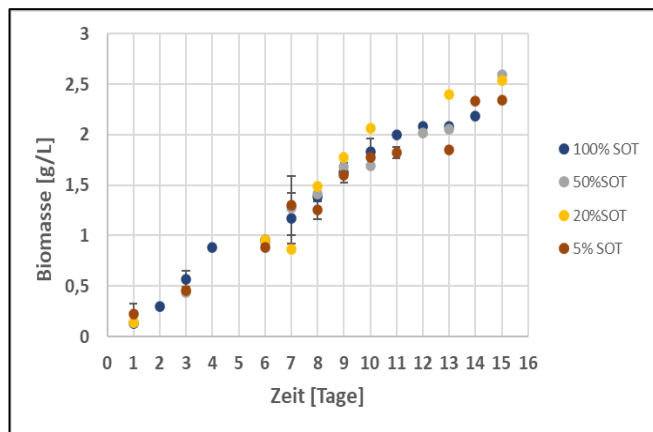


Abbildung 25: Wachstumskurven über 15 Tage in SOT-Medien mit 4 verschiedenen Carbonatkonzentrationen. Die Zellen wurden in einer Blasensäule mit einem Volumen von 1,4 Liter kultiviert. Der pH-Wert wurde mit Hilfe der Zugabe von CO₂ geregelt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardfehler aus zwei biologischen Wiederholungen

Im ersten Teil der Versuche wurde der Einfluss der Medienkomposition auf das Wachstumsverhalten (optische Dichte), die Zellgröße (Länge, Auswertung von Bildmaterial), die Stickstoffverbrauchsrates sowie den EPS- bzw. Phycocyaningehalt untersucht (für genauere Ergebnisse verweisen wir auf den Zwischenbericht vom Frühjahr 2024). Im zweiten Teil der Versuche wurde nach 7 bzw. 14 Tagen eine PEF-Behandlung bei 20 kV·cm⁻¹ und 25 kJ·kg⁻¹ (Behandlung A) bzw. 20 kV·cm⁻¹ und 75 kJ·kg⁻¹ (Behandlung B) durchgeführt. Die Freisetzung wurde über eine Gesamtdauer von vier Stunden (240 Minuten) gemessen.

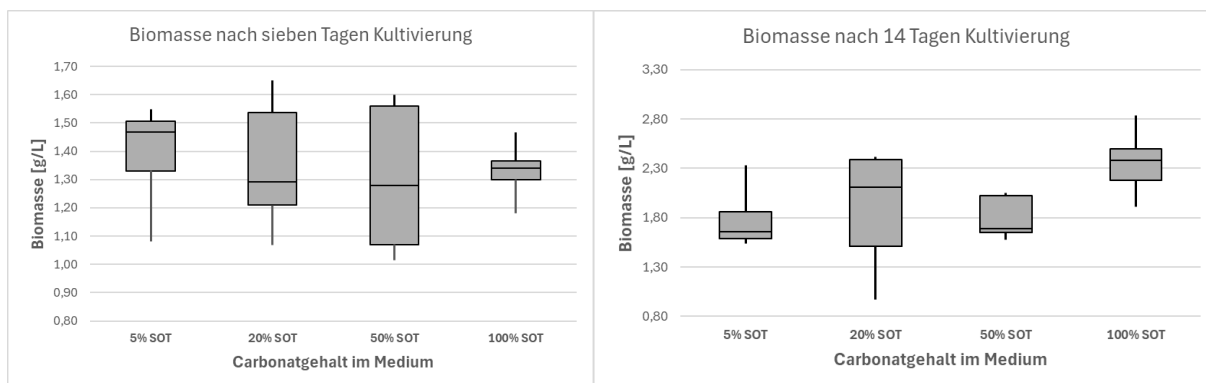


Abbildung 26: Boxplots der Biomasse nach sieben Tagen Kultivierungsdauer (links) und 14 Tagen Kultivierungsdauer (rechts) in Abhängigkeit der Carbonatkonzentration im SOT-Medium. Zur Erstellung der Boxplots wurden sowohl die Daten der 2-wöchigen Kultivierung verwendet (vgl. Abbildung 25) als auch die Messungen für die PEF-Behandlung. Daraus ergeben sich sechs biologische Wiederholungen (n=6).

Abbildung 25 zeigt den Verlauf der Biomasse über eine Kultivierungsdauer von 14 Tagen für die vier verschiedenen getesteten Medien. Um den Einfluss des Kulturmediums besser statistisch auszuwerten, wurden zusätzlich die Werte der Biomasse der Kulturen für die PEF-Versuche in die Auswertung an Tag 7 bzw. Tag 14 mit einbezogen. Da für die PEF-Behandlung 4 biologische Wiederholungen durchgeführt wurden, ergibt sich für die Biomasse und den Phycocyaningehalt eine Anzahl von sechs (n = 6). Das Ergebnis der Auswertung ist in Abbildung 26 anhand von Boxplots dargestellt. Anhand der großen Interquartilabstände zeigt sich, dass das Wachstum in der gewählten Blasensäule generell größeren Schwankungen unterliegt. Dies hängt möglicherweise mit sich ändernden Umgebungstemperaturen und -lichtverhältnissen im Labor zusammen. Dennoch zeigt sich anhand der starken Überlappung der Intervalle, dass zwischen den Proben kein signifikanter Unterschied besteht. Lediglich nach 14 Tagen scheint die Kultivierung in 100 % SOT-Medium zu einer leicht höheren Biomassekonzentration zu führen. Aufgrund der starken Überschneidung der Whisker und der Überschneidung des Interquartilabstands mit der Kultivierung in 20 %igem Medium sollte dies allerdings nur als Trend interpretiert werden. Dies zeigt sich auch in der Streuung der Kultivierungsdaten in Abbildung 25. Als Zwischenfazit kann somit gesagt werden, dass der Carbonatgehalt keinen signifikanten Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *Arthrospira platensis* hat. Diese Aussage ist jedoch nur gültig, wenn der pH-Wert wie in dieser Versuchsreihe kontrolliert wird. Durch die Reduzierung des Carbonatgehalts verliert das Medium seine Pufferkapazität. Dadurch steigt der pH-Wert in salzreduzierten Medien schneller an. Damit verschiebt sich das Dissoziationsgleichgewicht von Hydrogencarbonat zu Carbonat, welches von *Arthrospira platensis* nicht verstoffwechselt werden kann.

Abbildung 27 zeigt den Phycocyaningehalt in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Biomasse nach 7 bzw. 14 Tagen Kultivierung. Der Zellaufschluss wurde mit einer optimierten Ultraschallbehandlung durchgeführt und gilt als Referenzverfahren für die gesamte Versuchsreihe. Hier zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der Biomasse. Die Interquartilsabstände bzw. Antennen (Whisker) überlagern sich stark, und der Median von einer Probe liegt innerhalb des Interquartilsabstandes der anderen Proben. Lediglich nach der Kultivierung in 100 % SOT-Medium über 14 Tagen ist ein leichter Trend zu höheren Phycocyaningehalten zu erkennen. Analog zur Biomasse überlagern sich hier auch die Interquartilsabstände leicht bzw. die Antennen stark mit anderen Proben. Insgesamt lässt sich sagen, dass der Phycocyaningehalt für alle Messungen um den Median von $140\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Trockenmasse schwankt. Ein signifikanter Unterschied zwischen 7 und 14 Tagen lässt sich in den Daten nicht beobachten.

Da sowohl im Wachstum als auch im Phycocyaningehalt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Medien festgestellt werden konnten, ist es somit vorteilhaft, für die Produktion von Phycocyanin die Zellen in salzreduziertem Medium über einen Zeitraum von 14 Tagen zu kultivieren. Dies ist, wie bereits erwähnt, jedoch nur möglich, wenn der pH-Wert über den gesamten Zeitraum der Kultivierung kontrolliert wird. In dem Fall der beschriebenen Versuche wurde dies mit CO_2 gemacht. Dieses könnte im Falle einer großtechnischen Kultivierung beispielsweise aus Abgasen gewonnen werden. Inwieweit sich die Ergebnisse generell auf großtechnische Anlagen übertragen lassen, sollte Gegenstand zukünftiger Projekte sein. Möglicherweise können Nährstoff- und pH-Gradienten in größeren Reaktorsystemen zu einem Nachteil durch das salzreduzierte Medium führen.

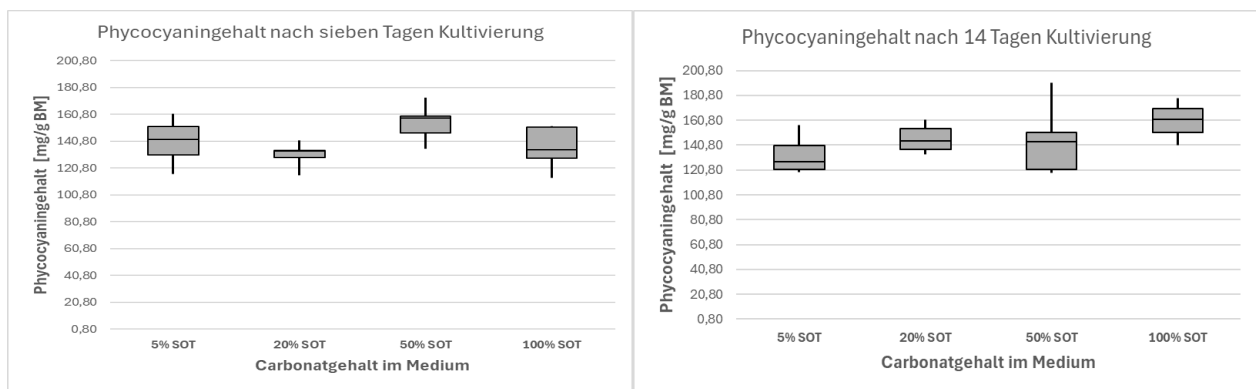


Abbildung 27: Boxplots des Phycocyaningehalts in mg pro g Trockenmasse nach sieben Tagen Kultivierungsdauer (links) und 14 Tagen Kultivierungsdauer (rechts) in Abhängigkeit der Carbonatkonzentration im SOT-Medium. Der Zellaufschluss wurde mit einer optimierten Ultraschallbehandlung (Referenz) durchgeführt. Zur Erstellung der Boxplots wurden sowohl die Daten der 2-wöchigen Kultivierung verwendet (vgl. Abbildung 25) als auch die Referenzwerte für die PEF-Behandlungen (Ultraschallaufschluss). Daraus ergeben sich sechs biologische Wiederholungen ($n=6$).

Im zweiten Teil der Versuchsreihe wurden die Zellen, die in den vier verschiedenen Medien kultiviert wurden, mit gepulsten elektrischen Feldern behandelt. Die Behandlungen wurden an Tag 7 und Tag 14 der Kultivierung durchgeführt. Für alle Versuchsreihen wurden die Kulturen neu angesetzt, sodass alle Versuchsreihen unabhängig voneinander sind. Am Tag der Ernte wurden die Zellen mit Hilfe eines Nylonfilters ($5\ \mu\text{m}$) abfiltriert, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und in verdünntem Natrium-Phosphatpuffer ($\text{pH } 7,2$, elektrische Leitfähigkeit $2\ \text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) auf $5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ resuspendiert.

Abbildung 28 (oben, links) zeigt die Extraktionskurven für Phycocyanin über eine Zeit von vier Stunden nach der PEF-Behandlung ($20\ \text{kV/cm}$, $25\ \text{kJ/kg}$, Behandlung A) für Zellen, die am 7. Tag der Kultivierung geerntet wurden. Die Ergebnisse sind dabei auf die Ausbeute der mit Ultraschall aufgeschlossenen Zellen bezogen und somit in Prozent angegeben. Für Behandlung A ergibt sich dabei ein von der Carbonatkonzentration abhängiger Extraktionsverlauf. Dabei zeigt sich, dass sich die Kurven der Zellen, die in 5 % und 20 % SOT-Medium kultiviert wurden, ähneln sich, ebenso wie die der Zellen, die in 50 % bzw. 100 % SOT-Medium kultiviert wurden. Dies verdeutlicht auch die Darstellung der maximal mit PEF erzielten Phycocyaninausbeute für Behandlung A (vgl. Abbildung 28, unten links). Es ist ersichtlich, dass sich die Ausbeuten nach 240 Minuten Extraktion der 5 % bzw. 20 % SOT-Proben stark ähneln, ebenso wie die der 50 %- und 100 %-SOT-Proben.

Abbildung 28 (oben, rechts) zeigt die Extraktionsverläufe für Zellen, die am 7. Tag geerntet wurden und bei $20\ \text{kV/cm}$ und $75\ \text{kJ/kg}$ behandelt wurden (Behandlung B). Das Schema, welches bereits bei Behandlung A ersichtlich ist, tritt bei Behandlung B ebenfalls auf. So ist zu erkennen, dass die Kurven der Mittelwerte der 50 %- und 100 %-SOT-Proben übereinander liegen, während die Kurven der 5 % und 20 %-Proben deutlich darüber liegen. Dies verdeutlicht auch der Boxplot für Behandlung B (vgl. Abbildung 28, unten rechts). Es ist zu erkennen, dass der Median der maximal mit PEF erzielten Ausbeute bei 92 % für 5 % SOT bzw. bei 94 % für 20 % SOT liegt. Auch wenn sich die Antennen (Whisker) der Boxplots teilweise unterscheiden, zeigt sich hier ein signifikanter Unterschied zu den PEF-Behandlungen der Zellen, die in 50 % bzw. 100 % SOT kultiviert wurden. Der Median der letztgenannten Proben lag bei 56 % bzw. 52 % Ausbeute.

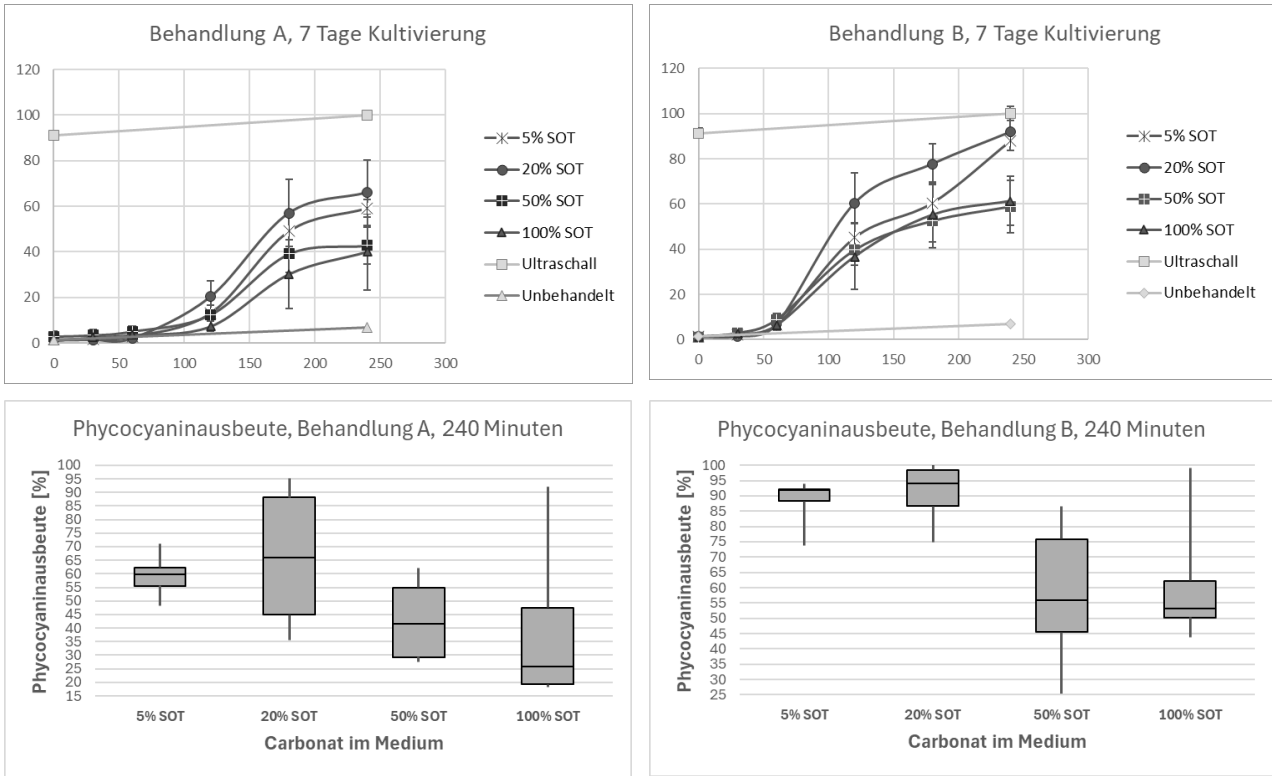
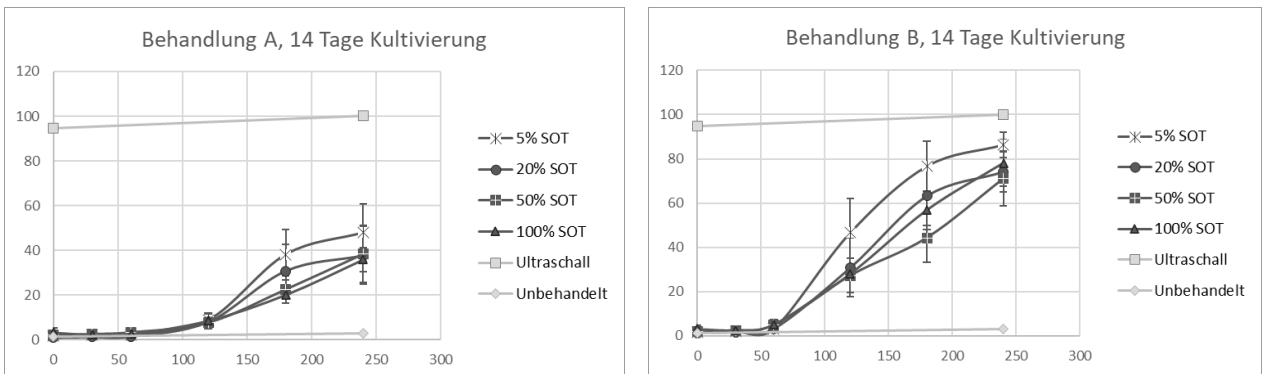


Abbildung 28: Oben: Phycocyaninausbeute [%] im Überstand nach der PEF-Behandlung (20 kV/cm, 25 kJ/kg (Behandlung A), links, bzw. 75 kJ/kg (Behandlung B), rechts) über eine Extraktionsdauer von 240 Minuten nach sieben Tagen Kultivierung. Die Ausbeute bezieht sich dabei auf den Ultraschallaufschluss (Referenz). Die Extraktion wurde bei 30°C durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen das Konfidenzintervall ($\alpha=0,05$), berechnet aus 12 Wiederholungen ($n=12$). Unten: Boxplots für den Phycocyaningehalt nach 240 Minuten Extraktion in Abhängigkeit der Carbonatkonzentration im Medium. Zur Erstellung der Plots wurden die prozentualen Ausbeuten (Referenz Ultraschall) von jeweils 3 technischen Wiederholungen bei insgesamt 4 biologischen Wiederholungen verwendet ($n=12$).

Abbildung 29 zeigt die analogen Plots wie Abbildung 28. Dabei ist ersichtlich, dass die PEF-Behandlung bei Behandlung B für die Zellen, die in Medien mit niedrigem Carbonatgehalt kultiviert wurden, zu einer schlechteren Ausbeute geführt hat. So lag der Median der 5 %-Probe bei 85 % (vgl. 92 % nach 7 Tagen), der 20 %-Probe bei 74 % (vgl. 95 %). Dahingegen lag der Median der Proben mit hohem Carbonatgehalt über dem der Proben nach 7 Tagen. So wurden bei der 50 %-Probe im Median 75 % des Phycocyanins extrahiert (vgl. 56 % nach 7 Tagen) und bei der 100 %-Probe 89 % (vgl. 52 %). Allerdings weist die Box bei der 100 % Probe eine starke Verzerrung zum unteren Quartil auf, weshalb davon auszugehen ist, dass der wahre Wert vergleichbar mit der 50 % Probe ist. Bei Behandlung A zeigt sich eine Abnahme des Medians von 63 % (5 % SOT) auf 36 % (100 % SOT). Insgesamt sind die Unterschiede nach zwei Wochen Kultivierung nicht so stark ausgeprägt.



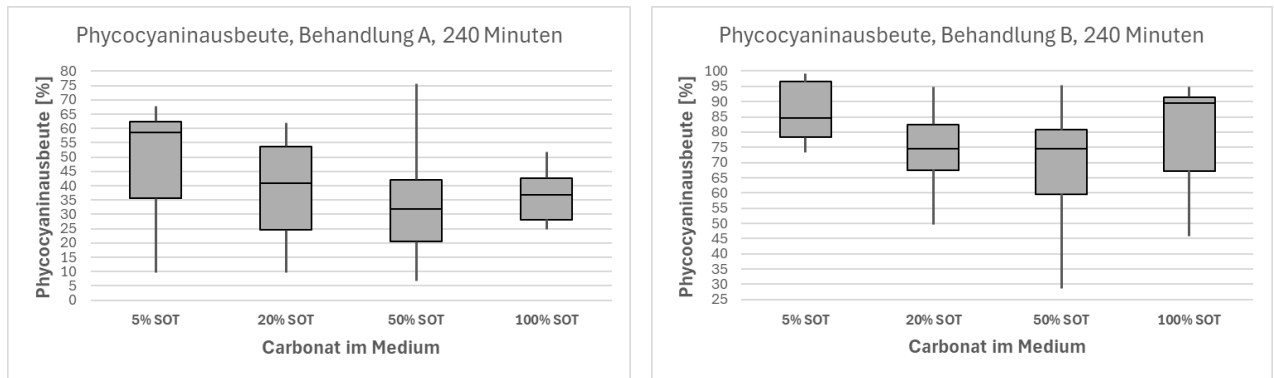


Abbildung 29: Oben: Phycocyaningehalt im Überstand nach der PEF-Behandlung (20 kV/cm, 25 kJ/kg (Behandlung A), links, bzw. 75 kJ/kg (Behandlung B), rechts) über eine Extraktionsdauer von 240 Minuten nach 14 Tagen Kultivierung. Die Extraktion wurde bei 30°C durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen das Konfidenzintervall ($\alpha=0,05$), berechnet aus 12 Wiederholungen ($n=12$). Unten: Boxplots für den Phycocyaningehalt nach 240 Minuten Extraktion in Abhängigkeit der Carbonatkonzentration im Medium. Zur Erstellung der Plots wurden die prozentualen Ausbeuten (Referenz Ultraschall) von jeweils 12 Wiederholungen verwendet ($n=12$).

Da sich der Phycocyaningehalt in Abhängigkeit der Medienzusammensetzung und der Kultivierungsdauer nicht signifikant geändert hat (vgl. Abbildung 29) und der Aufschluss der Zellen in 5%-SOT bzw. 20 % SOT nach 7 Tagen Kultivierung am effizientesten war, empfehlen sich auf Basis der gezeigten Daten diese Medien zur Kultivierung von *Arthrospira platensis* im Zusammenhang mit der nachfolgenden PEF-Behandlung zur Gewinnung des Wertstoffes Phycocyanin. Das gezeigte Vorgehen verdeutlicht außerdem, dass die Verwendung von salzreduzierten Medien möglich ist. Dies vereinfacht das Downstream-Processing erheblich, da der ineffiziente Austausch des Kultivierungsmediums entfallen kann. So hat das 5 %-SOT-Medium eine elektrische Leitfähigkeit von $5,91 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ und das 20 % SOT $6,67 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$. Eine Behandlung von Suspensionen mit diesen Leitfähigkeiten ist, abhängig von der Konfiguration der Elektroden in der Behandlungskammer, mit modernen Generatoren möglich. Die Vorbereitung der Zellsuspension müsste dann nur noch einen Konzentrierungsschritt umfassen, welcher bei allen Verfahren Anwendung finden würde.

Die gezeigten Versuche belegen zum ersten Mal, dass die Kultivierungsbedingungen einen signifikanten Einfluss auf den Erfolg der PEF-Behandlung haben. Dies verdeutlicht, dass die Kultivierungsbedingungen bei der Planung eines erfolgreichen Prozesses für die Gewinnung von Phycocyanin mit gepulsten elektrischen Feldern mit bedacht werden müssen. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass der EPS-Gehalt zwischen den Kulturen keinen Unterschied zeigt. Dies verdeutlicht, dass das in diesem Projekt angestrebte Bioraffineriekonzept mit zwei Hochwertprodukten (EPS und Phycocyanin) aus *Arthrospira platensis* umsetzbar sind.

Untersuchung des Zusammenhangs von Abtrennbarkeit der Zelldebris und Zellaufschluss bzw. Extraktionsbedingungen und Messung der Partikelgrößenverteilung der aufgeschlossenen Zellen

Zu Beginn des Projektes wurde auf Basis verfügbarer Literatur die Hypothese aufgestellt, dass die Zellen nach der PEF-Behandlung ihre Integrität bewahren. Dies würde eine vereinfachte Abtrennung der Zellbestandteile zur Folge haben. Wie jedoch in früheren Zwischenberichten bereits berichtet, ist diese These nicht haltbar. Ergebnisse zum Zusammenhang des Zerfalls der Trichome von *Arthrospira platensis* wurden bereits von der Forschungsstelle veröffentlicht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die vollständige Permeabilisierung der Zellmembran auch zu einer vollständigen Desintegration der Trichome geführt hat. Dies ist beispielhaft in Abbildung 30 anhand von Daten eines PEF-Versuches gezeigt. Die Zellen wurden in 5 % SOT-Medium für eine Woche kultiviert (eine biologische Wiederholung der in Abbildung 28 dargestellten Daten). Dabei ist ersichtlich, dass der Zerfall der Trichome zeitgleich mit dem Anstieg des Phycocyanins im Überstand beginnt. Nach 240 Minuten ist bei Behandlung B die maximale Ausbeute von $108 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Trockensubstanz erreicht. Nach dieser Zeit sind ebenfalls kaum noch ganze Trichome erkennbar. Im Gegensatz dazu sind nach Behandlung A und 240 Minuten Extraktion noch viele größere und manche vollständige Trichome erkennbar. Die ultraschallbehandelte Probe zeigt eine ähnliche Zusammensetzung wie Behandlung B nach 240 Minuten. Jedoch sind direkt nach der Behandlung noch mehrere größere Trichome zu erkennen. Dies spiegelt sich auch im über die Extraktionszeit ansteigenden Phycocyanin-Ertrag wider.

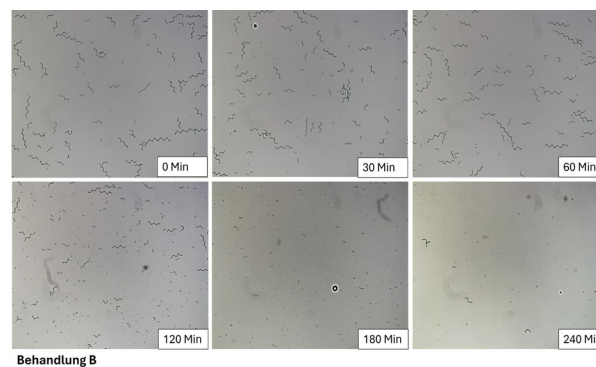
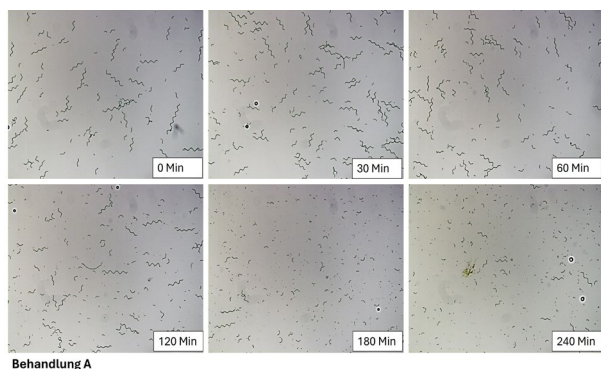
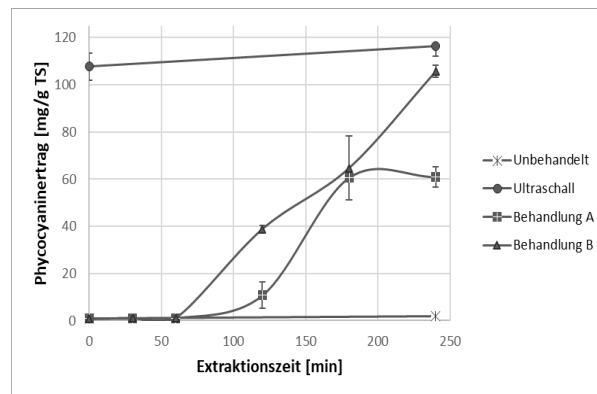
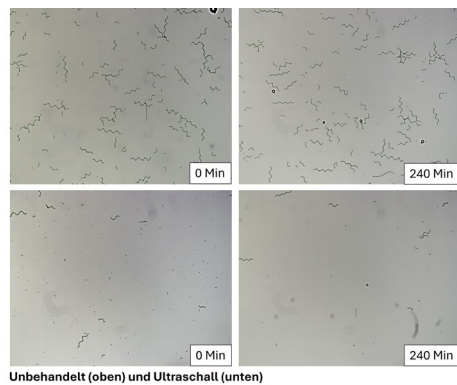


Abbildung 30: Zusammenhang zwischen Phycocyaninfreisetzung und Zerfall der Trichome von *Arthrospira platensis* über eine Extraktionsdauer von 240 Minuten. Oben links: Referenzproben (Unbehandelt und Ultraschall). Oben Rechts: Extraktionskurven für Phycocyanin für Behandlung A (20 kV/cm, 25 kJ/kg) und Behandlung B (20 kV/cm, 75 kJ/kg) von *Arthrospira platensis* Zellen, kultiviert in 5% SOT über 7 Tage. Unten links: Zugehörige Mikroskopaufnahmen für Behandlung A. Unten rechts: Zugehörige Mikroskopaufnahmen für Behandlung B. Der Kontrast der Aufnahmen wurde im Nachhinein verstärkt.

Wie anhand der gezeigten Abbildungen ersichtlich ist, ist eine vollständige Freisetzung des Phycocyanins mit einem vollständigen Zerfall der Trichome verbunden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Zellfragmente nach der PEF-Behandlung und der damit verbundenen Extraktion eine ähnliche Größenverteilung haben wie die Zellfragmente nach einer Ultraschallbehandlung oder dem Aufschluss mit anderen Verfahren, wie zum Beispiel der Kugelmühle. Eine leichtere Abtrennbarkeit der Zellfragmente nach der PEF-Behandlung ist somit nicht mehr zu erwarten.

Die Frage, warum die Ultraschallbehandlung zu chlorophyllhaltigen Extrakten führt, während in den PEF-Extrakten kein Chlorophyll zu finden ist, kann nicht dadurch beantwortet werden, dass nach der PEF-Behandlung die Trichome nicht zerfallen. Eine mögliche Erklärung ist, dass es bei der Ultraschallbehandlung zu starken Scherungen der Zellsuspension kommt. Dies begünstigt die Bildung von Mikroemulsionen aus Proteinen und Lipiden in der Zelle. Dies würde erklären, warum das eher unpolare Chlorophyll bei der Ultraschallbehandlung im wässrigen Puffer in Lösung geht.

Kontinuierliche PEF-Behandlung und vergleichende Untersuchungen mit anderen Verfahren

Zur kontinuierlichen PEF-Behandlung wurde die im Rahmen dieses Projekts angeschaffte Anlage verwendet (HVP5, Elea Technology GmbH, Germany). Als Behandlungskammer diente eine Zelle mit zwei Behandlungszonen und einer parallelen rechteckigen Elektrodenkonfiguration mit einem Elektrodenabstand von 7 mm. Die Zelle wurde in Kooperation mit der Elea Technology GmbH für die Behandlung von temperatursensitiven Produkten entwickelt. Am Ein- bzw. Auslass der Behandlungskammer wurden zwei Plattenwärmeübertrager installiert, mit denen die Zellsuspension schnell auf die gewünschte Zieltemperatur erwärmt und nach der Behandlung möglichst schnell abgekühlt werden konnte.

Um das PEF-Verfahren hinsichtlich seiner Effizienz zu bewerten, sollten im Rahmen dieses Projekts vergleichende Untersuchungen mit Ultraschall durchgeführt werden. Dafür wurde ein eigens an der Forschungsstelle konzipierter Prototyp verwendet. Diese Anlage ermöglicht zum einen eine kontinuierliche Behandlung und zum anderen die Beaufschlagung von statischem Druck, wodurch die Effizienz der Ultraschallbehandlung erhöht werden kann.

Da es sich bei der Behandlung mit Hochleistungultraschall ebenfalls um ein innovatives Verfahren handelt, welches in der Industrie noch keine breite Anwendung findet, wurde zusätzlich ein Zellaufschluss mit einem Hochdruckhomogenisator durchgeführt. Da *Arthrospira platensis* in der Regel in tropischen und subtropischen Regionen angebaut wird und dann zur Extraktion des Phycocyanins in getrockneter Form nach Europa exportiert wird, wurde außerdem eine Sprühtrocknung durchgeführt. Das Phycocyanin wurde anschließend in

einer wässrigen Extraktion bei drei verschiedenen Temperaturen (20, 30 und 35 °C) aus der getrockneten Biomasse extrahiert. Die für diese Versuche verwendeten Anlagen sind in Abbildung 31 dargestellt.

Die Zellen für diesen Versuch wurden in einem für dieses Forschungsprojekt konzipierten Röhrenphotobioreaktor mit einem Fassungsvermögen von 38 L kultiviert. Der Reaktor wurde kontinuierlich mit LEDs beleuchtet (gemittelte Intensität: $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, gemessen auf der Oberfläche der Röhren). Als Kulturmedium wurde 20 %iges SOT-Medium verwendet, da dies zu einer guten PEF-Ausbeute führt (vgl. Abbildung 28) und trotzdem eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen sicherstellt. Zum Animpfen wurden Zellen aus einer Erlenmeyerkolbenkultur zunächst für 10 Tage in einem 2 L-Reaktor (Biobench, Biostream International) vermehrt. Der Reaktor wurde anschließend angeimpft und für 14 Tage kultiviert. Danach wurden 32 L aus dem Reaktor entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle 7 Tage 32 L entnommen, mit denen die nachfolgenden Versuche durchgeführt wurden. Dafür wurden die Zellen mit einem Tellerseparator vom Kulturmedium getrennt, zweimal mit derselben Menge destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in verdünntem Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,0, LF $2 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) auf eine Biomasse (Trockensubstanz) von $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ resuspendiert.

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde zu jedem Zellaufschluss ein optimierter Ultraschallzellaufschluss (Referenz) durchgeführt.



Abbildung 31: Links: Generator für die kontinuierliche PEF-Behandlung (HVP 5, Elea, Germany). Der Bildausschnitt zeigt die verwendete Behandlungskammer mit einer rechteckigen, parallelen Elektrodenkonfiguration und einem Elektrodenabstand von 7 mm sowie zwei Behandlungszonen. Zweite von links: Anlage für die kontinuierliche Ultraschallbehandlung. Die Anlage besteht aus 2 Vorratsbehältern, einer Schneckenpumpe, sowie einer Behandlungskammer mit Sonotrode. Der Bildausschnitt zeigt die Behandlungskammer sowie die Elektroden spitze. Zweite von rechts: Verwendeter Hochdruckhomogenisator (GEA PandaPLUS Laborhomogenisator 2000). Rechts: Sprühtrockner zur Herstellung von sprühtrocknetem Spirulina-Pulver (Büchi, Schweiz).

Da alle bisherigen PEF-Versuche in diesem Projekt im Batch-Verfahren durchgeführt wurden, wurden zunächst Versuche zur Ermittlung der optimalen Parameterkombination durchgeführt. Dafür wurde die Feldstärke auf $20 \text{ kV}/\text{cm}$ sowie die Eingangstemperatur auf 30 °C fixiert. Der Energieeintrag wurde auf drei Stufen zwischen 75 und $125 \text{ kJ}/\text{kg}$ variiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass $75 \text{ kJ}/\text{kg}$ (Behandlung A) nicht ausreichend waren, um eine vollständige Extraktion zu induzieren. Bei $100 \text{ kJ}/\text{kg}$ (Behandlung B) kam es hingegen zu einer vollständigen Freisetzung, verglichen mit der Referenz (Ultraschall). Interessanterweise führte eine weitere Erhöhung des spezifischen Energieeintrags nicht zu einem ähnlichen oder besseren Ergebnis. Die Phycocyanin-Ausbeute war in diesem Fall geringer als bei Behandlung B, aber höher als bei Behandlung A. Eine mögliche Erklärung dafür ist die hohe Austrittstemperatur von 59 °C . Dies liegt bereits im Bereich der Denaturierungstemperatur von Phycocyanin ($50\text{--}70 \text{ °C}$)⁷. Da bei diesen Temperaturen negative Einflüsse auf die Extraktqualität zu erwarten sind, wurden Behandlung A und Behandlung B für die weitere Versuchsplanung ausgewählt.

⁷ Lukas Böcker, Tom Hostettler, Michael Diener, Severin Eder, Teresa Demuth, Jozef Adamcik, Kai Reineke, Elena Leeb, Laura Nyström, Alexander Mathys, Time-temperature-resolved functional and structural changes of phycocyanin extracted from *Arthrospira platensis*/Spirulina, Food Chemistry, Volume 316, 2020, 126374, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126374>.

Der für die vergleichenden Versuche verwendete Parameterraum ist in Tabelle 8 aufgelistet. Da neue Daten aus der Literatur belegen, dass Calciumchlorid das Austreten von Chlorophyll verhindert⁸⁹, wurden sowohl den Hochleistungs-Ultraschallproben als auch den Hochdruck-Homogenisatorproben 0,1 M CaCl₂ vor der Behandlung zugegeben. Vorversuche zeigten außerdem, dass nach der PEF-Behandlung eine 6-stündige Extraktion notwendig war, um den maximalen Phycocyanin-Ertrag zu erreichen. Dies sind zwei Stunden mehr als in den zuvor dargestellten Versuchen (vgl. Abbildung 28 und Abbildung 29). Eine mögliche Ursache dafür ist, dass die Zellen in dem Röhrenreaktor durch den Einsatz einer Membranpumpe deutlich höheren Scherkräften ausgesetzt waren. Dies führt möglicherweise zu einer resistenteren Zellwand, die während der Extraktion erst aufgelöst werden muss. Diese Theorie sollte jedoch in zukünftigen Forschungsvorhaben genauer überprüft werden.

Tabelle 8: Für die vergleichenden Untersuchungen verwendete Aufschlussmethoden und die dazugehörigen Prozessparameter.

Zellaufschlussmethode	Prozessparameter	Extraktionszeit [min]
Hochleistungultraschall	0 bar, n 15 %, A 73,5 µm, 101,2 kJ/kg	120
	0 bar, n 4 %, A 73,5 µm, 209,2 kJ/kg	120
	2 bar, n 45 %, A 73,5 µm, 104,5 kJ/kg	120
	2 bar, n 20 %, A 73,5 µm, 203,9 kJ/kg	120
	4 bar, n 75 %, A 73,5 µm, 104,6 kJ/kg	120
	4 bar, n 35 %, A 73,5 µm, 205,9 kJ/kg	120
Sprühtrocknung und wässrige Extraktion	T _{Extraktion} 20 °C, 13900 kJ/kg	120
	T _{Extraktion} 30 °C, 13900 kJ/kg	120
	T _{Extraktion} 35 °C, 13900 kJ/kg	120
Hochdruckhomogenisator	400 bar, N 2, 148,4 kJ/kg	0
	500 bar, N 2, 185,5 kJ/kg	0
	600 bar, N 2, 222,6 kJ/kg	0
Pulsed electric fields (PEF)	77,7 kJ/kg, 20 kV/cm	360
	105,1 kJ/kg, 20 kV/cm	360
Hochleistungultraschall (batch, Referenz)	0 bar, A 180 µm, 100 kJ/kg, 5 cycles (10 s treatment, 20 s cooling on ice)	120

Abbildung 33 zeigt exemplarisch die mit den in Tabelle 8 aufgeführten Zellaufschlussverfahren hergestellten Extrakte, sowie die dazu aufgenommenen Absorptionsspektren. Es zeigt sich, dass alle vier getesteten Verfahren prinzipiell dazu geeignet sind, blaue Extrakte herzustellen. Dies bedeutet auch, dass durch die Zugabe von CaCl₂ die Freisetzung von Chlorophyll sowohl bei der Ultraschallprobe als auch bei der Hochdruck-Homogenisatorprobe effektiv verhindert wird. Dies ist auch anhand der assoziierten Absorptionsspektren zu erkennen. Diese weisen für die vier untersuchten Verfahren einen klaren Peak bei 615–620 nm auf. Dieser Peak kann dem Phycocyanin zugeordnet werden. Andere Peaks sind in diesen Kurven nur schwach ausgeprägt. Im Vergleich dazu weist die Absorptionskurve der Referenzprobe zwei weitere Peaks bei 430–440 nm bzw. 680 nm auf. Diese Peaks können dem Chlorophyll a zugeordnet werden.

⁸ Lauceri, R., Cavone, C., Chini Zittelli, G. *et al.* High Purity Grade Phycocyanin Recovery by Decoupling Cell Lysis from the Pigment Extraction: an Innovative Approach. *Food Bioprocess Technol* **16**, 111–121 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02926-w>

⁹ Kuhnholz, J., Glockow, T., Siebecke, V. *et al.* Comparison of different methods for extraction of phycocyanin from the cyanobacterium *Arthrospira maxima* (Spirulina). *J Appl Phycol* **36**, 1725–1735 (2024). <https://doi.org/10.1007/s10811-024-03224-y>

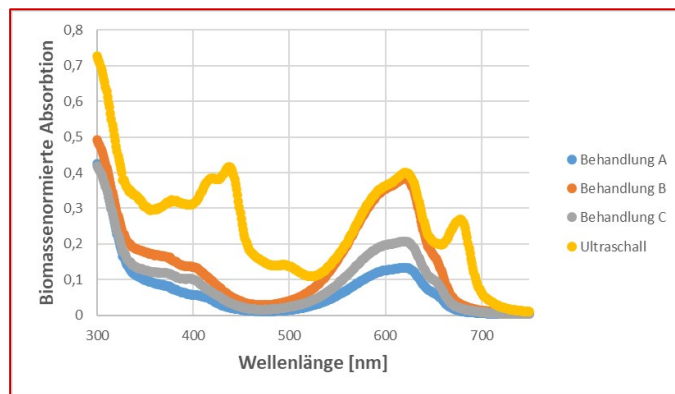
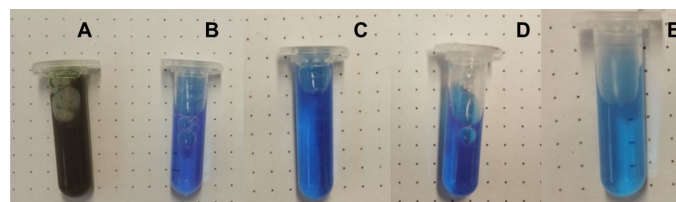


Abbildung 32: Absorptionsspektren von Phycocyaninextrakten. Die Extrakte wurden mit kontinuierlichen PEF-Behandlungen hergestellt. Behandlung A: 20 kV/cm, 75 kJ/kg, Behandlung B: 20 kV/cm 100 kJ/kg, Behandlung C: 20 kV/cm, 125 kJ/kg

Weshalb das zugesetzte Calcium die Freisetzung des Chlorophylls verhindert, wurde in diesem Projekt nicht geklärt. Ein möglicher Hinweis liefert jedoch Abbildung 34. Dort ist ersichtlich, dass das Zellinnere nach der Ultraschallbehandlung mit Calciumchlorid agglomeratähnliche Strukturen ausbildet. Diese sind nach der Behandlung ohne CaCl_2 nicht zu erkennen. Möglicherweise bilden sich durch die Calciumionen in der Lösung Komplexe, welche die Bildung von Mikroemulsionen verhindern. Diese Theorie sollte in zukünftigen Forschungsvorhaben weiter erörtert werden.



Extracts after treatment, A: Reference treatment; B: US; C: SD + E; D: HPH; E: PEF

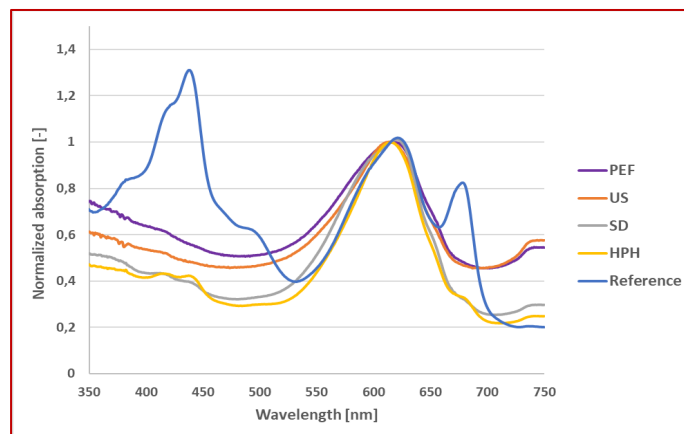


Abbildung 33: Oben: Beispielhafte Darstellung von Extrakten, die mit den in Tabelle 8 aufgeführten Zellaufschlussverfahren hergestellt wurden. A: Ultraschall (Referenz). B: kontinuierlicher Ultraschall mit CaCl_2 (US). C: wässrige Extraktion aus sprühtrockneten Zellen (SD). D: Hochdruckhomogenisator (HPH). E: gepulste elektrische Felder (PEF). Leichte Abweichungen in der Farbe können durch unterschiedliche Lichtbedingungen im Labor bedingt sein. Unten: Zugehörige Absorptionsspektren im Bereich von 350-750 nm. Die Spektren wurden auf den Absorptionswert bei 620 nm (C-Phycocyanin) normiert.

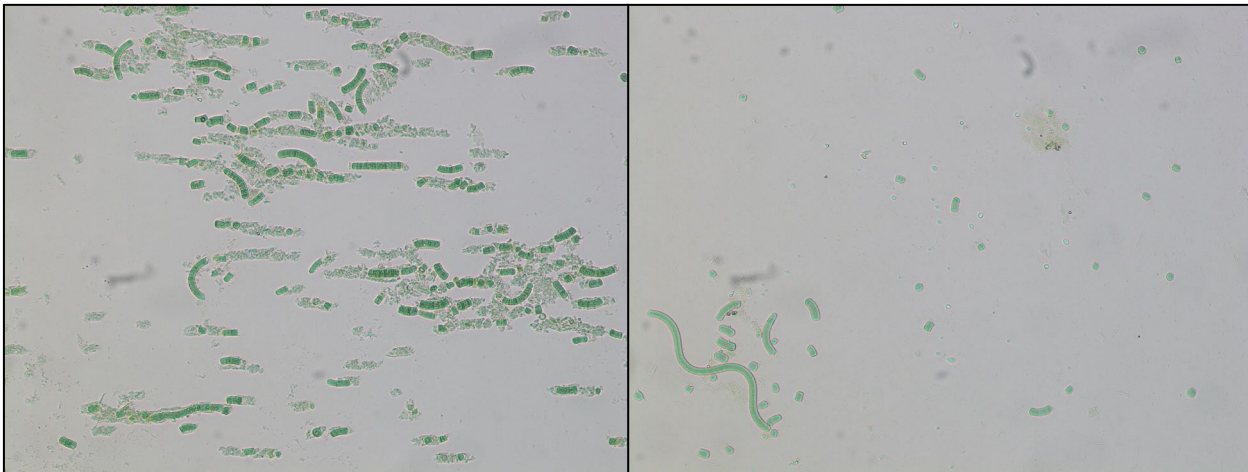


Abbildung 34: Links: Lichtmikroskopie- Aufnahme, 200x vergrößert, nach der Ultraschallbehandlung (50s, 100% Amplitude) mit 0,1M CaCl₂ im Behandlungspuffer. Rechts: Lichtmikroskopie-Aufnahme, 200x vergrößert nach der Ultraschallbehandlung ohne 0,1M CaCl₂.

Abbildung 35 zeigt den Phycocyaninertrag aus den in Tabelle 8 aufgeführten Aufschlussversuchen, bezogen auf das Referenzverfahren. Die Abbildung zeigt, dass alle getesteten Verfahren prinzipiell geeignet waren, Erträge von über 90 % zu erzielen. Im Falle der kontinuierlichen Ultraschallbehandlung zeigt sich die niedrigste Ausbeute. An dieser Stelle kann jedoch davon ausgegangen werden, dass das Verfahren prinzipiell dazu geeignet ist, höhere Ausbeuten zu erzielen. Es handelt sich an dieser Stelle vermutlich eher um ein strömungsmechanisches Problem. Der Behandlungsbereich unter einer Ultraschallsonotrode entspricht der Fläche der Sonotrode. Die Behandlungsintensität nimmt exponentiell mit dem Abstand zur Elektrode ab. Außerdem ist das Verhältnis vom Durchmesser des Zylinders zur Sonotrode im Falle der eingesetzten Anlage relativ groß. Dies bedeutet, dass der Spalt zwischen Sonotrode und Zylinderwand eventuell zu groß ist, weshalb eine kleine Fraktion der Zellsuspension nicht durch den Behandlungsbereich gepumpt wird. Dieses Problem kann möglicherweise behoben werden, indem die Zellsuspension zweimal durch die Behandlungskammer gepumpt wird oder indem der Spalt zwischen Zylinder und Sonotrode verkleinert wird.

Die in Abbildung 35 aufgeführte Reinheit berechnet sich aus dem Verhältnis der Absorption bei 615 nm (Phycocyanin) und 280 nm (aromatische Aminosäuren). Letzteres gilt als Maß für Proteine insgesamt. Es zeigt sich, dass alle Aufschlussverfahren bis auf die Sprühtrocknung zu Extrakten mit einer Reinheit von >0,7 geführt haben. Per Definition können diese Extrakte somit direkt als Lebensmittelzusatzstoff eingesetzt werden. Bei einer der beiden Sprühtrocknungsproben wurden unter dem Mikroskop größere Mengen Fremdalgen beobachtet. Dies ist auch eine mögliche Erklärung für die große Standardabweichung bei diesen Proben, da die Biomasse mithilfe der Absorption bei 750 nm bestimmt wird. Bei dieser Wellenlänge absorbieren allerdings alle Zellen, nicht nur *Arthrospira platensis*.

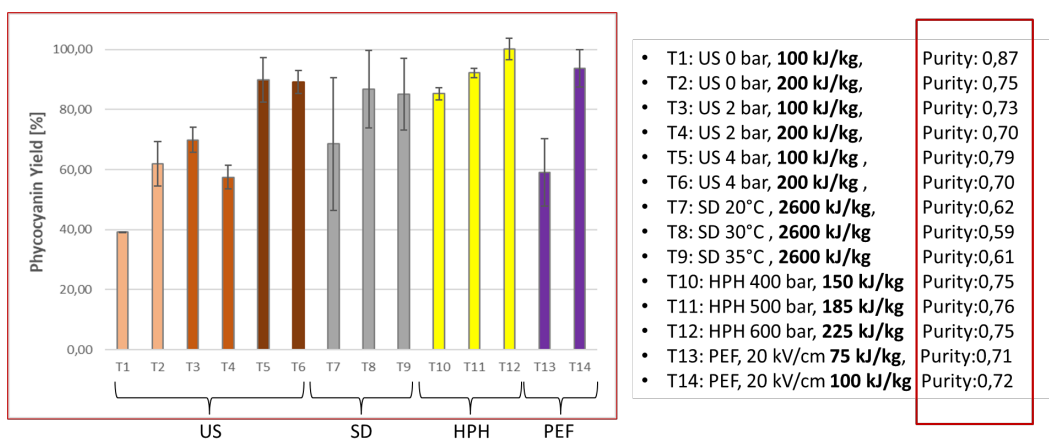


Abbildung 35: Phycocyaninertrag (Yield) der mit den in Tabelle 8 aufgeführten Aufschlussverfahren hergestellten Extrakte. Die Fehlerbalken stellen die Abweichung der Mittelwerte aus zwei biologischen Wiederholungen dar (n=2). Die Reinheit (Purity) der Extrakte wurde aus dem Verhältnis der Absorptionswerte bei 615 und 280 nm berechnet.

Abbildung 36 zeigt den spezifischen Gesamtenergieeintrag, der zur Herstellung von einem Kilogramm Phycocyanin benötigt wurde. Als Grundlage für die Berechnung dient der spezifische Energieeintrag, welcher zum maximalen Ertrag der jeweiligen Aufschlussmethode geführt hat (100 kJ·kg⁻¹ für PEF und Ultraschall, 200 kJ·kg⁻¹ für Hochdruck-Homogenisation und 13.900 kJ·kg⁻¹ für Sprühtrocknung). Weiterhin wurde von einer

Biomassekonzentration von $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ausgegangen, welche 10 % Phycocyanin enthält. Dadurch ergeben sich spezifische Energieeinträge für den Zellaufschluss von $200 \text{ kJ} \cdot \text{kg}^{-1}$ für PEF und Ultraschall sowie $400 \text{ kJ} \cdot \text{kg}^{-1}$ für den Hochdruck-Homogenisator und $27.800 \text{ kJ} \cdot \text{kg}^{-1}$ für die Sprühtrocknung. Außerdem wurde in der Abbildung das Rühren und das Heizen während der Extraktion berücksichtigt. Der Energiebedarf für Ersteres wurde mithilfe der Reynolds-Zahl für Rührprozesse sowie der Leistungskennzahl für Rührwerke abgeschätzt. Für die Stoffwerte wurden die Daten von Wasser angenommen. Die so berechnete Leistung wurde mit der Extraktionszeit multipliziert und durch die Phycocyaninmasse geteilt.

Zur Berechnung der notwendigen Leistung für das Heizen wurde von einem adiabaten Rührkessel ausgegangen, der von Raumtemperatur auf die gewünschte Extraktionstemperatur ($30 \text{ }^\circ\text{C}$ für PEF und Ultraschall bzw. $35 \text{ }^\circ\text{C}$ für Sprühtrocknung) aufgeheizt wurde. Auch wenn die hier getroffenen Annahmen eine sehr starke Vereinfachung darstellen (kein Wärmeverlust während der Extraktion, kein Einfluss der Biomasse auf die Viskosität usw.), zeigt die Abbildung, dass bei der PEF- und Ultraschallbehandlung ein Großteil der aufzubringenden Energie auf die Extraktion entfällt. Dies verdeutlicht noch einmal die Bedeutung des Wissens zum Zusammenhang zwischen der Beschaffenheit der Biomasse und dem Erfolg der PEF-Behandlung.

In den zuvor gezeigten Ergebnissen waren vier, in einigen Fällen auch drei Stunden Extraktion ausreichend. In diesen Fällen wurden die Zellen in einer Blasensäule kultiviert, während hier eine Kultivierung in größerem Maßstab (38 L, Röhrenreaktor) durchgeführt wurde.

Aus energetischer Sicht ist der Zellaufschluss mit dem Hochdruck-Homogenisator am günstigsten, obwohl der Aufschluss selbst einen höheren spezifischen Energieeintrag hat. Dies liegt daran, dass nach der Behandlung keine Extraktion notwendig war, um den maximalen Ertrag zu erreichen.

Inwieweit das zugegebene Calciumchlorid nach der Extraktion entfernt werden muss, wurde im Rahmen dieses Projekts nicht erörtert. Ein mögliches Problem ergibt sich aus der Verwendung in Kombination mit Alginat. Alginat bildet in Verbindung mit Calciumionen Netzwerke aus, die zu einer Erhöhung der Viskosität führen. Dies kann im Fall des Phycocyaninextrakts mit Calciumionen zu einer nachteiligen Veränderung der technofunktionellen Eigenschaften im Produkt führen.

Inwieweit sich die Zellaufschlussverfahren positiv oder negativ auf die Qualität der Extrakte auswirken, wurde im Rahmen dieses Projekts in Arbeitspaket 6 untersucht und wird zu einem späteren Zeitpunkt in diesem Bericht erörtert.

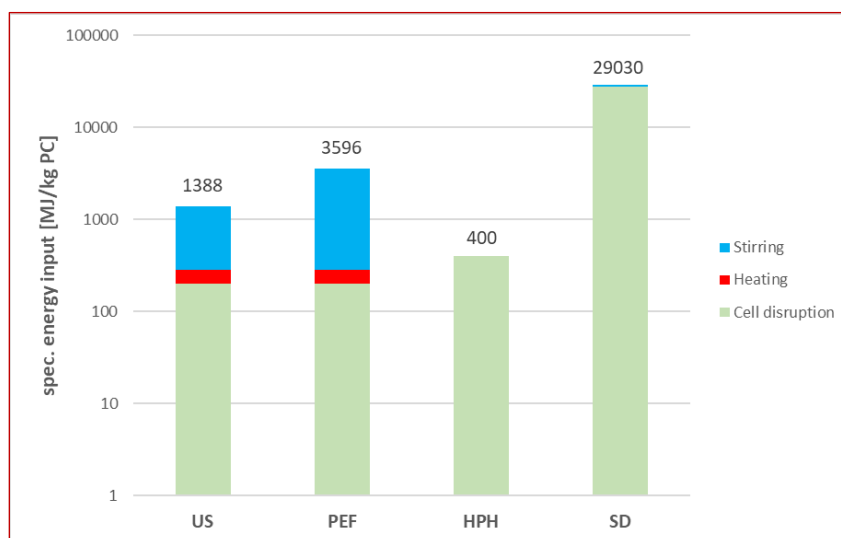


Abbildung 36: spezifischer Gesamtenergieeintrag zur Herstellung von einem kg Phycocyanin. Als Berechnungsgrundlage wurde der Energieeintrag verwendet, der zur maximalen Ausbeute des jeweiligen Verfahrens führte (vgl. Abbildung 35). Zu beachten ist die logarithmische Auftragung auf der Y-Achse.

Einfluss der Biomasse

Bei der Beantragung des vorliegenden Forschungsprojektes wurde die Annahme getroffen, dass die Biomassekonzentration keinen Einfluss auf die Effizienz des Zellaufschlusses mit gepulsten elektrischen Feldern hat. Diese Annahme beruhte auf Literaturdaten für die Mikroalge *Auxenochlorella protothecoides*¹⁰. Um zu überprüfen, ob diese Hypothese auf *Arthrospira platensis* übertragbar ist, wurden Zellen aus einer Outdoorkultivierung im Photobioreaktor verwendet. Die Zellen wurden gerettet, zweimal mit destilliertem

¹⁰ Martina Goettel, Christian Eing, Christian Gusbeth, Ralf Straessner, Wolfgang Frey, Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae, Algal Research, Volume 2, Issue 4, 2013, Pages 401-408, ISSN 2211-9264, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.07.004>.

Wasser gewaschen und anschließend auf eine Biomassekonzentration von $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in verdünntem Natrium-Phosphatpuffer resuspendiert ($\text{pH } 7,2$, Leitfähigkeit $1.000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Aus dieser Suspension wurden außerdem zwei weitere Suspensionen mit Konzentrationen von $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ durch Verdünnung mit demselben Puffer hergestellt.

Diese Proben wurden in einer selbst konzipierten Batch-Behandlungskammer mit einem Volumen von 20 mL (Füllvolumen 14 mL) und einem Plattenabstand von 1 cm behandelt. Als Generator diente die für dieses Projekt angeschaffte Anlage (HVP 5, Elea GmbH, Germany). Die Zellen wurden bei $14 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ und $100 \text{ kJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ behandelt. Die Versuche wurden zweimal wiederholt ($n = 2$).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Biomasse in unserem Versuch einen Einfluss auf den Zellaufschluss hat. So ist der mit der Biomasse bereinigte Phycocyaningehalt bei der Probe mit $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ über die gesamte Extraktionszeit am höchsten. Gefolgt wird dieser in absteigender Reihenfolge von den Proben mit Biomassekonzentrationen von $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bzw. $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Wie an der Ausbeute (rechte Grafik in Abbildung 35) zu erkennen ist, ließ sich dieser Effekt bei zwei biologischen Wiederholungen reproduzieren.

Ein Grund für die Abweichungen zwischen den hier gezeigten Daten und der zitierten Studie könnte in der Form der Zellen begründet sein. *Auxenochlorella protothecoides* ist eine einzellige, runde Mikroalge mit einem Durchmesser $< 10 \mu\text{m}$. Im Gegensatz dazu besteht *Arthrospira platensis* aus Trichomen mit einer Länge von ca. $150\text{--}250 \mu\text{m}$, in denen sich die einzelnen Zellen spiralförmig anordnen. Möglicherweise stört diese Geometrie das elektrische Feld stärker, als es runde Zellen mit kleinerem Durchmesser tun.

Außerdem wurden in der zitierten Studie höhere Feldstärken verwendet ($23\text{--}43 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$) als in den gezeigten Versuchen. Dies könnte ebenfalls zu einem besseren Zellaufschluss bei höheren Biomassekonzentrationen beitragen.

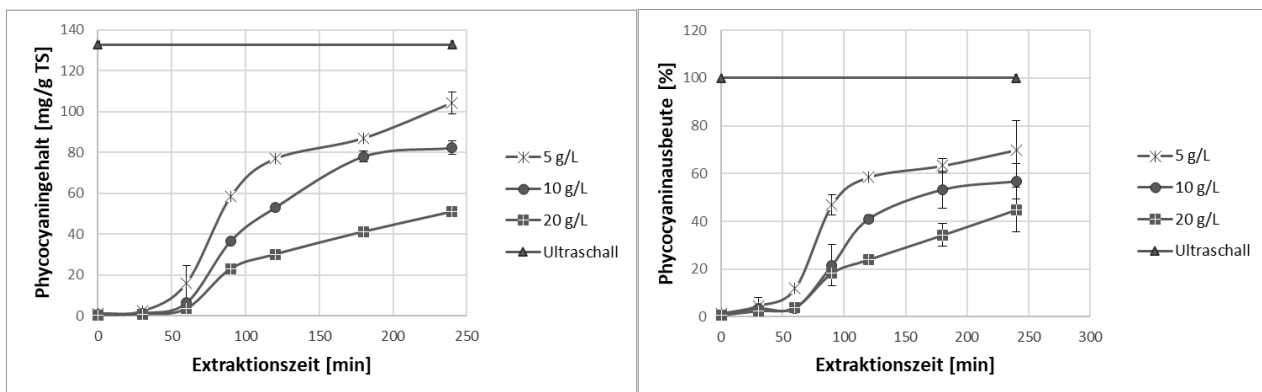


Abbildung 37: Links: Phycocyaningehalt [mg/g TS] im Überstand nach der PEF-Behandlung ($14 \text{ kV}/\text{cm}$, $100 \text{ kJ}/\text{kg}$) in Abhängigkeit der Extraktionszeit und der Biomassekonzentration. Rechts: Phycocyaninausbeute bezogen auf die Ultraschallbehandlung (Referenz) in Abhängigkeit der Extraktionszeit und der Biomassekonzentration. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichung der Mittelwerte aus zwei biologischen Wiederholungen.

Diese Vermutung wird durch eine weitere Studie belegt¹¹. Die Autoren untersuchten den Einfluss der Zellkonzentration (Chinesische hamster ovary Zellen) auf die Permeabilisierung der Zellmembran. Die Studie kam zu einem ähnlichen Ergebnis wie die hier gezeigten Versuche. Die Erhöhung der Zellkonzentration von $10 \times 10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{mL}^{-1}$ auf $400 \times 10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{mL}^{-1}$ führte zu einer Verringerung der Permeabilisierung um bis zu 50 %. Laut der Studie ließ sich dieser Effekt jedoch ausgleichen, indem die Feldstärke bei gleichem Energieeintrag ($\text{kJ}\cdot\text{L}^{-1}$) erhöht wurde. In unseren Versuchen war dies aufgrund der limitierten Leistung des Pulsgenerators in Verbindung mit der Behandlungskammer nicht möglich.

Das Wissen über den von uns gezeigten Effekt hat dennoch praktischen Nutzen. In kontinuierlichen Behandlungskammern mit kollektiver Elektrodenkonfiguration sind elektrische Felder sehr inhomogen. Dies führt dazu, dass Zellen in einer kontinuierlichen Behandlung unterschiedlichen Behandlungsintensitäten ausgesetzt sind. Unterschiede zwischen Proben mit verschiedener Biomassekonzentration, aber gleicher Behandlungsintensität (Feldstärke und spezifischer Energieeintrag [$\text{kJ}\cdot\text{L}^{-1}$]) können somit über den hier gezeigten Unterschied erklärt werden. Die häufig in der Literatur geäußerte These, dass sich durch die Erhöhung der Trockensubstanz die Energieeffizienz des Behandlungsprozesses verbessern lässt, ist somit zumindest für niedrigere Feldstärken nicht haltbar. Zukünftige Forschungsvorhaben sollten sich deshalb weiter mit dem Einfluss der Biomassekonzentration auf die PEF-Behandlung auseinandersetzen, insbesondere bei höheren Feldstärken. Auch Fragen bezüglich des Einflusses des Fließverhaltens auf den Behandlungserfolg in kontinuierlichen Behandlungskammern sollten weiterhin untersucht werden.

¹¹ Pucihar, G., Kotnik, T., Teissié, J. et al. Electroporation of dense cell suspensions. *Eur Biophys J* **36**, 173–185 (2007). <https://doi.org/10.1007/s00249-006-0115-1>

Beschreibung des Zellaufschlusses mittels eines kinetischen Modells als Funktion von Prozesszeit, -temperatur und elektrischer Feldstärke

Wie bereits im Rahmen dieses Berichtes erläutert, ist der Erfolg der Behandlung stark von den Kultivierungsbedingungen und damit vom Zustand der Zellen abhängig. Ursprünglich wurde im Rahmen dieses Projektes angestrebt, eine Kinetik für den Zellaufschluss in Abhängigkeit von Behandlungszeit, -temperatur und elektrischer Feldstärke aufzunehmen. Diese sollte dann in CFD-Simulationen implementiert werden, um den kontinuierlichen PEF-Prozess zu optimieren.

Neben der Abhängigkeit vom Zustand der Biomasse zeigte sich auch, dass die ermittelten Kinetiken zum Zellaufschluss (aufgenommen durch die Färbung mit Propidiumiodid, siehe Zwischenbericht Frühjahr 2022) nicht zwangsläufig mit der Freisetzung des Phycocyanins korrelieren. So waren bei 30 °C Behandlungstemperatur ca. 40 kJ·kg⁻¹ Energieeintrag nötig, um die Zellkultur vollständig zu permeabilisieren. Eine vollständige Freisetzung des Phycocyanins wurde aber, je nach Zustand der Kultur, erst durch einen Energieeintrag von 75–100 kJ·kg⁻¹ erreicht.

Aufgrund der hier aufgeführten Gründe ist die Aufnahme einer Zellaufschlusskinetik nicht zielführend, da sie keine Allgemeingültigkeit besitzt. Wir verweisen an dieser Stelle auch auf den Zwischenbericht vom Frühjahr 2023. Aus diesem Grund wurde der Ansatz nicht weiterverfolgt.

Zur Optimierung des PEF-Prozesses und zur Maßstabsübertragung mit CFD-Simulationen wurde ein anderes Vorgehen gewählt, das an anderer Stelle im Bericht zu diesem Arbeitspaket genauer erläutert wird (vgl. Abschnitt ‚CFD-Simulation des PEF-Prozesses zur Erhebung von Geometrieinflüssen‘).

An dieser Stelle sollen dennoch die wichtigsten Parameter, die zu einer erfolgreichen PEF-Behandlung führen, tabellarisch zusammengefasst werden. Für Versuche zu den optimalen Behandlungsparametern verweisen wir an dieser Stelle auch auf die Zwischenberichte aus diesem Projekt sowie auf bereits publizierte Daten¹².

Tabelle 9: Im Rahmen des Forschungsprojektes ermittelten optimalen Prozessparameter zur Gewinnung von Phycocyanin aus Arthrospira platensis mit gepulsten elektrischen Feldern (PEF).

Parameter	Größe	Bemerkung
Elektrische Feldstärke	20 kV/cm	Höhere Feldstärken haben im Projekt zu einer verbesserten Permeabilisierung geführt aber nicht zu einer besseren Freisetzung des Phycocyanins.
Spezifischer Energieeintrag	75-100 kJ/kg	Bei der Kultivierung in salzreduzierten Medien (5-20% Carbonat vom Originalmedium) waren niedrigere Energieeinträge ausreichend. 100 kJ/kg führten verlässlich zu einer vollständigen Freisetzung.
Behandlungstemperatur/ Einlasstemperatur	30-40°C	Bei der Permeabilisierung haben sich 45°C als vorteilhaft erwiesen. Bei einem kontinuierlichen Prozess mit 100 kJ/kg kann dies jedoch zur Schädigung von temperatursensitiven Produkten führen (Temperaturanstieg ca. 24°C). Je nach Haltezeiten (Anlagenspezifisch) sollte eine möglichst niedrige Einlasstemperatur gewählt werden.
Pulsbreite (Kontinuierlich)	20 µs	Die Arbeiten im Rahmen von diesem Projekt haben gezeigt, dass kürzere Pulse mit einer höheren Frequenz (bei gleichem Energieeintrag) vorteilhaft für die Freisetzung des Phycocyanins sind.
Frequenz	65 Hz bei 33 l/h und 20 µs Pulsbreite	

¹² Knappert J, Nolte J, Friese N, Yang Y, Lindenberger C, Rauh C and McHardy C (2022) Decay of Trichomes of *Arthrospira platensis* After Permeabilization Through Pulsed Electric Fields (PEFs) Causes the Release of Phycocyanin. *Front. Sustain. Food Syst.* 6:934552. doi: 10.3389/fsufs.2022.934552

Kultivierungsmedium	SOT-Medium mit reduziertem Carbonatgehalt (20% vom Originalmedium)	Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Kultivierung in salzreduziertem Medium vorteilhaft ist, da der Aufschluss energieeffizienter ist. Es konnte gezeigt werden, dass Wachstum, Phycocyaningehalt und EPS-Gehalt nicht negativ beeinflusst werden.
Kultivierungsdauer	7 Tage	Nach 7 Tagen (Exponentielle Wachstumsphase) war der Zellaufschluss mit PEF am effektivsten.
pH-Wert (Kultivierung)	9,5	Der pH-Wert muss während der Kultivierung in salzreduziertem Medium mit CO ₂ geregelt werden.
Lichtintensität	80-180 μmol m ⁻² s ⁻¹	Die obere Grenze entspricht den Ergebnissen der Forschungsstelle aus Amberg. Die untere sind die Lichtintensitäten, die bei der Kultivierung in der Blasensäule verwendet wurden. Lichtintensitäten sind stark von dem Ort der Messung abhängig. Generell sind niedrigere Intensitäten vorzuziehen.
Extraktionsbedingungen	30°C, pH 7	Höhere Temperaturen (35°C) können zwar die Extraktion verbessern, können aber zu leichten Verunreinigungen mit Chlorophyll führen
Extraktionspuffer	1/4 Zugabe von 0,2M Natrium-Phosphate-Puffer	In früheren Zwischenberichten wurde berichtet, dass 1/3 der Gesamtmenge nach der PEF-Behandlung mit unverdünntem Puffer aufgefüllt werden müssen. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass 1/4 ausreichend sind.

CFD Simulation des PEF-Prozesses zur Erhebung von Geometrieinflüssen

Da die Prozessgrößen bei der PEF-Behandlung stark von der Geometrie der Behandlungskammer abhängig sind, sind vorhersagen zum Behandlungserfolg und insbesondere die Übertragung von Ergebnissen auf Anlagen größeren Maßstabs schwierig und mit einer hohen Anzahl an Versuchen verbunden. Dies trifft insbesondere auf den spezifischen Energieeintrag w_{spec} und die mittlere elektrische Feldstärke, sowie die Inhomogenität des elektrischen Feldes zu. Im Wesentlichen ist dies auf die unterschiedlichen Verweilzeiten, Strömungsregime, Temperaturspitzen und geometrischen Bauweisen der Isolatoren (in welchen sich das elektrische Feld ausbildet) zurückzuführen. Die Kenntnis über die genannten Prozessgrößen ist jedoch unerlässlich, um eine erfolgreiche Behandlung vorhersagen zu können bzw. Sicherzustellen. Zur Untersuchung der Geometrieinflüsse und zur Maßstabsübertragung wurde in diesem Projekt eine Kombination aus CFD-Simulation und dimensionslosen Kennzahlen gewählt. Dafür wurden zunächst die Transportgleichung für Massen- Impuls, Energie- und Ladungserhalt aufgestellt. Für die gezeigten Simulation wurden stationäre Bedingungen angenommen:

$$\text{Massenerhalt} \quad \nabla \rho u = 0 \quad (1)$$

$$\text{Impulserhalt (Navier-Stokes)} \quad \rho(T)u\nabla u = -\nabla p + \nabla \mu(T)(\nabla u) + \rho(T)g \quad (2)$$

$$\text{Energieerhalt} \quad \rho(T)cp(T)\nabla uT = \nabla k(T)\nabla T + \tau f \sigma(T)E^2 \quad (3)$$

$$\text{Ladungserhalt (Laplace)} \quad \nabla \sigma(T)\nabla \Phi, E = -\nabla \Phi \quad (4)$$

Dabei sind ∇ der Nablaoperator, u die Geschwindigkeit, ρ die Dichte des Fluids, T die Temperatur, p der statische Druck, μ die dynamische Viskosität, g die Erdbeschleunigungskonstante, cp die Wärmekapazität, k die thermische Leitfähigkeit, τ die Pulsbreite, f die Pulswiderholungsrate, σ die elektrische Leitfähigkeit, E die elektrische Feldstärke und Φ das elektrische Potential. Zur Herleitung der dimensionslosen Kennzahlen wurden die Stoffgrößen in den Gleichungen (1)- (4) mit geeigneten Größen entdimensioniert. Diese sind vor

allen Stoffgrößen bei gegebener Temperatur oder Maße der Geometrie, wie z.B. die Länge der Isolatoren. Am Beispiel der Energieerhaltungsgleichung (3) soll das Vorgehen im Folgenden verdeutlicht werden. Die entdimensionierten Stoffgrößen und die zur endimensionierung verwendeten, dimensionsbehafteten Größen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10 zur entdimensionierung der Energiegleichung verwendete Größen

Formelzeichen	Größe für die entdimensionierung	Physikalische Bedeutung
$c_p = c_p^* c_{p,0}$	$c_{p,0}$	Wärmekapazität bei Einlasstemperatur T_0
$\rho = \rho_p^* \rho_{p,0}$	$\rho_{p,0}$	Dichte bei Einlasstemperatur T_0
$\frac{\nabla^*}{l_0} = \nabla$	l_0	Charakteristische Länge. Länge der Isolatoren
$\lambda = \lambda^* \lambda_0$	λ_0	Wärmeleitfähigkeit bei Einlasstemperatur T_0
$T = T^* \cdot T_0$	T_0	Einlasstemperatur
$\tau = \tau^* \tau_0$	τ_0	Charakteristische effektive Pulslänge des Generators
$f = f^* f_0$	f_0	Eingestellte Pulswiederholungsrate
$u = u^* u_0$	u_0	Mittlere Eintrittsgeschwindigkeit
$E = \frac{E^* U_0}{l_0}$	$\frac{U_0}{l_0}$	Verhältnis angelegte Spannung zu Isolatorlänge

Die in Tabelle 10 aufgeführten Größen wurden in Gleichung (4) eingesetzt. Durch Umformen erhält man folgenden Ausdruck:

$$\nabla^* (c_p^* \rho^* v^* T^*) - \frac{\lambda_0}{l_0 v_0 c_{p,0} \rho_0} \nabla^{*2} (\lambda^* T^*) = \frac{\tau_0 f_0 \sigma_0 U_0^2}{l_0 v_0 c_{p,0} \rho_0 T_0} (\sigma^* \tau^* f^* E^{*2}) \quad (5)$$

Dabei bleiben zwei Vorfaktoren übrig. Ein Vorfaktor skaliert die Wärmeleitung. Dieser kann als Reziprok der Pecletzahl geschrieben werden, welche das Verhältnis von advektiven zu diffusiven Flüssen beschreibt und auch als Produkt der Reynolds und Prandlzahl geschrieben werden kann. Der zweite Term skaliert den Quellterm der Energiegleichung über den die Erwärmung des Fluides, durch das elektrische Feld beschrieben wird. Dieser Vorfaktor ist ebenfalls dimensionslos jedoch bislang noch nicht in der Literatur beschrieben. Zusammengefasst kann Gleichung (5) wie folgt geschrieben werden:

$$c_p^* \rho^* \frac{\partial T^*}{\partial t^*} + \nabla^* (c_p^* \rho^* v^* T^*) - \frac{1}{Pe} \nabla^{*2} (\lambda^* T^*) = F_E \cdot (\sigma^* \tau^* f^* E^{*2}) \quad (6)$$

Dieselbe Prozedur kann mit der Navier-Stokes Gleichung (2) durchgeführt werden. Als Resultat bekommt man die Reynoldszahl als Vorfaktor für den diffusiven Impulstransport.

Um zu überprüfen, ob sich die relevanten Größen spezifischer Energieeintrag, mittlere elektrische Feldstärke und die Inhomogenität des elektrischen Feldes mit den hergeleiteten dimensionslosen Kennzahlen beschreiben lassen wurden CFD-Simulation auf Behandlungszellen mit kolinearer Elektroden/Isolatoranordnung durchgeführt. Dafür wurde die Skala der Behandlungskammer insgesamt sowie die Geometrie der Isolatoren variiert. Insgesamt wurden fünf Behandlungskammern mit geometrischer Ähnlichkeit und variabler Skalierung mit jeweils fünf verschiedenen Isolatorgeometrien mit variablem Längen zu Durchmesser (L/D) Verhältnis simuliert. Beispielhafte Darstellungen der Behandlungskammern sind in Abbildung 38 dargestellt. Das dreidimensionale Rechengebiet (Domain) wurde mit Hilfe der Software Ansys Mesh mit einem unstrukturierten Gitter diskretisiert. Die Gleichungen (1)-(4) wurden mit dem Ansys CFX Solver unter Berücksichtigung der in Tabelle 11 aufgeführten Randbedingungen gelöst.

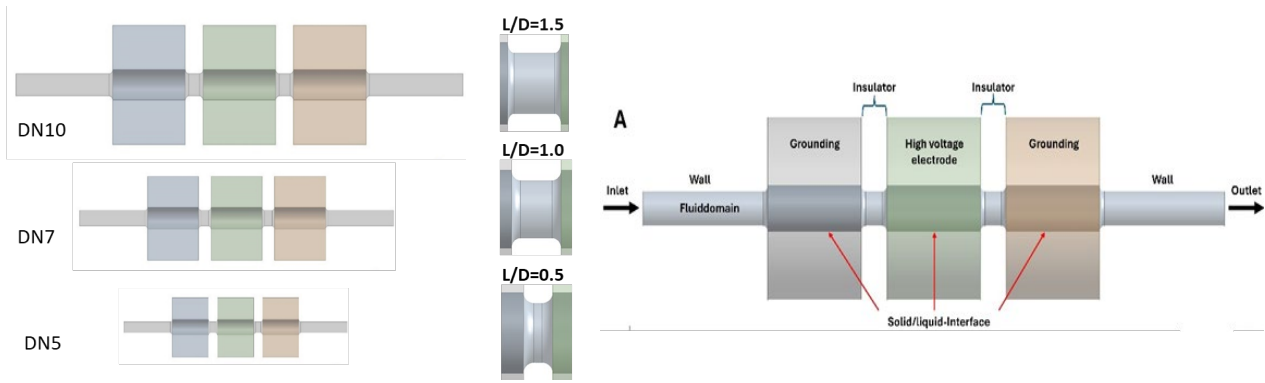


Abbildung 38: Verwendete Geometrie. Links: Beispielhafte Darstellung für drei der fünf verschiedenen verwendeten Skalen der Behandlungskammern mit geometrischer Ähnlichkeit. Es wurden zusätzlich noch zwei kleinere Skalen (DN3 und DN1) berechnet. Die Bezeichnung bezieht sich auf die Nennweite des Rohres am Einlass. Mitte: Beispielhafte Darstellung für drei der fünf verschiedenen Isolatorgeometrien. Das L/D-Verhältnis wurde variiert, indem die Länge (L) verändert wurde und der Durchmesser (D) konstant gehalten wurde. Zusätzlich wurden noch L/D-Verhältnisse von 0,8 und 1,2 verwendet. Rechts: Rechendomain mit den angenommenen Randbedingungen zur Lösung des Gleichungssatzes (1)-(4).

Tabelle 11: Randbedingungen zur Lösung des Differentialgleichungssystems (1)-(4)

	Inlet	Walls and Insulators	HVE Surface (solid)	Elektrode (outer) Walls (solid)	Grounding Surface (solid)	Outlet	Inferfaces
Impulserhalt	$u = u_0$	$u = 0$	n.A.	n.A.	n.A.	$p = p_{ref}$	n.A.
Energieerhalt	$T = T_0$	$q = -\lambda \nabla T = 0$	$q = -\lambda \nabla T = 0$	$q = -\lambda \nabla T = 0$	$q = -\lambda \nabla T = 0$	$\nabla T = 0$	$q_l = q_s$
Ladungserhalt	$\nabla U = 0$	$\nabla U = 0$	$U = U_{applied}$	$\nabla U = 0$	$U = 0$	$\nabla U = 0$	$\nabla U_l = \nabla U_s$

Die Eingangstemperatur T_0 wurde in den Simulationen auf 293 K festgelegt. Die Eingangsgeschwindigkeit u_0 wurde so variiert, dass in den Isolatoren Reynoldszahlen von 200-2300 herrschen. Das Verhältnis der angelegten Spannung U_0 zur Länge der Isolatoren l_0 wurde in einem Bereich von $0,5-2,5 \times 10^6$ [V/m] variiert. Die Frequenz wurde so variiert, dass spezifische Energieeinträge im Bereich von 0,7-200 kJ/kg realisiert wurden.

Abbildung 39 zeigt die Contourplots des elektrischen Feldes (links), der Geschwindigkeit (Mitte) und der Temperatur (rechts) für zwei verschiedene Reynoldszahlen (1300 bzw. 2300) im Bereich des ersten Isolators. Die angelegte Spannung sowie der spezifische Energieeintrag sind in beiden Fällen identisch. Die Plots des elektrischen Feldes belegen die für die kolineare Elektrodenkonfiguration typische Inhomogenität. Diese liegt zum einen in der Bauweise und dem damit verbundenen Verlauf der Feldlinien begründet. Es zeigt sich aber auch, dass das Strömungsregime ebenfalls einen Einfluss hat. So sind die Feldspitzen bei niedrigeren Reynoldszahlen stärker ausgeprägt als bei hohen. Dies kann damit erklärt werden, dass die Wärmemenge bei größeren Fließgeschwindigkeiten schneller abtransportiert wird. Dadurch ändert sich die Leitfähigkeit am Übergang des Isolators zur Elektrode weniger stark und somit auch der Gradient des elektrischen Potentials, aus dem sich das elektrische Feld berechnet. Dies belegt, dass die Strömungsgeschwindigkeit bei der Ermittlung von dimensionslosen Kennzahlen zur Beschreibung des elektrischen Feldes berücksichtigt werden muss.

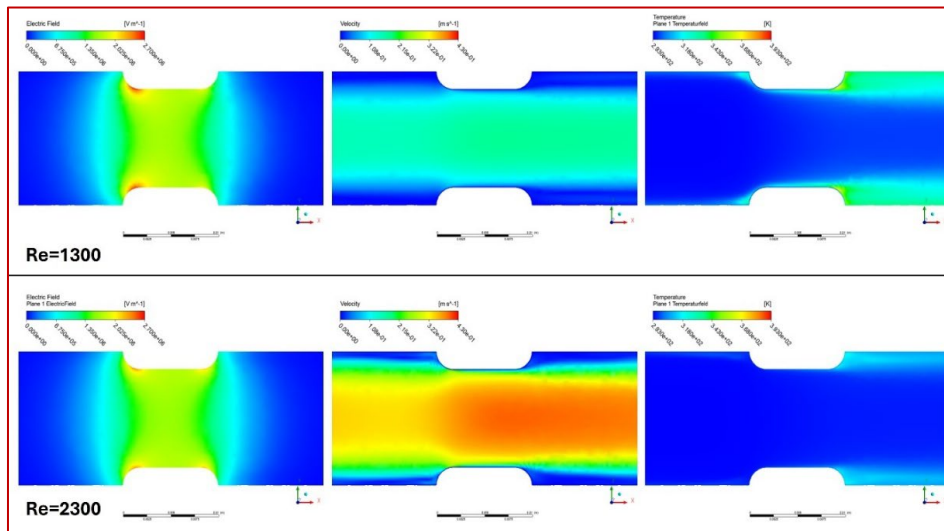


Abbildung 39: Contourplots des elektrischen Feldes (links), der Geschwindigkeit (Mitte) und der Temperatur (rechts) für zwei verschiedene Reynoldszahlen ($Re=1300$, oben, $Re=2300$, unten). Die Plots zeigen den Ausschnitt im ersten Isolator einer DN10 Zelle mit einem L/D -Verhältnis von 1.

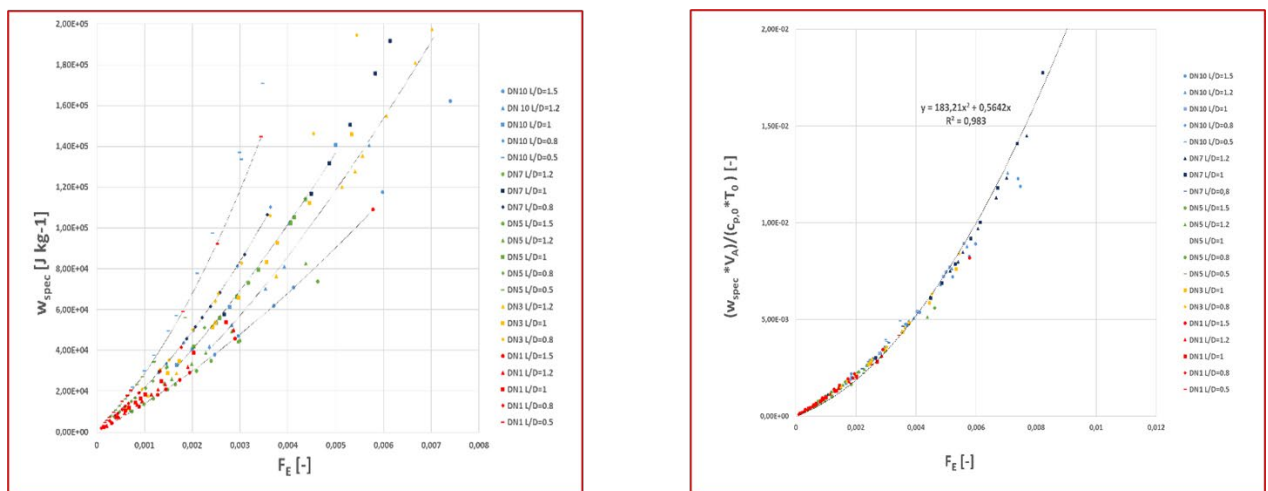


Abbildung 40: Links: Spezifischer Energieeintrag w_{spec} als Funktion des aus Gleichung (3) ermittelten Forfaktors F_E für alle simulierten Behandlungskammern (DN1-DN10) mit allen L/D -Verhältnissen der isolatoren (0,5-1,5). Rechts: Spezifischer Energieeintrag w_{spec} multipliziert mit dem aktiven Volumen V_A . Der spezifische Energieeintrag wurde mit der Einlasstemperatur T_0 und der spezifischen Wärmekapazität bei dieser Temperatur $c_{p,0}$ entdimensioniert.

Abbildung 40 (links) zeigt den spezifischen Energieeintrag w_{spec} als Funktion des aus Gleichung (3) ermittelten Forfaktors F_E . Dabei zeigt sich eine Streuung der Daten, welche hauptsächlich auf der Geometrie der Isolatoren und weniger auf der Skala der Behandlungskammer beruhen zu scheinen (Datenpunkte mit gleichem L/D -Verhältnis aber unterschiedlicher Skala fallen auf eine Linie). Außerdem zeigen die Daten, dass es keine Rolle spielt, welche Größe in F_E geändert wird, da alle Daten auf eine Linie fallen unabhängig davon, ob die angelegte Spannung, die Einlassgeschwindigkeit oder die Frequenz geändert wurden. Um der Beobachtung, dass die Geometrie der Isolatoren den größten Einfluss hat, Rechnung zu tragen, wurde das aktive, dimensionslose Volumen eingeführt. Dieses berechnet sich aus dem Verhältnis des Isolatorvolumens und dem Gesamtvolumen der Behandlungskammer:

$$V_A = \frac{\text{Volumen Isolator}}{\text{Gesamtvolumen Behandlungskammer}} \quad (7)$$

Abbildung 40 (rechts) zeigt den spezifischen Energieeintrag unter Berücksichtigung des aktiven Volumens. Außerdem wurde der Energieeintrag unter Zuhilfenahme der Einlasstemperatur T_0 und der spezifischen Wärmekapazität bei Einlasstemperatur. Es zeigt sich, dass die Datenpunkte weitestgehend auf eine Linie fallen. Ein quadratisches Modell wurde mit Hilfe von Excel an diese Datenpunkte gefittet. Umgestellt nach w_{spec} ergibt sich folgende Gleichung:

$$w_{spec} = \frac{c_{p,0} T_0}{V_A} (183,21 \cdot F_E^2 + 0,5642 \cdot F_E); R^2 = 0,98 \quad (8)$$

Mit Hilfe von Gleichung (8) kann der spezifische Energieeintrag alleine über bekannte Größen im Vorfeld der Behandlung berechnet werden. Die Gleichung kann ebenfalls genutzt werden, um Ergebnisse von einer Behandlungskammer auf die andere zu übertragen. Unbekannte Größen wie z.B. der elektrische Strom sind nicht notwendig um Gleichung (8) zu lösen.

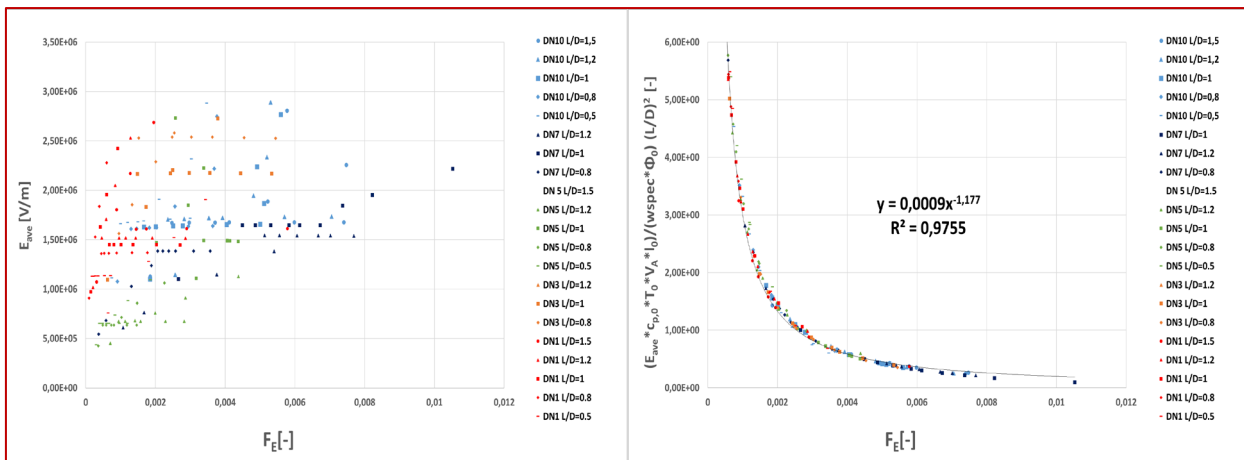


Abbildung 41: Links: Mittlere Feldstärke E_{ave} als Funktion des aus Gleichung (3) ermittelten Forfaktors F_E . Rechts: mittlere, dimensionslose elektrische Feldstärke. Die elektrische Feldstärke wurde unter Zuhilfenahme des nach Gleichung (8) berechneten spezifischen Energieeintrags, der angelegten Spannung, dem aktiven Volumen, der spezifischen Wärmekapazität, der Einlasstemperatur, und die Abmessung des Isolators entdimensioniert.

Abbildung 41 (links) zeigt die mittlere elektrische Feldstärke E_{ave} als Funktion des aus Gleichung (3) ermittelten Forfaktors F_E . Dabei zeigt sich, dass die Daten stark streuen. Es ist zu erkennen, dass es innerhalb des Datensatzes zwei Gruppen von Datenpunkten gibt. Eine Gruppe zeigt eine stärkere Abhängigkeit vom Faktor F_E , während die andere waagrecht in dem Plot liegt. Erstere wurde durch Veränderung der angelegten Spannung, letztere durch Änderung der Strömungsgeschwindigkeit erzeugt. Daher ist es naheliegend, dass sich die mittlere elektrische Feldstärke stärker mit der angelegten Spannung als mit der Reynoldszahl ändert. Berücksichtigt man diese Beobachtung in Form der angelegten Spannung und der Isolatorabmaße sowie dem zuvor nach Gleichung (9) berechneten spezifischen Energieeintrag sortieren sich die Datenpunkte auf einer Linie (vgl. Abbildung 41, rechts). Diese Datenpunkte können wiederum mit einem einfachen Potenzgesetz gefittet werden. Umgestellt nach der mittleren Feldstärke ergibt sich folgende Gleichung:

$$E_{Ave} = \frac{0,0009 F_E^{-1,177} w_{spec} U_0}{c_{p,0} T_0 V_A l_0} \left(\frac{D}{L}\right)^2; R^2 = 0,9755 \quad (10)$$

Analog zu dem beschriebenen Vorgehen wurde die Abhängigkeit der Standardabweichung des elektrischen Feldes E_{stab} im Isolator (vgl. Abbildung 42, links) als Maß für die Inhomogenität des elektrischen Feldes untersucht. Dabei zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der mittleren elektrischen Feldstärke. Die Standardabweichung kann ebenfalls mit einem Potenzgesetz in Abhängigkeit des Faktors F_E beschrieben werden (vgl. Abbildung 42, rechts).

Umgestellt nach der Standardabweichung des elektrischen Feldes E_{stab} ergibt sich folgende Gleichung:

$$E_{Stab} = \frac{0,0049 F_E^{-1,016} w_{spec} U_0}{c_{p,0} T_0 l_0} \sqrt{\left(\frac{l_0}{D}\right)}; R^2 = 0,987 \quad (11)$$

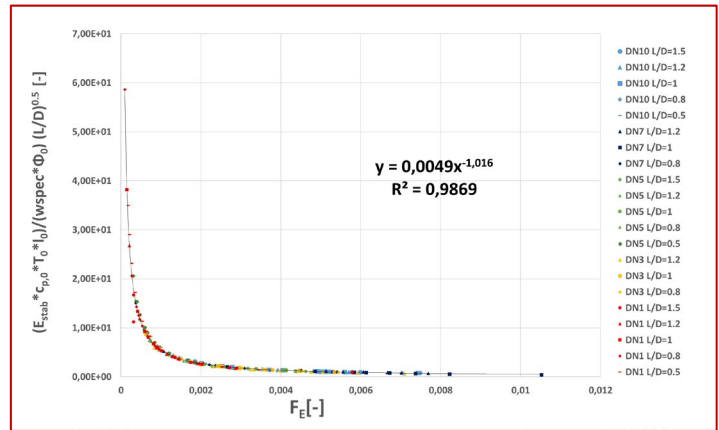
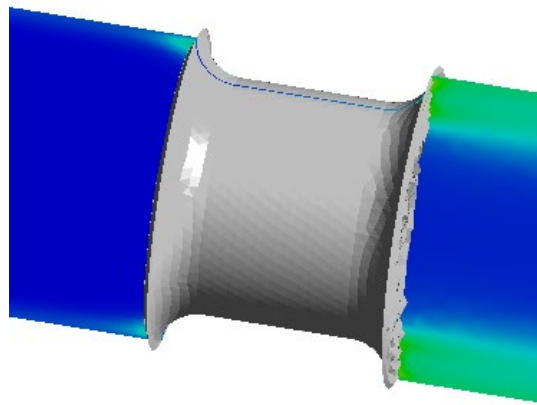


Abbildung 42, links: Volumen des Isolators, in welchem die Standardabweichung des elektrischen Feldes untersucht wurde. Rechts: Dimensionslose Standardabweichung des elektrischen Feldes als Funktion des aus Gleichung (3) Faktors F_E

Das in diesem Projekt entwickelte Vorgehen zeigt, dass sich die für das PEF-Verfahren wichtigsten Prozessparameter (spezifischer Energieeintrag, mittlere elektrische Feldstärke, Inhomogenität des elektrischen Feldes) mit einfachen Korrelationsgleichungen beschreiben lassen. Dies ermöglicht die Übertragung von Ergebnissen auf Behandlungskammern mit einem größeren Durchsatz. Mit Hilfe von wenigen Experimenten können dann in einer Batch-Behandlung mit definierten elektrischen Feldstärken kritische Feldstärken und Energieeinträge bestimmt werden, welche eine erfolgreiche Behandlung sicherstellen. Dieses Vorgehen ist deutlich effizienter, als das zunächst im Projektantrag beschriebene Vorgehen, bei welchem zunächst eine Kinetik für den Zellaufschluss bestimmt werden sollte, mit welcher dann eine Optimierung des Prozesses durchgeführt werden sollte. Wie in den zuvor beschriebenen Abschnitten ausgeführt, ist das Ergebnis der PEF-Behandlung sehr stark von den Kultivierungsbedingungen abhängig. Eine aufgenommene Kinetik hätte somit nur eine sehr begrenzte Aussagekraft, bei einem hohen Aufwand diese aufzunehmen. Mit dem hier beschriebenen Vorgehen können über die mittlere Feldstärke und die Inhomogenität des elektrischen Feldes Ergebnisse besser und effizienter prognostiziert werden.

Arbeitspaket 6: Untersuchung und Nutzung der Extrakte

Die in AP5 mit Ultraschall, PEF, Hochdruckhomogenisation und Sprühtrocknung mit anschließender wässriger Extraktion hergestellten Extrakte (vgl. AP5, Abschnitt „Kontinuierliche PEF-Behandlung und vergleichende Untersuchungen mit anderen Verfahren“) wurden im Rahmen dieses Arbeitspakets auf ihre qualitativen Eigenschaften sowie deren Eignung als funktionelle Lebensmittel untersucht.

Dazu wurden neben dem Phycocyaninertrag und der Reinheit auch der Gehalt an Polyphenolen und die antioxidative Kapazität analysiert. Um Einflüsse der Aufschlussverfahren auf die Proteinstruktur zu untersuchen, wurden außerdem die Sekundärstrukturen der Proteine mittels FTIR-Spektroskopie untersucht. Die Zusammensetzung der Extrakte wurde durch SDS-PAGE analysiert.

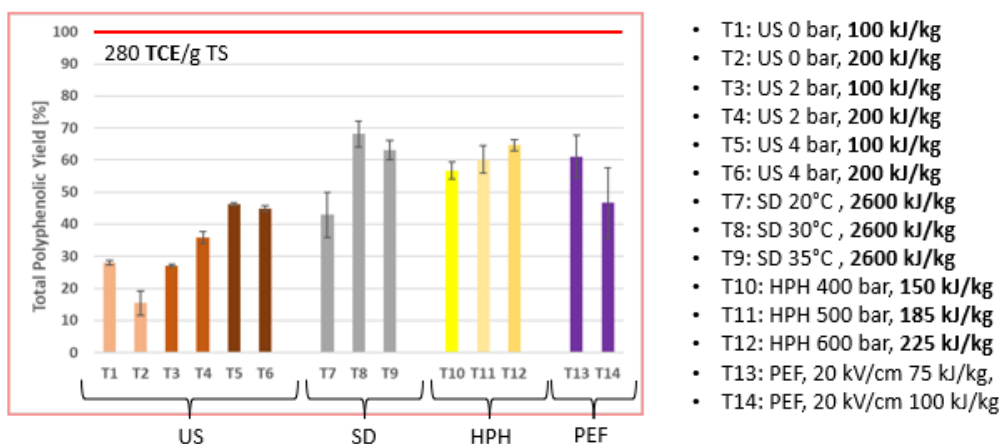


Abbildung 43: Gesamtpolyphenolgehalt für alle untersuchten Verfahren, bezogen auf die Referenzproben. Die Fehlerbalken stellen die Abweichung der Mittelwerte aus den beiden biologischen Wiederholungen da. Der Gesamtpolyphenolgehalt der Referenzproben lag im Mittel bei 280 TCE/g TS (Catechin-Äquivalente).

In Abbildung 43 ist zu erkennen, dass für den gesamten Gehalt an Phenolen keine der getesteten Methoden den Gehalt der Referenzmethode erreichen konnte. Lediglich etwa 60 % wurden mit den Methoden Sprühtrocknung (SD), Hochdruckhomogenisierung (HPH) und gepulste elektrische Felder (PEF) erzielt, was

auf das fehlende Chlorophyll zurückzuführen sein könnte. Insgesamt waren SD, HPH und PEF den Ultraschallbehandlungen (US) überlegen, die nur etwa 45 % des Referenzwertes erreichten.

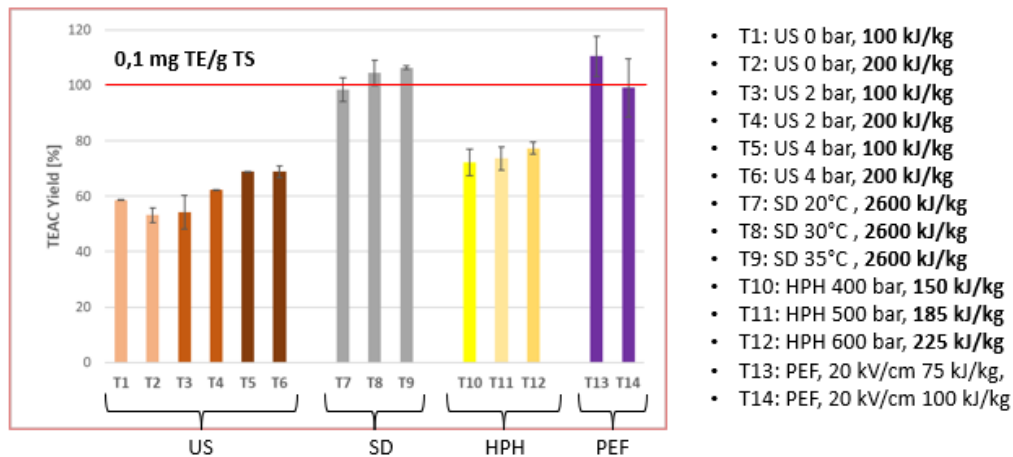


Abbildung 44: Antioxidative Kapazität für alle untersuchten Verfahren, bezogen auf die Referenzproben. Die Fehlerbalken stellen die Abweichung der Mittelwerte aus den beiden biologischen Wiederholungen da. Die Antioxidative Kapazität der Referenzproben lag im Mittel bei 0,1 mg TE/g TS (Trolox-Äquivalente).

In Abbildung 44 ist zu erkennen, dass bei der antioxidativen Kapazität die Ultraschallbehandlungen (US) und die Hochdruckhomogenisierung (HPH) nicht das Niveau der Referenzmethode erreichen konnten. Dagegen erreichten sowohl die aus den sprühgetrockneten Proben hergestellten Extrakte (SD) als auch die der PEF-Behandlung mindestens 100 % des Referenzwertes. Ein möglicher Grund hierfür könnte die geringere thermische Belastung während des Zellaufschlusses sein, die möglicherweise auch andere Komponenten wie Vitamine schont. Dieses Ergebnis war bei der Sprühtrocknung im Vorfeld nicht erwartet worden, da es bei der Sprühtrocknung zu hohen thermischen Belastungen kommt. Mikroskopaufnahmen haben jedoch gezeigt, dass die Zellen nach der Sprühtrocknung weitestgehend intakt waren. Möglicherweise schützt die Zellhülle in Kombination mit der Verdunstungskälte beim Trocknen die temperatursensitiven Zellinhaltsstoffe.

Abbildung 45: Ausschnitt oben links: Beispielhafte Darstellung von drei Bandenmustern. Oben: verwendeter Proteinstandard. Mitte: Ultraschall 0 bar, 100 kJ/kg. Unten: Referenz (Ultraschall, batch). Die Intensität der einzelnen Banden wurde mit Hilfe der Software des Biorad Gel-Doc (Bio Rad, USA) ermittelt. Großer Plot: Darstellung der Flächen der einzelnen Peaks in Abhängigkeit des Molgewichts (Intensitätspeaks), anteilig an der Gesamtfläche. zeigt die Verteilung der Molekulargewichte der einzelnen Banden der SDS-PAGE. Die Gradienten-Gele (Bio-Rad: TGX Stain-Free #567-8094) wurden mit Hilfe des Bildgebungssystems Gel Doc (Bio-Rad, USA) belichtet und fotografiert. Die Intensität der einzelnen Banden wurde mit der Software des Gel Docs ermittelt. Die Fläche der Intensitätspeaks ist in der Abbildung anteilig an der Gesamtfläche dargestellt. Zur vereinfachten Darstellung wurden die Peaks aller Versuche einer Behandlung gemittelt. Dieses Vorgehen erklärt die teilweise großen Standardabweichungen. Das Molekulargewicht der einzelnen Banden wurde über einen Standard ermittelt (Bio-Rad #161-0363). Die Verteilung der Peaks ist über die Proben sehr homogen. Alle Proben weisen starke Banden im Bereich von 20–15 bzw. 15–10 kDa auf. Diese Banden können den alpha- und beta-Untereinheiten des Phycocyanins zugeordnet werden¹³.

Eine weitere Auffälligkeit ist, dass die Referenzprobe eine starke Bande im Bereich von 37–50 kDa aufweist. Diese war bei den anderen Extrakten signifikant schwächer bzw. im Falle der Ultraschallproben gar nicht ausgeprägt. Bei den Ultraschallextrakten ist außerdem auffällig, dass alle Banden, die bei den anderen Extrakten im Bereich von 25–37 kDa detektiert wurden, nicht bzw. kaum nachweisbar waren. Somit könnten Moleküle dieser Molekulargewichte eine Erklärung dafür sein, dass der Gesamtpolyphenolgehalt und die antioxidative Kapazität bei den Ultraschallproben niedriger sind als bei den anderen Aufschlussverfahren. Eine mögliche Erklärung dafür, dass bei der Ultraschallbehandlung diese Moleküle nicht in den Extrakt übergegangen sind, könnte die Zugabe von CaCl₂ sein. Dass dieser Effekt bei den Hochdruckhomogenisator-Extrakten nicht so stark ausgeprägt ist, könnte mit den starken Scherkräften zusammenhängen, die bei der Hochdruckhomogenisation auftreten. Dies könnte zu einer verstärkten Bildung von Mikroemulsionen führen, wodurch weitere Moleküle in die Extrakte übergehen. Bei den Referenzproben war auffällig, dass die detektierten Banden insgesamt breiter waren als bei den vier Zellaufschlussverfahren. Bei diesen Proben traten auch vermehrt Banden auf, die sich nicht klar voneinander trennen ließen. Demnach waren in diesen Extrakten mehr Moleküle mit ähnlicher Molekülgröße enthalten. Außerdem waren einzelne Banden bzw. die

¹³ Débora Pez Jaeschke, Giovana Domeneghini Mercali, Ligia Damasceno Ferreira Marczak, Georg Müller, Wolfgang Frey, Christian Gusbeth, Extraction of valuable compounds from *Arthrospira platensis* using pulsed electric field treatment, Bioresource Technology, Volume 283, 2019, Pages 207-212, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.035>.

Zwischenräume stark verwischt (vgl. Abbildung 45). Mögliche Gründe dafür können RNA-Fragmente, Lipide und hohe Proteinkonzentrationen sein, da die Referenzbehandlung zu einer vollständigen Zerstörung der Zelle führt und somit keine Selektivität bei der Freisetzung vorliegt. Die Freisetzung von Molekülen der genannten Stoffklassen wird vermutlich durch das CaCl_2 bei der kontinuierlichen Ultraschallbehandlung und der Hochdruckhomogenisation verhindert.

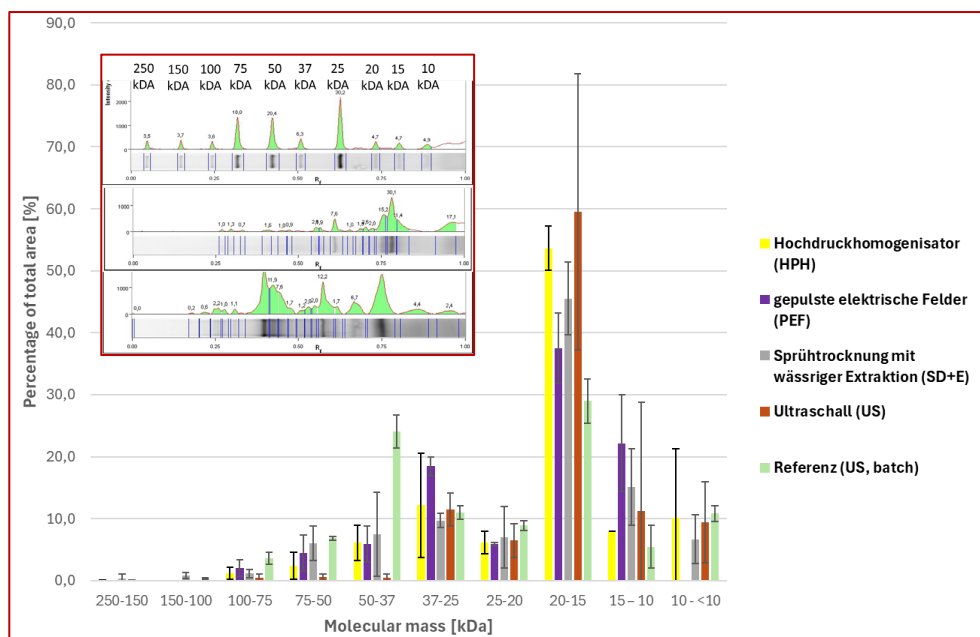


Abbildung 45: Ausschnitt oben links: Beispielhafte Darstellung von drei Bandenmustern. Oben: verwendeter Proteinstandard. Mitte: Ultraschall 0 bar, 100 kJ/kg. Unten: Referenz (Ultraschall, batch). Die Intensität der einzelnen Banden wurde mit Hilfe der Software des Biorad Gel-Doc (Bio Rad, USA) ermittelt. Großer Plot: Darstellung der Flächen der einzelnen Peaks in Abhängigkeit des Molekulargewichts (Intensitätspeaks), anteilig an der Gesamtfläche.

Abbildung 46 zeigt die Zusammensetzung der Sekundärelemente im Amidband I. Die Anzahl und die Position der assoziierten Peaks im Amidband I wurden anhand der zweiten Ableitung bestimmt. Die Peaks wurden dann mittels gaußscher Kurvenanpassung an das Originalspektrum im Bereich des Amidband I gefittet. Die Peaks wurden anhand von Literaturdaten den sekundären Strukturelementen zugeordnet¹⁴. Die Abbildung zeigt, dass sich die Struktur der random coils nur in den Extrakten der Hochdruckhomogenisation und der Ultraschallbehandlung fanden. Diese Strukturen entstehen, wenn sich Proteine durch sich ändernde äußere Einflüsse umfalten. Dies wird auch dadurch verdeutlicht, dass in den beiden Proben keine alpha-helices mehr detektiert werden konnten. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass sich dieser Effekt nicht bei allen Ultraschallproben in den beiden biologischen Wiederholungen reproduzieren ließ. Der Effekt sollte bei den Ultraschallproben demnach nur als Trend interpretiert werden. Bei den Extrakten, die mit dem Hochdruckhomogenisator hergestellt wurden, war die Verschiebung der Peaks von alpha-helices zu random coil für alle Behandlungen und Wiederholungen zu beobachten. Daraus lässt sich schließen, dass die Hochdruckhomogenisation einen Effekt auf die Sekundärstruktur der Proteine im Extrakt hat. Dieser Effekt ist vermutlich thermischer Natur. Wie zuvor bereits vermutet, könnte die hohe antioxidative Kapazität der PEF- und Sprühtrocknungsproben mit der geringen thermischen Belastung auf das Zellinnere zusammenhängen. Die Ergebnisse der FTIR-Messung bestätigen dies, da bei diesen Proben keine Umfaltung beobachtet werden konnte. Die Homogenisatorproben (und teilweise Ultraschall) haben hingegen eine niedrigere antioxidative Kapazität, und die FTIR-Messungen belegen eine Umfaltung der Sekundärstrukturen. Inwieweit sich diese Umfaltungen vor- oder nachteilhaft auf funktionelle Eigenschaften des Phycocyanins auswirken (Lagerstabilität, pH-Stabilität, Temperaturstabilität) auswirken, muss in zukünftigen Forschungsvorhaben geklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich, anhand der hier gezeigten Ergebnisse, sagen, dass PEF und Sprühtrocknung, zur Herstellung von Phycocyaninextrakten mit Lebensmitteleignung, der Ultraschallbehandlung und dem Hochdruckhomogenisator überlegen sind. Zur Herstellung von Phycocyaninextrakten war mit dem Hochdruckhomogenisator der niedrigste spezifische Gesamtenergieeintrag notwendig. Allerdings hatten diese Extrakte schlechtere qualitative Eigenschaften (insbesondere die antioxidative Kapazität), und es konnte ein Einfluss auf die Proteinstruktur nachgewiesen werden. Die PEF-Extrakte hatten die höchste antioxidative

¹⁴ Yang, Huayan; Yang, Shouning; Kong, Jilie; Dong, Aichun; Yu, Shaoning (2015): Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. In: Nature protocols 10 (3), S. 382–396. DOI: 10.1038/nprot.2015.024.

Kapazität, wodurch sich auch ein hoher gesundheitlicher Mehrwert dieser Extrakte vermuten lässt. Dies kann zu einer verbesserten Wertschöpfung für Phycocyanin aus *Arthrospira platensis* beitragen.

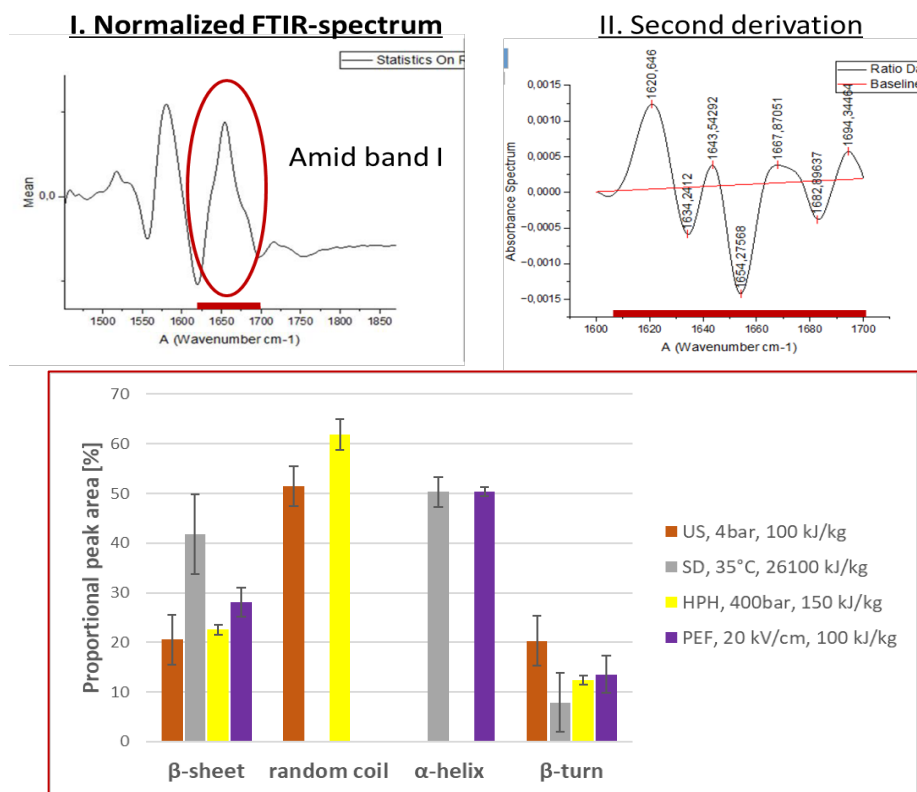


Abbildung 46: Ergebnisse der FTIR-Analyse der Phycocyaninextrakte. Oben links: normiertes Spektrum. Der rote Kreis markiert den Bereich des Amidbandes I, welches zur Untersuchung der Sekundärstrukturen der Proteine in den Extrakten verwendet wurde. Oben rechts: Zweite Ableitung im Bereich des Absorptionsspektrums im Bereich des Amidband I. Die Minima der zweiten Ableitung wurden zur Bestimmung der maximalen Anzahl sowie der Position der Peaks im Amidband I verwendet. Die Peaks wurden mit einem Gaußschen Kurvenanpassung an den Peak des Amidband I angepasst. Unten: Fläche der einzelnen Peaks, anteilig an der Gesamtfläche des Amidband I, beispielhaft für jeweils eine Parameterkombination der vier Aufschlussverfahren. Die Peaks wurden mit Hilfe von Literaturdaten den Sekundärelementen zugeordnet.

Weiterführend sollte die Farbstabilität von Phycocyanin (PC)-Extrakten unter verschiedenen Umweltbedingungen und in Kombination mit verschiedenen Puffersystemen analysiert werden, um die Eignung als Lebensmittelfarbstoff zu bewerten. Hierzu wurden Phycocyanin-haltige Alginate-Gele hergestellt, deren Stabilität über mehrere Tage hinweg unter kontrollierten Bedingungen beobachtet wurde. Die Versuche umfassten Temperaturen von 5 °C, 25 °C und 37 °C, sowohl trockene als auch feuchte Umgebungen sowie Licht- und Dunkelheitsbedingungen. Zusätzlich wurden die Effekte von deionisiertem Wasser, Phosphatpuffer (PBS, pH 7) und Calciumchlorid-Lösung (CaCl₂) auf die Farbstabilität untersucht. Mindestens fünf Replikate wurden pro Bedingung erstellt, um statistisch belastbare Ergebnisse zu erhalten.

Die Ergebnisse zeigten, dass Licht den stärksten Einfluss auf die Stabilität von Phycocyanin hatte. Unter Lichteinwirkung wurde innerhalb von vier Tagen eine Reduktion der Farbintensität um über 50 % beobachtet, wohingegen die Farbstoffe im Dunkeln über den gleichen Zeitraum deutlich stabiler blieben. Temperatur und Luftfeuchtigkeit hatten im Vergleich geringeren Einfluss: Im Bereich zwischen 5 °C und 25 °C wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Allerdings schmolzen die Gele bei 37 °C, was einen vollständigen Verlust der Farbstabilität zur Folge hatte. Luftfeuchtigkeit zeigte erst nach einer Woche einen Effekt, als die Gele austrockneten, was zu einer plötzlichen Konzentrationserhöhung von PC führte.

Die Wahl des Puffers hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Stabilität. Phosphatpuffer (pH 7) erwies sich als am effektivsten, da die Farbintensität nach 15 Tagen nur um etwa 20 % abnahm. Im Vergleich dazu zeigten Reinstwasser und CaCl₂-Lösung stärkere Reduktionen der Farbintensität um 30–35 % im gleichen Zeitraum. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung einer stabilisierenden Pufferumgebung für den Erhalt der Farbintensität.

Die Diskussion der Ergebnisse zeigt, dass Licht als primärer Degradationsfaktor identifiziert werden kann, während Temperatur und Luftfeuchtigkeit nur unter bestimmten Umständen eine Rolle spielen. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen zur Photoinstabilität von Phycocyanin, die die Zerbrechlichkeit der chromophoren Gruppen gegenüber Lichteinwirkung betonen. Die Anwendung von Phosphatpuffern bietet dabei eine praktikable Strategie, die Stabilität des Farbstoffs zu verlängern, wie auch in ähnlichen Studien dokumentiert wurde.

Abbildung 47 zeigt links Agarosegel-Formen mit Phycocyanin, die zur Stabilitätsuntersuchung verwendet wurden, und rechts den Einfluss der wässrigen Lösung auf die Farbstabilität von Phycocyanin. Diese Ergebnisse liefern Einblicke für die potenzielle industrielle Nutzung von Phycocyanin als natürlichem Farbstoff, insbesondere unter Berücksichtigung optimaler Lager- und Verarbeitungsbedingungen.

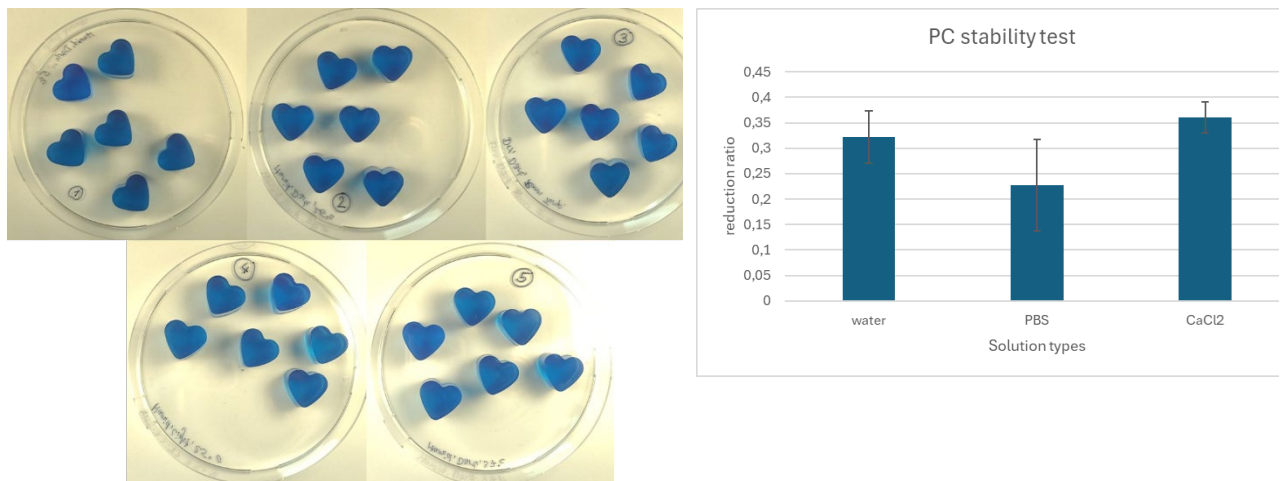


Abbildung 47 links: Agarosegel Formen mit Phycocyanin für Stabilitätsuntersuchungen. Für alle Parameter wurden mindestens 5-fach Replikate erstellt. Rechts: Einfluss von der Zusammensetzung der wässrigen Lösung auf die Stabilität von PC.

Arbeitspaket 7: EPS Untersuchungen (OTH-AW Unterauftrag Anhang 2)

Die Untersuchungen zur Applikation von EPS in Teichen wurde im Unterauftrag an ABK (Angewandte Biologie Kallert) vergeben. Es sind Zwei Versuchsreihen in den Jahren 2021 und 2022 durchgeführt worden. In Vorbereitung an diese Versuche wurden an der Forschungsstelle OTH-AW die benötigten Mengen an EPS hergestellt.

Der Erlebnisbericht von ABK ist im Anhang separat aufgeführt und sind im Folgenden zusammengefasst.

Zusammenfassung des Ergebnisreports von ABK

Ziel des Forschungsprojekts war es, die Eignung von EPS aus Mikroalgen als alternatives Mittel zur Krankheitsprophylaxe in der Aquakultur zu untersuchen. Durch die Zugabe von EPS sollten Infektionen wie das Koi-Herpesvirus (KHV-1) sowie parasitäre Belastungen bei Karpfen reduziert und somit Gesundheit und Wohlbefinden der Fische gefördert werden.

Im ersten Versuchsjahr 2021 wurde ein Praxistest in zwei kleineren Teichen (160 m²) durchgeführt, von denen nur einer regelmäßig mit EPS behandelt wurde. Die Wasserbehandlung hatte keine negativen Auswirkungen auf die Wasserqualität oder die Gesundheit der Fische. Zwar wurde eine kurzfristige, leichte Algenblüte beobachtet, diese ging jedoch schnell zurück und war vermutlich saisonbedingt. Die Karpfen in beiden Teichen zeigten keine Unterschiede in Größe oder äußerem Erscheinungsbild und blieben durchgehend gesund. Bei der Untersuchung auf parasitäre Erreger zeigte sich im behandelten Teich eine deutliche Reduktion des Befalls, insbesondere bei *Ichthyophthirius multifiliis* und *Trichodina*, zwei für Karpfen typische Ciliatenarten. Eine signifikante Reduktion der KHV-1-Infektionen ließ sich aufgrund der niedrigen Infektionsraten in den Teichen jedoch nicht nachweisen.

Im zweiten Versuchsjahr 2022 wurden die Tests in zwei größeren Teichen (ca. 360 m²) wiederholt. Hier kam eine weniger stark aufgereinigte EPS-Lösung zum Einsatz, die eine höhere Menge an Nährstoffen enthielt. Diese Behandlung führte zu verstärktem Wachstum von Makrophyten wie *Ceratophyllum demersum* sowie zu einer leichten Algenblüte. Der beobachtete Effekt könnte auf die in der Lösung enthaltenen Nährstoffe zurückzuführen sein, die das Pflanzenwachstum förderten. Auch im zweiten Versuch zeigten die Karpfen im behandelten Teich eine geringere parasitäre Belastung, insbesondere durch Karpfenläuse und weitere Ciliaten wie *Trichodina* und *Chilodonella*. Zudem war die Anzahl sichtbarer Hautentzündungen geringer als im unbehandelten Teich, was auf eine möglicherweise gesundheitsfördernde Wirkung von EPS hinweist. Ein antiviraler Effekt auf das Koi-Herpesvirus konnte jedoch auch im zweiten Versuch nicht signifikant nachgewiesen werden, was auf die generell niedrigen Infektionsraten in den Teichen zurückzuführen sein dürfte.

Die beiden Praxistests bestätigen, dass EPS-Substanzen ohne negative Begleiterscheinungen in naturnahen Karpfenteichen angewendet werden können. Die vorläufigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Behandlung mit EPS eine Reduktion bestimmter Parasiten wie *Trichodina* und *Chilodonella* bewirken könnte und möglicherweise die Gesundheit der Fische fördert. Um die antivirale Wirkung und den tatsächlichen

Nutzen für die Fischgesundheit jedoch klarer zu evaluieren, sind weitere Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen in Aquakultursystemen erforderlich.

Arbeitspaket 8: Freilandbetrieb Technikumsanlage

Aufbauend auf den Ergebnissen von AP1 wurde sich für die Hauptausführung für einen vertikalen Röhrenreaktor entschieden, bei welchen die Durchströmung der Rohre durch das Airlift Prinzip ermöglicht wurde (vgl. Abbildung 1 unten rechts). Dieser Reaktor wurde an der Forschungsstelle OTH-AW konstruiert und aufgebaut und anschließend verfahrenstechnisch als auch biologisch charakterisiert.

Verfahrenstechnische Charakterisierung

In dem Reaktorkonzept ist die Umströmungsgeschwindigkeit direkt abhängig von der Begasungsrate und den damit zusammenhängenden Gasvolumenanteilen im System. Dieser Zusammenhang ist bis zu einer Begasungsrate von 0,3 vvm annähernd linear. Die erreichten Strömungsgeschwindigkeiten sind allesamt in den laminaren Bereichen. Einzig die Umlenkungen der Rohrleitung führen zu einer Umverteilung der laminaren Schichten.

Weitere Versuche zum Mischzeitverhalten haben ergeben, dass sich für hohe Begasungsraten ein konstanter Wert um 150 s einstellt. Neben der Mischzeit ist auch der Stoffübergang stark von der Begasungsrate abhängig. Im Bereich der vorgesehenen Begasungsraten von bis zu 0,4 vvm ist ein linearer Zusammenhang zwischen kLa und den Begasungsraten gemessen worden (vgl. Abbildung 48). Zwar sind die Stoffübergänge um einen Faktor 10 kleiner als in den 1 L Photobioreaktoren, jedoch mit 30 h^{-1} im Bereich von anderen Airlift-Reaktoren¹⁵. In den aufgeführten Versuchen ist der Stoffübergang von Sauerstoff gemessen worden, dieser lässt sich bei bekannten Diffusionskoeffizienten leicht auf den Stoffübergang anderer Gase umrechnen. Ein O_2 -Stoffübergangskoeffizient von 30 h^{-1} entspricht einen CO_2 -Stoffübergangskoeffizienten von $23,6 \text{ h}^{-1}$, was ausreichend zur Aufrechterhaltung des zu erwartenden Wachstums ist.

Im vorliegenden Reaktorkonzept ist die Umströmungsgeschwindigkeit direkt von der Begasungsrate und dem damit verbundenen Gasvolumenanteil (Gashold-up) im System abhängig. Bis zu einer Begasungsrate von 0,3 vvm zeigt sich eine nahezu lineare Korrelation. Die erreichten Strömungsgeschwindigkeiten liegen dabei vollständig im laminar dominierten Bereich. Lediglich in den Umlenkbereichen der Rohrleitungen kommt es zu einer Umverteilung der laminaren Strömungsschichten.

Untersuchungen zum Mischzeitverhalten ergaben, dass bei hohen Begasungsraten eine konstante Mischzeit von etwa 150 Sekunden erreicht wird. Der Stoffübergang ist ebenfalls stark von der Begasungsrate abhängig. Im Bereich der geplanten Begasungsraten bis 0,4 vvm wurde ein linearer Zusammenhang zwischen dem volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten kLa und der Begasungsrate festgestellt (vgl. Abbildung 15). Zwar liegt der Stoffübergang mit etwa 30 h^{-1} um einen Faktor 10 unter den Werten von 1-Liter-Photobioreaktoren, jedoch entspricht er den typischen Bereichen anderer Airlift-Reaktoren.

Die durchgeführten Versuche konzentrierten sich auf den Sauerstoff-Stoffübergang, dessen Koeffizient aufgrund bekannter Diffusionskoeffizienten leicht auf andere Gase wie CO_2 übertragen werden kann¹⁶. Ein kLa -Wert von 30 h^{-1} für O_2 entspricht einem kLa -Wert von $23,6 \text{ h}^{-1}$ für CO_2 . Dieser Wert ist ausreichend, um das für das erwartete Wachstum erforderliche CO_2 bereitzustellen.

¹⁵ A. Lübbert in *Bioreaction Engineering* (Eds.: K. Schügerl, K.-H. Bellgardt), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2000**, pp. 247–273.

¹⁶ K. Nanjo, H. Shiotsu, Y. Maruyama, T. Sugiyama, K. Okamoto, *Journal of Nuclear Science and Technology*, DOI 10.1080/00223131.2022.2146015.

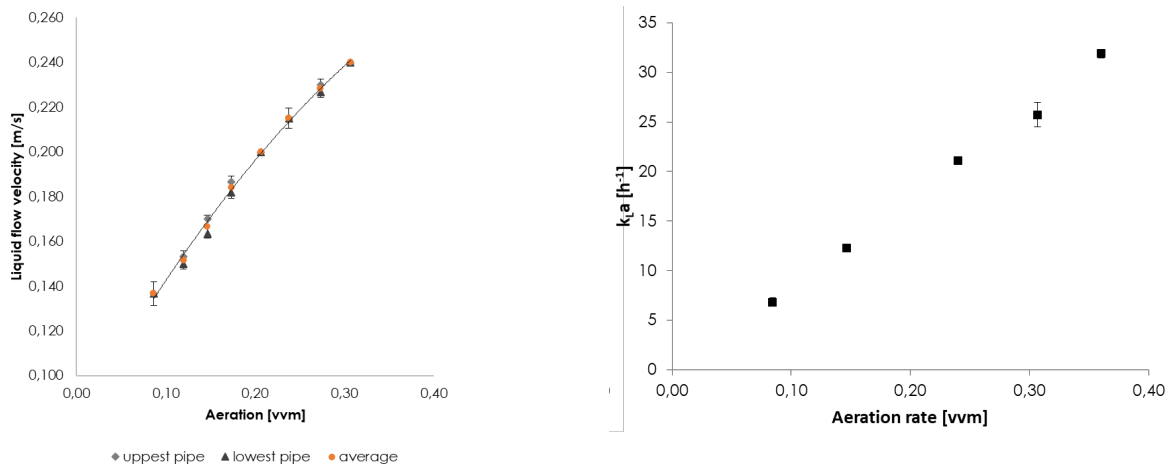


Abbildung 48 Untersuchungen zur Auswirkung der Begasungsrate auf die Strömungsgeschwindigkeiten im Downcomer (links) und dem Stoffübergang (rechts) im Airlift-Reaktor (75L)

Biologische Charakterisierung

Erste Wachstumsversuche im Airlift-Reaktorsystem (vgl. Abbildung 1 unten rechts) unter kontinuierlicher Lichtversorgung ($79 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) erreichten maximale Biomassekonzentrationen von 1 g L^{-1} (vgl. Abbildung 49, links). Das typische Fehlen einer ausgeprägten exponentiellen Wachstumsphase, wie es für phototrophe Organismen charakteristisch ist, deutet auf lichtlimitiertes Wachstum infolge zunehmender Selbstverschattung hin. Diese Annahme wurde durch die hohe Übereinstimmung der experimentellen Daten mit einem Wachstumsmodell bestätigt ($\text{RSS} < 0,3$). Die kinetischen Parameter des Modells basieren auf den Ergebnissen aus AP1 und belegen den erfolgreichen Transfer der Prozessbedingungen vom Labor- auf den Technikumsmaßstab.

Zusätzlich wurde das Wachstum in frischem und recyceltem Medium verglichen. Analog zu den Ergebnissen im Labormaßstab zeigten sich keine Unterschiede im Wachstumsverhalten. Die spezifischen Phycocyanin-Konzentrationen lagen ab dem dritten Tag bei 120 mg g^{-1} (vgl. Abbildung 49, mitte) und übertrafen die im Labormaßstab gemessenen Werte von 100 mg g^{-1} leicht. Diese Steigerung könnte durch die verringerte Lichtverfügbarkeit im Reaktor aufgrund des hohen Volumenanteils des Risers (60 %) erklärt werden.

Die EPS-Produktion zeigte bei frischem Medium Konzentrationen von $0,04 \text{ g L}^{-1}$, was unter den im Labormaßstab erzielten Werten liegt. Mit recyceltem Medium wurden hingegen Konzentrationen von über $0,1 \text{ g L}^{-1}$ erreicht, die den Labordaten entsprechen (vgl. Abbildung 49, rechts). Die geringeren Werte bei frischem Medium könnten durch eine verfrühte Ernte verursacht worden sein, da die EPS-Konzentration stark vom Erntezeitpunkt abhängt. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse die Übertragbarkeit der im Labormaßstab entwickelten Prozessfahrweisen auf den Technikumsmaßstab.

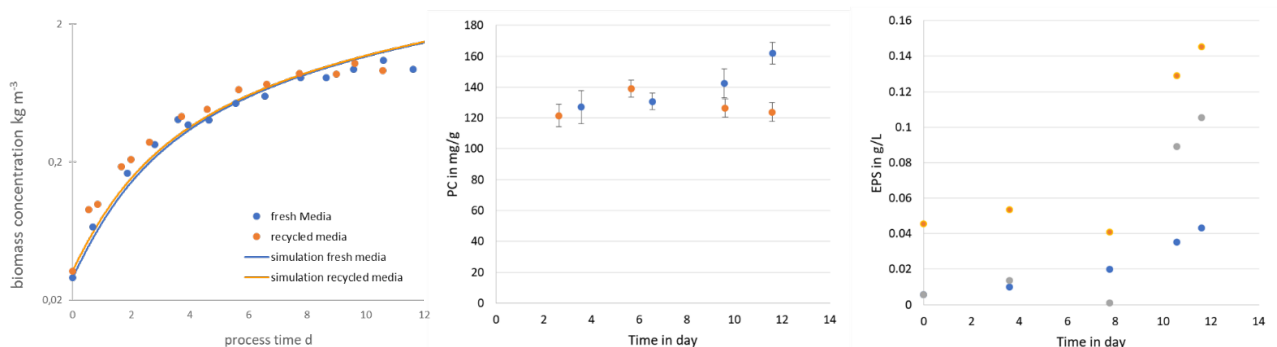


Abbildung 49 Kulturverlauf (Links) und Entwicklung der der Hochwertprodukte (Phycocyanin mitte, EPS rechts) in einem Airlift-Reaktor (75L) Kultur ($I_0=59.73 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $T=35^\circ\text{C}$) mit frischem Medium (blau) und regeneriertem Medium (orange) und recyceltem Medium mit Nährstoffzugabe.

Langzeitkultivierungen

An der Forschungsstelle der OTH-AW wurden mehrere Langzeitkultivierungen durchgeführt, wobei die längste Kultivierung über einen Zeitraum von 190 Tagen lief (Abbildung 50). Diese Versuche verfolgten zwei Hauptziele: Zum einen wurde untersucht, wie lange eine Kultivierung konsekutiv betrieben werden kann, ohne dass es durch Biomasseablagerungen oder Kontaminationen zu einem Abbruch kommt. Zum anderen sollten die in AP1 entwickelten Erkenntnisse zu Erntezyklen unter Praxisbedingungen überprüft werden.

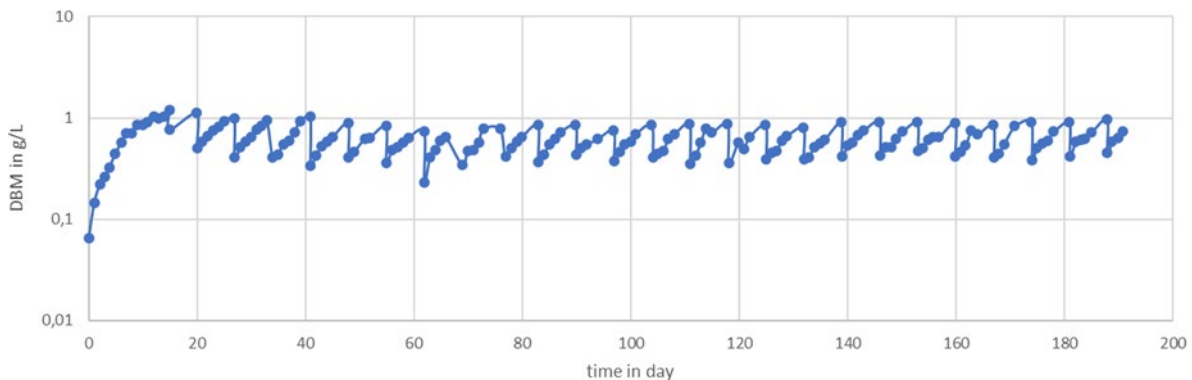


Abbildung 50 Langzeitkultivierung von *A. platensis* unter Tageslichtbedingungen zur Überprüfung der Prozessstabilität

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kultivierungen über einen Zeitraum von 190 Tagen sehr stabil sind, ohne dass neu inokuliert werden musste. Es traten weder Probleme durch Biofouling noch durch Kontaminationen auf. Die Stabilität des Prozesses wird durch die hohe Reproduzierbarkeit der Wachstumsverläufe und Produktivitäten der Hochwertprodukte sowie durch die gute Übereinstimmung der experimentellen Daten mit den entwickelten Modellen bestätigt.

In einer 90-tägigen Kultivierung unter Tageslichtbedingungen (Tag-Nacht-Zyklus 16:8) wurden verschiedene Ernteintervalle (1, 2, 3 und 4 Tage) sowie zwei Ziel-Biomassekonzentrationen (1 g L^{-1} und $1,3 \text{ g L}^{-1}$) getestet (vgl. Abbildung 51). Die Phycocyanin-Konzentration, bezogen auf das Reaktorvolumen, zeigte über die gesamte Prozessdauer eine klare Korrelation mit der Biomassekonzentration. Die höchste PC-Produktivität von $1,28 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ wurde bei einem Erntezyklus von 3 Tagen und einer Ziel-Biomassekonzentration von $1,3 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Für EPS wurde eine Korrelation zur Biomassekonzentration erst ab höheren Biomassekonzentrationen beobachtet, was den Ergebnissen aus AP1 entspricht. Die höchste EPS-Raumzeitausbeute von $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ konnte bei Ernteintervallen von 2–3 Tagen erzielt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung der gezielten Anpassung von Erntezyklen und Biomassekonzentrationen für die Optimierung der Produktivität.

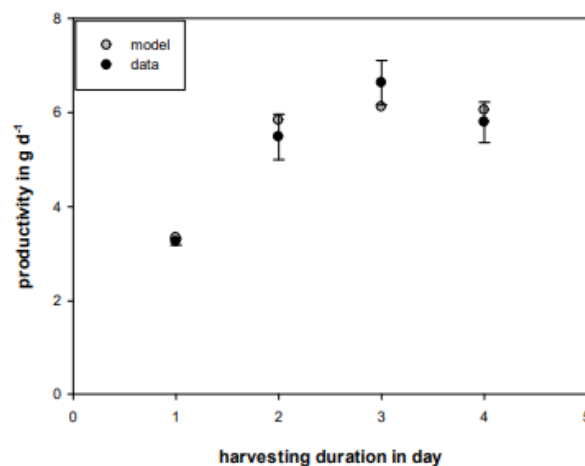


Abbildung 51 Biomasse Produktivität bei einer Ernte-Biomassekonzentration von $1,3 \text{ g L}^{-1}$ und verschiedenen Ernte Intervallen. Die schwarzen Symbole (●) zeigen den Mittelwert von 3 Ernten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung. Die grauen Symbole (●) repräsentieren die theoretische Produktivität nach dem Modell von Jung et. al.

Für den Freilandbetrieb kamen die vertikalen Röhrenreaktoren an der Forschungsstelle der TU Berlin zum Einsatz. Der Hintergrund für diese Entscheidung lag in der direkten Verfügbarkeit zweier Reaktoren, welche somit eine direkte Verifizierung der Ergebnisse erlaubte.

Optimierte Erntestrategie auf Basis des in AP2 entwickelten Vorhersagemodells

Die Experimente im Freilandbetrieb wurden in zwei 120 L Photobioreaktoren (vgl. Abbildung 1 unten links) durchgeführt, um die Optimierung der Erntestrategie zu testen. Die Bioreaktoren standen in einem Gewächshaus und waren den in Abbildung 52 dargestellten Umweltbedingungen ausgesetzt.

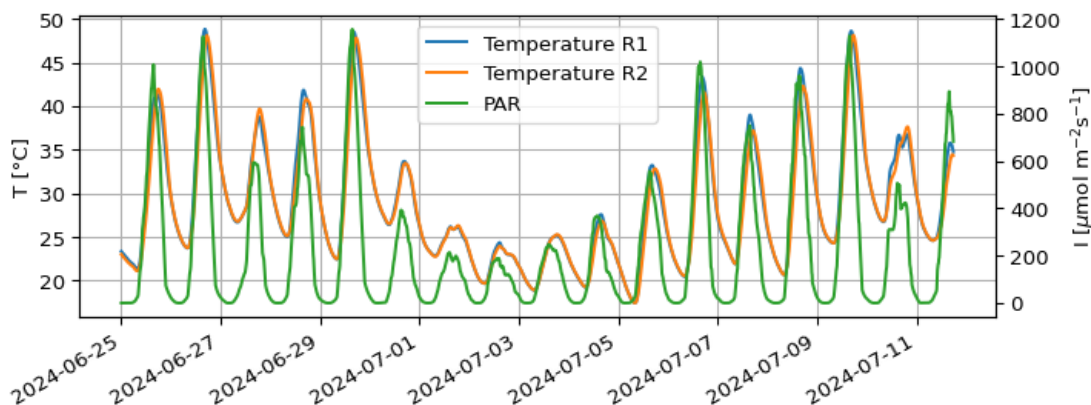


Abbildung 52: Beleuchtung der Reaktoren und Mediumtemperaturen über den Verlauf der Experimente.

Der Reaktor „R1“ wurde verwendet, um ein Prognosemodell wie in AP2 beschrieben zu trainieren. Jeden Tag wurde morgens mithilfe des Prognosemodells die Erntemenge bestimmt, die laut dem Modell für den Folgetag den größtmöglichen Biomassezuwachs zur Folge hatte. Das entsprechende Volumen wurde dann geerntet. Der Reaktor „R2“ wurde immer dann geerntet, wenn die Biomasse bei der morgendlichen Messung $0,8 \text{ g L}^{-1}$ überschritten hat. Es wurden dann jeweils exakt 32 L geerntet. Dies entsprach einer Reduzierung der Biomasse auf ca. $0,6 \text{ g L}^{-1}$. Der Ertrag eines Erntevorgangs entspricht dem Erntevolumen mal der momentanen Biomassekonzentration. Zur Bestimmung der Produktivität P der Reaktoren wurde der kumulierte Ernteertrag E mit dem momentanen Biomassezuwachs bzw. -rückgang $dy = y(t) - y(0)$ im jeweiligen Reaktor summiert:

$$P(t) = E(t) + dy \quad (12)$$

In Abbildung 53 ist zunächst der Verlauf der Biomasse über die gesamte Kultivierungsdauer zu sehen. Anhand der Schwankungen zu Beginn ist zu erkennen, dass zunächst aufgrund des guten Wetters (vgl. Abbildung 52) viel geerntet wurde. In der Mitte der Kultur ist eine Phase zu erkennen, in welcher das Wachstum eingeschränkt war, was auf einen Wetterumschwung zurückzuführen ist. Unten in Abbildung 52 ist die in den Experimenten erzielte Produktivität zu sehen. Die gefittete lineare Gleichung lässt eine erhöhte Produktivität in R1 vermuten. Die Biomasse in R2 ging allerdings am Ende der Kultivierung zurück, was einen Einfluss auf das Gesamtergebnis haben kann. Dies kann auf Hitzestress nach der Kaltphase zur Mitte der Kultur zurückgeführt werden (vgl. Abbildung 52, plötzlicher Anstieg der Temperatur). Hitzestress kann das Photosystem von *Arthrospira platensis* beschädigen, wodurch die Kultur langsamer wachsen kann. Da die Biomassekonzentration zu diesem Zeitpunkt bereits relativ hoch war, wurde das Wachstum durch die Selbstverschattung weiter reduziert. Im Gegensatz dazu wurde auf Basis des Vorhersagemodells R2 geerntet. Zu Beginn der Heißphase waren dann weniger Zellen in der Kultur vorhanden, weshalb mehr Licht für das Wachstum zur Verfügung stand. Somit zeigte R2 über die Kultivierungsdauer eine erhöhte Produktivität. Allerdings sind für belastbare Aussagen noch weitere Wiederholungen nötig, bei denen auch unterschiedliche Wetterphasen mit einbezogen werden sollten. So ist es möglich, dass das Vorhersagemodell bei konstanten Wetterbedingungen seinen Vorteil verliert. Gerade bei schwankenden Bedingungen im Outdoorbetrieb kann es aber überlegen sein. In Zukunft sollten automatisierte Strategien zur Vermeidung von Hitzestress (automatisierte Belüftung der Gewächshäuser, passive oder aktive Kühlung etc.) mit dem Vorhersagemodell gekoppelt werden, um die Produktivität der Algenkultivierung weiter zu steigern. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das in diesem Forschungsprojekt entwickelte Vorhersagemodell großes Potenzial hat, die Steuerung von Photobioreaktoren zu vereinfachen und an variable Bedingungen im Outdoorbetrieb anzupassen.

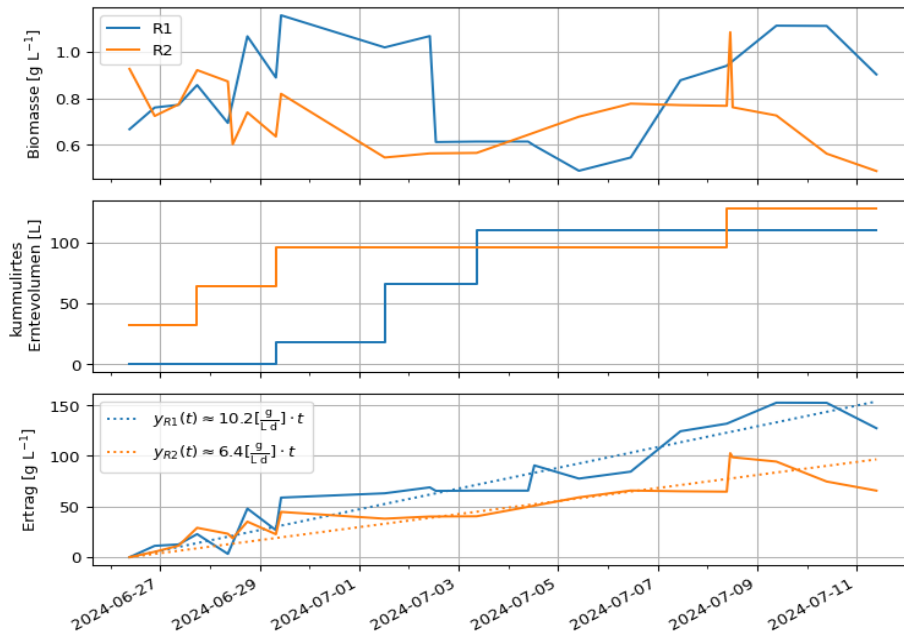


Abbildung 53: oben: Entwicklung der Biomasse in den Reaktoren (online-Messung); mitte: Kumuliertes Erntevolumen; unten: Ertrag zusammengesetzt aus geernteter Biomasse und aktuellem Biomassezuwachs im Reaktor

Einfluss der optimierten Erntestrategie auf den EPS- und Phycocyaningehalt.

Um zu überprüfen, ob die oben beschriebene Erntestrategie einen positiven oder negativen Einfluss auf die Produktivität der Wertstoffprodukte EPS und Phycocyanin hat, wurden während der zuvor beschriebenen Versuche täglich bis zu zweimal Proben genommen, um den EPS-Gehalt und den Phycocyaningehalt analytisch zu bestimmen. Zusätzlich wurde die Biomasse offline über die optische Dichte gemessen. Die Ergebnisse der Analysen sind in Abbildung 54 (Biomasse und EPS) und Abbildung 55 (Biomasse und Phycocyanin) dargestellt. Zunächst ist zu erkennen, dass die Ergebnisse mit der Online-Messung sehr gut übereinstimmen. Die EPS- und Phycocyaningehalte weisen keine erkennbare Abhängigkeit von der Prozessführung auf. Für den Phycocyaningehalt können teilweise Abhängigkeiten vom Erntezeitpunkt ausgemacht werden. So sinkt der Phycocyaningehalt nach einer Ernte. Dies kann mit der besseren Lichtverfügbarkeit bei niedrigeren Zellkonzentrationen erklärt werden. Diese Trends sind aber nur schwach ausgeprägt und teilweise widersprüchlich. Insgesamt kann jedoch festgehalten werden, dass die Erntestrategie keinen negativen Effekt auf den Phycocyanin- und EPS-Gehalt hat. Da die Verläufe mehr oder weniger deckungsgleich sind, kann aufgrund der höheren Biomasseproduktivität in R1 auch von einer leicht erhöhten Produktivität für EPS und Phycocyanin ausgegangen werden. In Zukunft sollte das hier präsentierte Vorhersagemodell um die Wertstoffprodukte in Abhängigkeit der Wettervorhersage erweitert werden. Um dies zu ermöglichen, sind präzise Online- und Offlinemethoden zur Bestimmung notwendig.

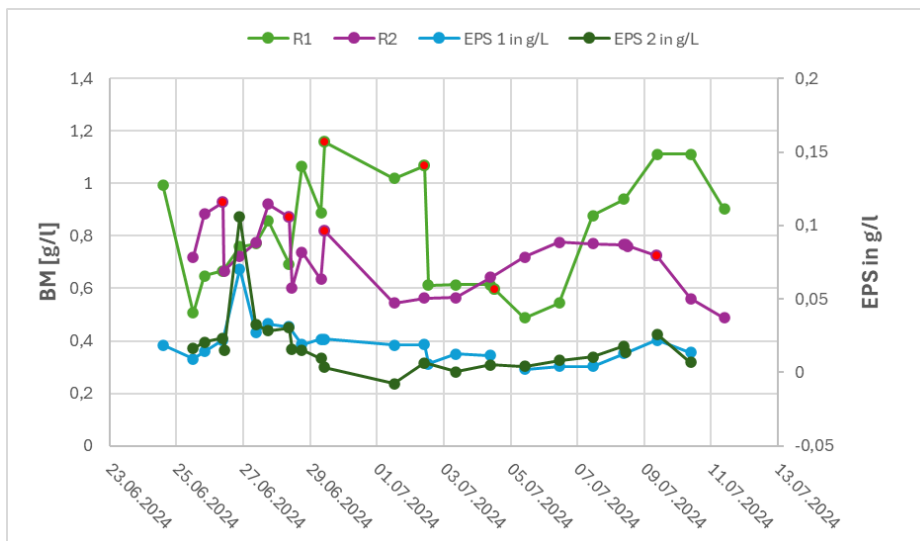


Abbildung 54: Verlauf der Biomasse (offline-Daten) für R1 und R2 über die gesamte Kultivierungsdauer sowie der Expolysaccharid-Gehalt (EPS) im überstand.

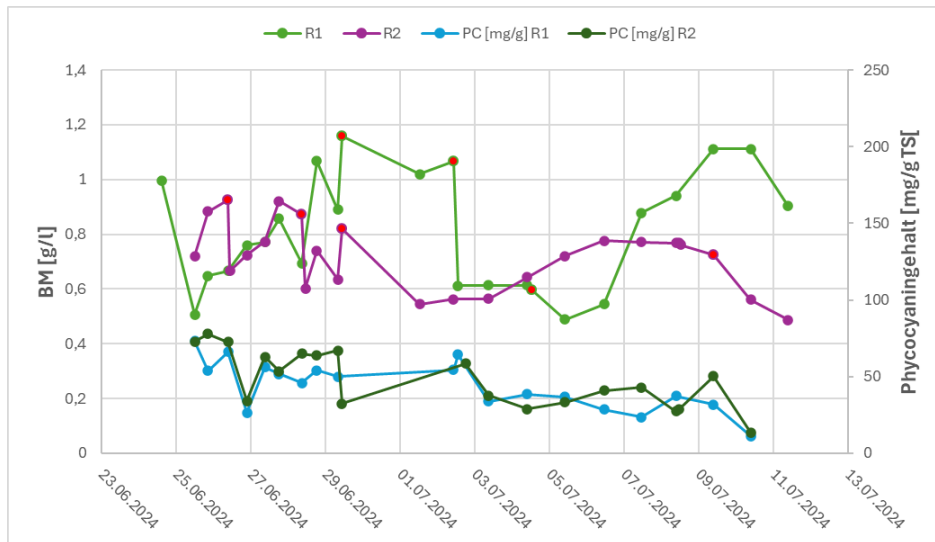


Abbildung 55: Verlauf der Biomasse (offline-Daten) für R1 und R2 über die gesamte Kultivierungsdauer sowie der Phycocyaningehalt im überstand.

Arbeitspaket 9: Bilanzierung und Bewertung der Wertschöpfungskette

Für die Bilanzierung und Bewertung der Wertschöpfungskette gemäß der Normenreihe ISO 14000 wurde die Open-Source-Software OpenLCA (Version 1.11, Mozilla Public License 2.0) verwendet. Die durchgeführte LCA-Modellierung wurde nach den Richtlinien ISO 14044:2006 erstellt.

Um die Aussagekraft zu erhöhen, wurden die Ergebnisse des Projekts zur Prozessentwicklung genutzt, um die Auswirkungen der Erntezyklen auf die Bilanzierung und Bewertung der Wertschöpfungskaskade zu untersuchen.

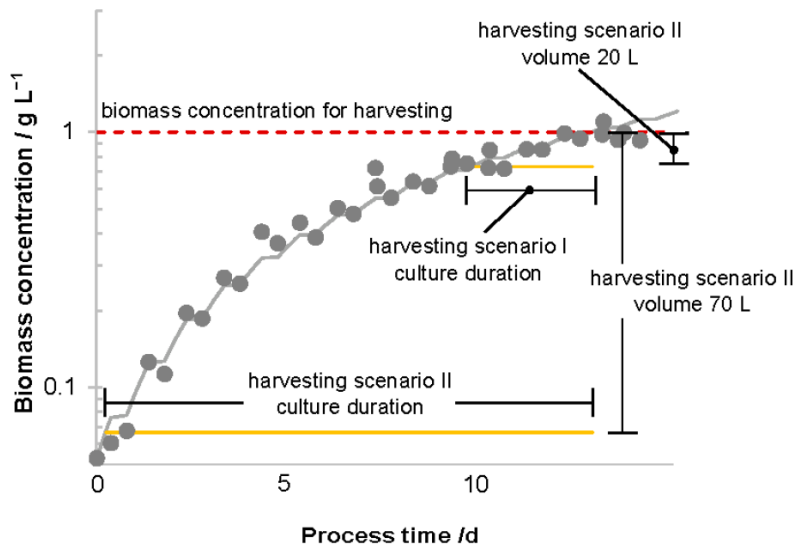


Abbildung 56 Darstellung der Untersuchten Ernte Szenarien. Szenario I als Repeated Batch mit 20 L Erntevolumen und Szenario II als klassischer Batch Betrieb. Die Punkte • repräsentieren experimentelle Daten im 70L Airlift Reaktor, die Linie (—) repräsentiert die Kulturentwicklung nach dem Wachstumsmodell von Jung et al.

Dazu wurden die Prozessführungen von zwei Szenarien verwendet: Repeated Batch (Szenario I) und ein klassischer Batchprozess (Szenario II) (vgl. Abbildung 56). Zusätzlich wurde untersucht, ob Wetterlagen oder der Produktionsstandort sich auswirken könnten, indem die Lichtintensität von Tag- und Nachtzyklen variiert wurde.

Die Tag-Nachtzyklen waren hierbei konstant mit 8 zu 16, jedoch wurde die maximale Lichtintensität variiert: 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Szenario „Low (lo)“) und 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Szenario „High (lo)“). In Tabelle 12 ist die Szenarienmatrix mit den unterschiedlichen Prozesszykluszeiten dargestellt.

Tabelle 12 Szenarien Matrix für das vergleichende Lifecycle Assessment.

Light intensity (I _o)	Scenarios	Scenario I / Scenario II	
		Process time (d)	Harvesting volume (L)
Low (I _o)		4 / 16	20 / 70
High (I _o)		2 / 6	20 / 70

Für die Bewertung wurden die Material- und Energiebilanzen der einzelnen Schritte des in diesem Projekt entwickelten Prozesses verwendet, wobei die Systemgrenzen die Kultivierung und das Downstream-Processing der Hochwertprodukte umschließen. Die Koppelung einer Biogasanlage mit BHKW wurde bei diesem Prozess nur angedeutet, da ein Betrieb einer Biogasanlage exklusiv auf Biomasse-Rückständen des Cyanobakterien-Prozesses in den untersuchten Skalen nur bedingt möglich ist. Somit wird die Koppelung dadurch dargestellt, als die Biogasausbeuten aus der Biomasse aufgeführt werden und angenommen wird, dass der Energiebedarf für die Temperaturregulierung der Kultivierung auf 30–35 °C aus der Abwärme eines BHKW gedeckt wird.

Für die Inventarliste der Material- und Energiebilanzen der einzelnen Unit-Operations des Prozesses wurde angenommen, dass die Prozesse mit den jeweiligen Szenarien (Tabelle 12) über ein Jahr konstant laufen. Die Erstellung der Inventarliste und deren Analyse erfolgte anhand der in diesem Projekt generierten Daten unter Verwendung von der European Reference Life Cycle Database (ELCD)¹⁷ und der EcoInvent Datenbank¹⁸. Die Inventarliste der einzelne Unit-Operations ist in Tabelle 13 dargestellt, wobei die Eingangsströme mit I (input) und die Ausgangsströme mit O (output) bezeichnet sind.

¹⁷ European Commission, "European Platform on LCA | EPLCA", can be found under <https://eplca.jrc.ec.europa.eu/ELCD3/>.

¹⁸ ecoinvent, "ecoinvent database", can be found under <https://ecoinvent.org/database/>.

Tabelle 13 Inventarliste des für die Material und Energiebilanz des Gesamtprozesses.

Process Step	Technology	(I/O)	Material flows [unit a ⁻¹]	Scenarios			
				Low I _o Hv 20L	Low I _o Hv 70L	High I _o Hv 20L	High I _o Hv 70L
Cultivation Batch mode	PBR	I	Media (g L ⁻¹)	22.13	22.13	22.13	22.13
		I	Water (L)	75	75	75	75
		I	Electricity (kWh)	2,310	2,310	726	726
		I	Heat (MJ) ³	--	--	--	--
Cultivation Fed-batch	PBR	I	Rest medium regenerated (L)	1,505	1,488	3,011	3,969
		I	Water (L)	319.38	79.84	638.75	212.92
		I	Electricity (kWh)	21,780	21,780	23,364	23,364
		I	Heat (MJ) ³	--	--	--	--
		I	Chemicals (kg)	20.2	17.7	40.4	47.11
Harvesting	Centrifuge	I	Culture broth (L)	20	70	20	70
		I/O	Water (L)	912.5	798.4	1,825	2,129
		I	Electricity (kWh)	9.58	8.38	19.16	22.35
		O	Dry biomass (kg)	1.68	1.47	4.31	5.02
		O	Supernatant (L)	1,779	1,556	3,558	4,151
EPS Concentration	Dynamics Cross Flow Filtration	I	Supernatant (L)	1,779	1,556	3,558	4,151
		I	Electricity (kWh)	34.93	10.71	69.86	28.56
		I/O	Water (L)	2,737	684.4	5,475	1,825
		O	EPS (g)	56.94	49.82	170.82	199.29
		O	Rest medium (L)	1,505	1,488	3,011	3,969
Regenerate medium	Permselectiv e dialysis	I	Rest medium (L)	1,505	1,488	3,011	3,969
		I	Electricity (kWh)	60.07	59.39	120.15	158.38
		I	Water (L)	41.25	163.13	41.25	163.13
		I	HCl (kg)	155.58	153.81	311.16	410.17
		I	Chemicals (kg)	15.06	14.89	30.11	39.69
		O	Regenerated medium (L)	1,505	1,488	3,011	3,969
		O	Water - recycled (L)	41.25	163.13	41.25	163.13
PC Extraction	PEF & Dynamics Cross Flow Filtration	I	Dry biomass (kg)	1.68	1.47	4.31	5.02
		I	Ethanol (L)	2.00	2.00	2.00	2.00
		I	Electricity PEF (kWh)	182.50	136.87	365.00	364.98
		I	Electricity DCF (kWh)	34.93	10.71	69.81	28.56
		I/O	Water PEF (L)	912.50	228.12	1,825	608.33
		I/O	Water DCF (L)	2,737	684.4	5,475	1,825
		O	Biomass residue (g)	839.50	734.56	2,153	2,512
		O	PC (g)	335.80	293.83	861.40	1,004
Biogas Plant		I	Biomass residue (g)	839.50	734.56	2,153	2,512
		O	Biogas energy (MJ)	1.81	1.58	4.64	5.41

³ Die Bewertung des Wärmeeintrags im Kultivierungsprozess wird für potenzielle Projektkonfigurationen berücksichtigt. Die Berechnung desselben ist jedoch nicht Bestandteil der Untersuchung, da davon ausgegangen wird, dass diese Energiemenge durch Abwärme eine BHKW gedeckt werden kann.

Der Einfluss der untersuchten Szenarien auf die Umwelt wurde unter Verwendung von verschiedenen Ansätzen wie ReCiPe 2016 Midpoint (H), IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) und Kumulativer Energiebedarf (CEM) evaluiert. Für eine Umfassende Bewertung des in diesem Projekt entwickelten Prozesses wurden die Mittelindikatoren (MEP und FETP) und Endpunktindikatoren (WCP-aq und WCP-hh) der ReCiPe-Methodik einbezogen, was Einblicke in verschiedene Nachhaltigkeitsaspekte wie Ressourcenverbrauch und Auswirkungen auf Ökosysteme erlaubt. Zur Abschätzung des Global Warming Potential (GWP, fossil und biogen), welches sich auf Langzeitauswirkungen von Treibhausgasen bezieht, wurde mithilfe der IPCC Metrik die Emissionen von CO₂, CH₄ und NO_x in CO₂-Äquivalente (CO₂-eq kg⁻¹) umgerechnet. Die CEM-Methode wurde angewendet, um den Energieverbrauch und die Nutzung sowohl natürlicher (RN-b) als auch fossiler Ressourcen (NR-f) zu berechnen.

In Abbildung 57 sind die Wertstoffproduktivitäten für die Betriebszeit von einem Jahr angegeben. Während bei höheren Lichtintensitäten wie erwartet höhere Produktivität erreicht werden, ist auch zu sehen, dass Prozesse mit geringerer Effizienz einen höheren Einfluss auf die Umwelt haben. Zwischen den Ernteszenarien ist sowohl bei der Produktivität und bei den Auswirkungen auf die Umwelt ein Unterschied zu sehen, aber inwiefern dies signifikant ist, muss noch ermittelt werden.

Dem aufgezeigten Umwelteinfluss in Abbildung 57 ist ein Summenparameter aus den Ergebnissen der ReCiPe, IPCC und des Kumulativen Energiebedarfs (CEM) zugeordnet. Eine genauere Aufschlüsselung der Umweltwelteinflüsse ist in Abbildung 58 aufgezeigt, wo der Einfluss der verschiedenen Ernteszenarien für die beiden Hochwertprodukte EPS und Phycocyanin exemplarisch für die Produktion unter niedriger Lichtversorgung (größere Auswirkungen auf die Umwelt) vergleichend aufgeführt ist.

In Tabelle 14 sind die Werte für alle untersuchten Prozesse aufgeführt. Hierbei sieht man, dass der Energiebedarf für die Produktion von EPS bis zu 40-mal höher ist als der für PC.

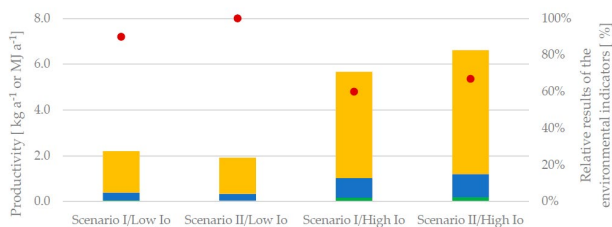


Abbildung 57 Produktivität von EPS (■), Phycocyanin (■) und Methan (■) der verschiedenen Szenarien (kg a⁻¹ bzw. MJ a⁻¹); relative Umweltindikatoren (●) normiert auf die maximale evaluierte Umweltauswirkung (100%).

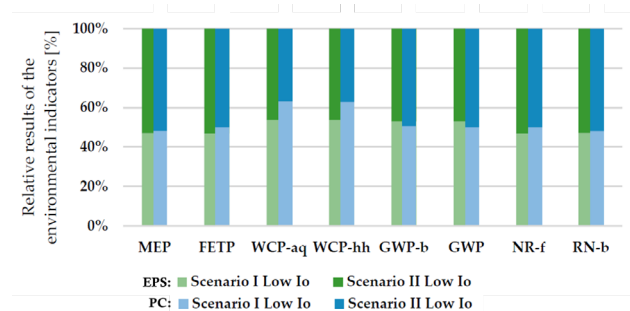


Abbildung 58 Vergleichende Umweltauswirkungen bei geringer Lichtintensität für Szenario I und II, unter Berücksichtigung der funktionalen Einheit von 1 kg EPS (■) und 1kg PC (■)

Tabelle 14 Sensitivitätsanalyse der EPS und PC Produktion

LCIA Methodology	Impact category	Abbr.	Units	Scenario I (20L)		Scenario II (70L)	
				Low I ₀	High I ₀	Low I ₀	High I ₀
EPS							
ReCiPe 2016 Midpoint (H)	Marine eutrophication	MEP	N-eq kg ⁻¹	1,52E+04	1,01E+04	1,71E+04	1,14E+04
	Water consumption	FETP	m ³	7,14E+06	4,68E+06	8,27E+06	5,29E+06
ReCiPe 2016 Endpoint	Water consumption, Aquatic ecosystems	WCP-aq	species a ⁻¹	4,27E-06	2,40E-06	3,67E-06	2,71E-06
	Water consumption, Human health ⁵	WCP-hh	d ⁻¹	1,58E+01	8,87E+00	1,36E+01	1,00E+01
IPCC Climate change	Biogenic	GWP-b	CO ₂ -eq kg ⁻¹	1,73E+07	1,01E+07	1,53E+07	1,14E+07
	Fossil	GWP	CO ₂ -eq kg ⁻¹	2,04E+08	1,20E+08	1,81E+08	1,36E+08
Cumulative Energy Demand (CED)	Non-renewable resources (fossil)	NR-f	MJ	1,89E+09	1,26E+09	2,14E+09	1,42E+09
	Renewable resources ⁶	RN-b	MJ	1,54E+08	1,02E+08	1,73E+08	1,15E+08
PC							
ReCiPe 2016 Midpoint (H)	Marine eutrophication	MEP	N-eq kg ⁻¹	5,32E+03	2,12E+06	5,69E+03	2,11E+06
	Water consumption	FETP	m ³	6,67E+05	5,01E+05	4,63E+05	3,36E+05
ReCiPe 2016 Endpoint	Water consumption, Aquatic ecosystems	WCP-aq	species a ⁻¹	2,96E-07	2,19E-07	1,73E-07	1,20E-07
	Water consumption, Human health ⁵	WCP-hh	d ⁻¹	1,10E+00	8,17E-01	6,49E-01	4,52E-01
IPCC Climate change	Biogenic	GWP-b	CO ₂ -eq kg ⁻¹	2,44E+06	1,01E+07	2,37E+06	1,14E+07
	Fossil	GWP	CO ₂ -eq kg ⁻¹	3,09E+07	1,20E+08	3,08E+07	1,36E+08
Cumulative Energy Demand (CED)	Non-renewable resources (fossil)	NR-f	MJ	5,88E+07	3,29E+07	6,33E+07	3,09E+07
	Renewable resources ⁶	RN-b	MJ	5,88E+07	3,29E+07	6,33E+07	3,09E+07

2. Verwertung

a) Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen

Es erfolgten keine Schutzrechtsanmeldungen oder Patentierungen von Erfindungen.

b) Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Die Ergebnisse dieses Projekts eröffnen neue Perspektiven für die wirtschaftliche Nutzung der entwickelten Prozesse und Produkte. Durch die im Projekt erreichten hohen Produktkonzentrationen, die im Vergleich zu Literaturdaten (vgl. Kapitel 3) eine deutlich höhere Wettbewerbsfähigkeit aufweisen, konnten die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten weiter gestärkt werden. Die im Projekt erzielte Reinheit des Phycocyanins wurde in Gesprächen mit potenziellen Marktpartnern als äußerst vielversprechend bewertet. Algenfarmer erzielen derzeit etwa 40 € pro Kilogramm Spirulina-Biomasse. Die Produkte aus den in diesem Projekt entwickelten Prozessen würden einen potenziellen Umsatz von etwa 170 € pro Kilogramm Biomasse erreichen und verdeutlichen das signifikante Marktpotenzial.

Darüber hinaus wurden im Rahmen des Projekts zusätzliche Optimierungsmöglichkeiten identifiziert, die sowohl die ökonomische als auch die ökologische Effizienz steigern können. Die Ergebnisse der durchgeführten Life Cycle Assessment (LCA)-Analysen zeigen beispielsweise, dass eine an Wetterdaten gekoppelte Prozesssteuerung den Ressourceneinsatz weiter optimieren und die Nachhaltigkeit des Verfahrens verbessern könnte. Ergänzend hierzu bietet die energetische Verwertung der Restbiomasse zusätzliche Potenziale zur Senkung der Produktionskosten oder zur Generierung von Mehrwert.

Das Vorhaben trägt somit zu den Zielen der nachhaltigen Bioökonomie bei und bietet eine solide Grundlage für die weitere wirtschaftliche Nutzung. Perspektivisch könnten zukünftige Projekte, die auf den gewonnenen Erkenntnissen aufbauen, diese Potenziale durch Kooperationen mit industriellen Partnern oder Ausgründungen realisieren. Um sicherzustellen, dass die im Projekt erzielten Fortschritte der breiten Fachöffentlichkeit zugutekommen, wurden alle relevanten Daten veröffentlicht und stehen frei zur Verfügung, ohne durch Schutzrechte eingeschränkt zu sein.

c) Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Das Projekt wurde wissenschaftlich und technisch äußerst erfolgreich abgeschlossen. Die erzielten Ergebnisse wurden in wissenschaftlichen Zeitschriften, auf Konferenzen und bei Netzwerktreffen vorgestellt und fanden in der Forschungsgemeinschaft breite Anerkennung (vgl. Kapitel 2.e). Erkenntnisse aus dem Projekt konnten zudem erfolgreich auf Fragestellungen anderer Projekte, wie übertragen werden, wodurch Synergien geschaffen wurden. Darüber hinaus führten die Arbeiten an beiden Forschungsstellen zur Anfertigung von Dissertationen, die in Kürze verteidigt werden.

Die entwickelten Methoden und Prozesse wurden in die wissenschaftliche Ausbildung an den beteiligten Forschungsinstitutionen integriert und bilden die Grundlage für neue Forschungsvorhaben (vgl. Kapitel 2.d). Insgesamt lassen sich die wissenschaftlichen Erfolgsaussichten des Projekts nach dessen Abschluss in zwei Hauptkategorien unterteilen:

1. Weiterführung des Prozesses mit spezifischem Fokus auf die Erkenntnisse zu *Arthrospira platensis*.
2. Anwendung der entwickelten Methoden als wissenschaftliches Handwerkszeug für zukünftige Projekte.

Zu den zentralen entwickelten Methoden und Erkenntnissen, die für künftige Forschungsarbeiten zur Verfügung stehen, zählen:

- **Dewiggle-Methode** zur präzisen Trennung von Absorptionspeaks zur Bestimmung von Nährstoff- und Pigmentkonzentrationen.
- **Phenolische Kohlenhydratbestimmung**, die unabhängig von der Zuckerzusammensetzung zuverlässige Ergebnisse liefert.
- **Etablierung dynamischer Querstromfiltrationen** für den Bereich von 3–10 nm, geeignet für hochspezialisierte Trennprozesse.
- **Simulationen** zur Vorhersage von Biomassewachstum und Vergleichbarkeit unterschiedlicher Prozesse.
- **Medienregeneration** mittels Membrantechnologien zur ressourcenschonenden Prozessführung.
- **Methoden zur Erstellung von Inventarlisten** für Life Cycle Assessment (LCA)-Verfahren.
- **Versuchsanlagen mit verschiedenen Bioreaktoren**, die der Prozessentwicklung und methodischen Validierung dienen.
- **Kinetische Daten** zum Wachstum von *A. platensis*, die als Basis für Prozessmodellierungen und weitere Optimierungen genutzt werden können.
- **Färbeprotokoll zur Ermittlung des Zellaufschlussgrades** nach der Behandlung mit gepulsten elektrischen Feldern mittels Fluoreszenzspektroskopie.

- **Algorithmus** basierend auf der automatischen Auswertung von Bildmaterial zur Ermittlung der Zellgröße von *Arthrospira platensis*. Dieses Verfahren kann mit einfachen Bildern aus der Mikroskopie und einem PC angewendet werden
- **Adaptives Vorhersagemodell** für die Biomasse basierend auf den Wettervorhersagen von lokalen oder globalen Diensten.
- **Modell zur Vorhersage der mittleren Feldstärke**, des spezifischen Energieeintrags und der Inhomogenität des elektrischen Feldes unabhängig von der Geometrie der PEF-Behandlungskammer, basierend auf CFD-Daten.
- **Wichtige Erkenntnisse zu relevanten Parametern** während der PEF-Behandlung (Behandlungszeit, Behandlungstemperatur, elektrische Feldstärke, spezifischer Energieeintrag)
- **Wichtige Erkenntnisse zu relevanten Parametern** während der Extraktion nach der PEF-Behandlung (Temperatur, Zusammensetzung des Mediums, Biomassekonzentration)
- **Wichtige Erkenntnisse zu qualitativen Eigenschaften** der Extrakte nach dem Zellaufschluss (Phenolgehalt, antioxidative Kapazität, Einfluss des Zellaufschlusses auf die Proteinstruktur und -zusammensetzung)

Diese umfassenden Entwicklungen und Erkenntnisse verdeutlichen die langfristige wissenschaftliche Relevanz und die potenziellen Anwendungsbereiche des Projekts.

d) Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Die wissenschaftliche Anschlussfähigkeit des Projekts zeigt sich deutlich in den Nachfolgeprojekten im Bereich Forschung und Entwicklung (F&E), die auf den erzielten Ergebnissen und den entwickelten Methoden aufbauen oder diese in andere Fachbereiche übertragen. An der OTH-AW konnte während der Projektlaufzeit aus den Netzwerkaktivitäten ein neues Forschungsprojekt initiiert werden. Darüber hinaus wurde in Zusammenarbeit mit der Forschungsstelle der TUB ein Nachfolgeprojekt erfolgreich begutachtet, dessen Start für 2025 geplant ist.

Neben den direkt quantifizierbaren Anschlussmöglichkeiten hat das Projekt ein umfassendes Netzwerk mit Unternehmen und Forschungseinrichtungen aufgebaut. Dieses Netzwerk eröffnet neue Perspektiven für zukünftige Forschung und Entwicklung und schafft gleichzeitig eine solide Basis für eine langfristige wirtschaftliche Anschlussfähigkeit, die sich in konkreten Kooperationen und Innovationen manifestieren kann. An der OTH-AW konnte auf Basis dieses Netzwerks ein weiteres Forschungs- und Entwicklungsprojekt initiiert werden, das die Kooperation mit wissenschaftlichen und industriellen Partnern weiter stärkt. An der TUB konnten durch die Präsentation der Daten auf Fachtagungen und in wissenschaftlichen Journals Netzwerke aufgebaut werden, welche in weiteren Projektanträgen mündeten. Diese umfassen neben der Kultivierung von Mikroalgen auf Nebenströmen der Milchindustrie auch die Aufarbeitung von Makroalgen und stärken somit weiterhin die Entwicklungen im ländlichen Raum.

e) Stand der Erreichung der in der Vorhabenbeschreibung aufgeführten Verwertungsoptionen, Forschungsdaten

Für die Beantwortung dieser Frage werden die Angaben aus dem Projektantrag hier nochmals zusammengefasst aufgeführt und zu den einzelnen Punkten Stellung bezogen.

Wirtschaftliche Erfolgsaussichten:

1. Schaffung neuer und Sicherung bestehender Märkte:

Für die Kommunikation der Ergebnisse beider untersuchten Hochwertprodukte wurden ähnliche Instrumente eingesetzt, die eine zielgerichtete Verbreitung auf verschiedenen Ebenen und in unterschiedlichen Zielgruppen ermöglichten. Diese umfassten Fachpublikationen (vgl. Kapitel 4), Veröffentlichungen in branchenspezifischen Magazinen wie den VDI Nachrichten (29.01.2021), dem Biogas Journal und der Bayerischen Staatszeitung (28.05.2021), sowie Beiträge auf Konferenzen (vgl. Kapitel 4).

Ergänzend fanden zahlreiche Netzwerktreffen statt, die sowohl von Interessensgruppen organisiert als auch eigenständig an den beteiligten Forschungsstellen durchgeführt wurden. Diese Aktivitäten förderten den Austausch zwischen Wissenschaft und Wirtschaft und trugen maßgeblich zur Verbreitung und Weiterentwicklung der erzielten Ergebnisse bei.

Das Projekt AnViPi kann durch das innovative Downstream-Verfahren zur Gewinnung von Phycocyanin aus *Arthrospira platensis* dazu beitragen, dass der Markt für Phycocyanin weiterwächst. Viele Produzenten im Lebensmittelbereich (siehe Nestlé Smarties oder Haribo-Produkte) haben beim Einsatz von blauen Farbstoffen bereits auf das natürliche Pigment umgestellt, da chemische Alternativen nicht immer gesundheitlich unbedenklich sind. AnViPi kann dazu beitragen, dass Phycocyanin wettbewerbsfähiger wird, da das etablierte Verfahren einen sehr geringen spezifischen Energieaufwand hat.

Die Produktion von EPS zur Behandlung von Fischen ist ein neuer Markt, der bisher nicht wirtschaftlich erschlossen ist. Im Rahmen von AnViPi wurden Grundlagen geschaffen, diesen Markt auszubauen und somit die Wirtschaftlichkeit der Algenbiotechnologie zu verbessern.

2. Sicherung und Schaffung neuer Arbeitsplätze:

Das Projekt ANViPi hat sowohl kurzfristig zur Schaffung von Arbeitsplätzen an den beteiligten Forschungsstellen beigetragen als auch langfristige Perspektiven für die Beschäftigung von Technikern und Ingenieuren im ländlichen Raum eröffnet. An den Forschungsstellen OTH-AW und TUB ebnete ANViPi den Weg für zahlreiche Nachfolgeprojekte mit Fokus auf Mikro- und Makroalgen. Infolgedessen wurden neue Stellen in diesem Forschungsbereich geschaffen, um die langfristige Etablierung dieses Themenfeldes in den Regionen Oberpfalz und Berlin-Brandenburg sicherzustellen. Darüber hinaus sind in den Nachfolgeprojekten des Projekts auch Unternehmen aus den Regionen involviert, die ein intrinsisches Interesse an der Integration von Mikroalgenprozessen in bestehende Wertschöpfungsketten haben. Dies stärkt die langfristigen Aussichten für die Schaffung zusätzlicher Arbeitsplätze im ländlichen Raum. Da die entsprechenden Industriezweige in ländlichen Regionen weit verbreitet sind, kann von einem ähnlichen positiven Effekt auch in anderen ländlichen Gebieten ausgegangen werden.

3. Verbesserung der Wettbewerbssituation:

Im ursprünglichen Antrag wurde der Fokus gezielt auf die Teichwirtschaft gelegt, da die Anwendung von EPS in diesem Bereich großes Potenzial birgt. Die vom Unterauftragnehmer bereitgestellten Daten zur Applizierbarkeit von EPS bestätigen diesen Mehrwert und unterstreichen die Relevanz der Ergebnisse für die Teichwirtschaft. Zwar lässt sich die direkte Verbesserung der Wettbewerbssituation derzeit noch nicht abschließend bewerten, jedoch zeigen die vorliegenden Ergebnisse vielversprechende Ansätze, die eine weitere Optimierung und Implementierung ermöglichen könnten.

Die Verbesserung der Wettbewerbssituation durch eine verbesserte Extraktion des Phycocyanins nach der PEF-Behandlung wurde bereits beschrieben. Diese leitet sich im Wesentlichen aus dem geringen Energiebedarf für den Zellaufschluss und dem vereinfachten Downstream Prozess (Kein Austausch des Kulturmediums, keine weitere Aufreinigung des Phycocyanins) ab.

Ein zusätzlicher Bereich, der im Antrag nicht explizit angesprochen wurde, ist die Biogasproduktion. Im Rahmen des Projekts AnViPi ergaben sich vielversprechende Kontakte. Gemeinsam sollen auf Basis der im Projekt gewonnenen Daten die Integration von Algen in den Biogasprozess weiter untersucht werden. Zwar zeigt dies noch keinen direkten Einfluss auf die Wettbewerbssituation, jedoch wird durch geplante Folgeforschungsprojekte eine gezielte Stärkung in diesem Bereich angestrebt.

4. Effizienzsteigerung in der Wertschöpfungskette:

In der Veröffentlichung von Cogo Badan et al.¹⁹ (2024) wurde der entwickelte Prozess einer Lebenszyklusanalyse (LCA) unterzogen, um verschiedene Hebel zur Effizienzsteigerung zu identifizieren und aufzuzeigen.

5. Förderung des Innovationsstatus:

Wie bereits in Kapitel 2.a beschrieben, wurden im Rahmen dieses Projekts keine Schutzrechte oder Patente angemeldet. Dies bedeutet jedoch keineswegs, dass der Innovationsstatus nicht gefördert wurde. Der Erfolg des Projekts zeigt sich vielmehr in den zahlreichen Publikationen, Konferenzbeiträgen und den unmittelbar anschließenden Folgeprojekten. Diese tragen maßgeblich dazu bei, die gewonnenen Erkenntnisse weiterzuentwickeln und die wissenschaftliche sowie technologische Kompetenz im Bereich aquatischer Bioprozesse zu stärken, auch ohne die direkte Einbindung eines industriellen Partners.

6. Schaffung neuer Prozesskonzepte:

Das entwickelte Prozesskonzept wurde nahezu vollständig gemäß den Zielsetzungen des ursprünglichen Antrags umgesetzt, ohne wesentliche Abweichungen von den geplanten Vorgaben. Sowohl die einzelnen Entwicklungsschritte als auch das Gesamtkonzept wurden erfolgreich durch Fachpublikationen (vgl. Kapitel 4), Konferenzbeiträge (vgl. Kapitel 4) sowie Netzwerktreffen einer breiten wissenschaftlichen Gemeinschaft und dem Fachpublikum vorgestellt. Die Rückmeldungen hierzu waren durchweg positiv, was die Qualität und Relevanz der Ergebnisse unterstreicht.

7. Erlöse aus Schutzrechtsanmeldungen:

Vgl. Kapitel 2 a.

¹⁹ I. Cogo Badan, S.-H. Jung, R. Singh, V. Vivekanand, J. Knappert, C. Rauh, C. Lindenberger, *Fermentation*, DOI 10.3390/fermentation10030163.

Forschungsdaten und Maßnahmen:

1. Transfer zu Nutzergruppen:

Durch die Präsentation der Projektergebnisse auf spezifischen Fachveranstaltungen, in Fachzeitschriften sowie durch die Einbindung von Multiplikatoren wie Fachverbänden und gezielte Beratungsangebote wurde der Transfer der Erkenntnisse zu verschiedenen Nutzergruppen aktiv unterstützt. Im Folgenden sind die wichtigsten Maßnahmen zusammengefasst:

Fachpublikationen:

- Detaillierte Auflistung siehe Kapitel 4.

Konferenzen:

- Eine Übersicht findet sich ebenfalls in Kapitel 4.

Beratungsangebote und Netzwerktreffen:

OTH-AW

- Netzwerktreffen der Adalbert-Raps-Stiftung: Auf diesen Treffen konnten Kontakte zu unterschiedlichen Interessengruppen geknüpft werden. Um diese Verbindungen im Bereich der Algenbiotechnologie zu vertiefen, wurden im Anschluss spezifische Netzwerktreffen an der Forschungsstelle OTH-AW organisiert.
- Netzwerktreffen an der OTH-AW (10-11.06.2024): Vertreter von mehreren Firmen aus verschiedensten Bereichen der Lebensmittel Branche sowie aus dem akademischen Bereich diskutierten mögliche Folgeprojekte basierend auf den Ergebnissen von AnViPi. Aus diesen Treffen entstanden zahlreiche Ideen, die in konkrete Projektanträge überführt wurden. Weitere Projektanträge, die auf den Netzwerktreffen formuliert wurden, befinden sich aktuell in der Begutachtungsphase durch verschiedene Förderinstitutionen.
- Konsortium EVAMiA: Ein weiterer Erfolg aus diesen Netzwerktreffen ist die Bildung des Konsortiums EVAMiA. Der Aufbau und die Zielsetzung dieses Konsortiums verdeutlichen die Bedeutung von AnViPi als Grundlage für neue Kooperationen.

TUB

- Die Forschungsstelle der TUB ist Mitglied im Innovationsraum NewFoodSystems und Teil des Konsortiums des Projektes AlgaeModule 4.0. Ergebnisse aus AnViPi wurden über diesen Innovationsraum direkt oder indirekt mit den beteiligten Partnern aus Industrie und Forschung geteilt. Die Industriebeteiligung umfasst Firmen entlang der Wertschöpfungskette von Mikroalgen (Kultivierung, Reaktorsteuerung, künstliche Beleuchtung, Zellaufschluss mit PEF...). Das Wissen, welches im Rahmen von AnViPi generiert wurde, half, in Kooperation mit diesen Firmen neue Projektanträge zu entwickeln.
- Die TUB verfügt über ein Zentrum zum Wissens- und Technologietransfer. Darüber ist die Forschungsstelle Verbindungen zu Unternehmen aus der Region. Darüber können in Zukunft neue Forschungsvorhaben realisiert werden, in welchen das Knowhow weiter in die Wirtschaft transferiert wird.
- Im Rahmen der KI-Reihe der Deutsch-Arabischen Gesellschaft wurden zentrale Ergebnisse des Projektes (Hauptsächlich AP2) vor einem Internationalem Publikum vorgetragen. Die daraus resultierenden Kontakte können in Zukunft genutzt werden, um das Wissen über den deutschsprachigen Raum hinaus zu transferieren.
- Die TUB ist weiterhin mit dem Programm Berlin Partners gut vernetzt. Gesellschafter dieses Programms sind u.A. die Handelskammer, Industrie- und Handelskammer und die Technologiestiftung Berlin. Dadurch steht die Forschungsstelle der TUB in ständigem Kontakt zu Firmen aus der Region Berlin-Brandenburg.
- Im Rahmen von Veranstaltungen, die von der Forschungsstelle organisiert wurden (z.B. FEI Jahrestagung, GALA Tagung) finden regelmäßig Rundgänge durch die Einrichtungen der Forschungsstelle statt. In diesem Rahmen wurden Ergebnisse und Versuche aus AnViPi direkt gezeigt und in Form von bilateralen Gesprächen mit anderen Fachrichtungen (Strömungslehre, Lebensmittelverfahrenstechnik u.A.) ausgetauscht.
- Im Rahmen der Langen Nacht der Wissenschaft wurden an der Forschungsstelle auch Ergebnisse und Versuche, die in AnViPi generiert wurden, einem interessierten Laienpublikum präsentiert.
- Im Rahmen der Lehre an der TUB im Studiengang Lebensmitteltechnologie (Bachelor und Master) werden die Ergebnisse, die im Rahmen dieses Projektes generiert wurden unmittelbar an die Studierenden weitergegeben. Dies betrifft im Wesentlichen die Module

Bioverfahrenstechnik, welches einen Schwerpunkt auf Mikroalgen allgemein hat, sowie das Fach Innovative Technologien der Lebensmitteltechnologie, in welchem im Rahmen der Vorlesung zu PEF die neusten Erkenntnisse zur Behandlung von *Arthrospira platensis* gelehrt werden.

Publikationen und Kommunikation in branchenspezifischen und allgemeinen Medien:

- Branchenspezifische Publikationen: Beiträge im Biogasjournal sowie den VDI Nachrichten (29.01.2021).
- Allgemeine Medien: Artikel in der Bayerischen Staatszeitung (28.05.2021).
- Fernsehen: Zwei Berichte bei OTV (02.04.2021: "OTH forscht an Mikroblaulagen" und 19.03.2024: "Zucht der Blaulage Spirulina an der OTH").

Die projektübergreifende Kommunikation der Ergebnisse förderte den Austausch zwischen verschiedenen Branchen und führte unter anderem zu Ideen für Drittmittelprojekte, die die Integration von Algen in die Milchwirtschaft zum Schwerpunkt haben. Dabei wird intensiv auf die im Projekt AnViPi entwickelten Technologien und das gewonnene Wissen zurückgegriffen, was die nachhaltige Relevanz und Übertragbarkeit der erarbeiteten Methoden unterstreicht.

2. Langfristige Netzwerke und Kooperationen:

Hier wird auf den vorherigen Punkt verwiesen, da die Maßnahmen und die erreichten Ziele hierbei weitestgehend übereinstimmen.

3. Wissenschaftlicher Nachwuchs:

Hier erfolgt die getrennte Betrachtung der beteiligten Forschungsstellen.

An der Forschungsstelle **OTH-AW** werden die Ergebnisse des Projektes für ein Promotionsvorhaben verwendet. Des Weiteren sind an der OTH im Laufe des Projektes zahlreiche Abschlussarbeiten angefertigt worden:

Masterarbeiten:

- Transfer of the growth characteristics of constantly light-supplied phototrophic microorganisms to real day-night cycles (2021)
- Downstream Processing of Biomass and Biopolymers from Cyanobacteria Cultures (2021)
- Build-up and characterization of a photobioreactor for microalgae cultivation (2022)
- Life Cycle Assessment and Techno-Economic Analysis of Exopolysaccharides (EPS) and Phycocyanin production with *A. platensis* (2024)

Bachelorarbeiten:

- Investigation of the growth behaviour of *Arthrospira Platensis* with recycled cultivation medium (2022)
- Influence of temperature during the dark phases on high value products concentration of *A. platensis* (2022)
- Influence of watery extraction on the biogas production from *Arthrospira platensis* biomass. (2023)
- Effect of harvest cycle on the expression of high value products of the cyanobacterium *A. platenis*. (2023)

An der Forschungsstelle TUB werden die Ergebnisse des Projektes ebenfalls für ein Promotionsvorhaben verwendet. Des Weiteren sind an der TUB im Laufe des Projektes folgende Abschlussarbeiten betreut worden:

Masterarbeiten:

- Modification of Cultivation Media for Pulsed Electric Field Treatment and Phycocyanin Extraction of *Spirulina platensis* (2021)
- Charakterisierung des Effekts von physikalischen Zellaufschlussmethoden auf das Cyanobakterium *Arthrospira platensis* mittels Fluoreszenzphotometrie (2021)
- Einfluss gepulster elektrischer Felder (PEF) auf die Zellintegrität von *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) (2021)
- Vergleichende Untersuchung von verschiedenen Zellaufschluss-verfahren zur Extraktion von Phycocyanin aus *Arthrospira platensis* im Hinblick auf die chemische Zusammensetzung der Extrakte und der Energieeffizienz (2024)

Bachelorarbeiten:

- Untersuchungen zum Einfluss gepulster elektrischer Felder (PEF) auf die Extraktion von Phycocyanin und Protein aus dem Cyanobakterium *Arthrospira platensis* (2021)
- Konzeptionierung und Implementierung einer Echtzeitmessung zur dynamischen Bestimmung der Pigmentzusammensetzung von *Arthrospira platensis* (2024)
- Tryptophan induzierte Synthese von Indol-3-Essigsäure (IAA) in *Arthrospira platensis* Kulturen (2024)
- Konzeptionierung, Aufbau und Charakterisierung eines tubulären Photobioreaktors zur Kultivierung von *Arthrospira platensis* (Spirulina) (2023)

4. Schaffung von Wissen:

Hier wird wieder auf die Publikionslite in Kapitel 4 verwiesen.

5. Folgeprojekte:

Bei den Folgeprojekten wird grundsätzlich zwischen Drittmittelprojekten und Kooperationen mit Unternehmen unterschieden. Während die Drittmittelprojekte auf spezifische Forschungsthemen abzielen, bieten die Kooperationen mit Unternehmen die Möglichkeit, Ergebnisse des Projektes AnViPi zu praxisnahen Anwendungen weiterzuentwickeln. Aus diesen Kooperationen können sich in naher Zukunft zusätzliche Forschungsprojekte ergeben, die sowohl wissenschaftliche als auch industrielle Fragestellungen adressieren.

OTH-AW

Folgeprojekte:

- ColorUp; DBU (FKZ: 39132/01-36), Beteiligte Partner: Universität Giesen, GNT-Group
- EVAMiA; BLE (Skizze positiv begutachtet), beteiligte Partner: Festo GmbH, Cysmic GmbH, OTH-AW, TUB, Privatmolkerei Bechtel)

Kooperationen mit Unternehmen:

- GNT-Group
- MilEi GmbH
- Privatmolkerei Bechtel
- Solliquids
- PUEVIT GmbH

TUB

Folgeprojekte:

- EVAMiA; BLE (Skizze positiv begutachtet), beteiligte Partner: Festo GmbH, Cysmic GmbH, OTH-AW, TUB, Privatmolkerei Bechtel)
- Algoboost, IBB (Skizze bei der Investitionsbank Berlin in Kooperation mit der Charité, der Wunderfish GmbH und der Herbst Umwelttechnik GmbH)

Kooperationen mit Unternehmen:

- Festo GmbH
- Cysmic GmbH
- Wunderfish GmbH
- Herbst Umwelttechnik GmbH
- Elea Technology GmbH

3. Erkenntnisse von Dritten

Das Cyanobakterium *Arthrospira platensis* ist ein intensiv untersuchter Produktionsorganismus, zu dem fortlaufend neue Forschungsergebnisse veröffentlicht werden. Da nicht alle Entwicklungen in diesem Bereich dargestellt werden können, werden hier exemplarisch die Themen Bioraffineriekonzepte mit *A. platensis*, Biogasproduktion sowie Downstream-Prozesse zur Phycocyanin-Extraktion mittels PEF (Pulsed Electric Field) und zur EPS (extrazelluläre polymere Substanzen) -Konzentration durch dynamische Querstromfiltration behandelt.

Phycocyanin Extraktion mittel PEF-Technologie und Ultraschall

Die Extraktion von Phycocyanin aus *A. platensis* wurde während der Projektlaufzeit in unterschiedlichen Studien, mit verschiedenen Verfahren untersucht. Zu erwähnen sind hier die Studien von Lauceri et al (2023)²⁰ und Kuhnholz et al (2024)²¹ in welchen erstmals beschrieben wurde, dass die Zugabe von CaCl₂ die Freisetzung von Chlorophyll bei der Ultraschallbehandlung verhindert. Zum Thema PEF-Behandlung ist die Studie von Katsimichas et al (2024)²² zu erwähnen. Die Studie bestätigt Ergebnisse aus AnViPi. So führte die Erhöhung der Temperatur bei der Extraktion konnte diese Beschleunigen. Eine Verunreinigung mit Chlorophyll wie sie in AnViPi beobachtet wurde wird in der Studie nicht erwähnt. Außerdem kommen die Autoren zu dem Schluss, dass die Erhöhung des spezifischen Energieeintrages die Extraktionszeit verkürzt. Allerdings ist dies durch die Temperaturerhöhung eingeschränkt. Eine Extraktion bei 50°C führte zu einer deutlichen Verringerung des Aufschlussgrades, was die Autoren auf eine Inaktivierung von Proteolytischen Enzymen, welche für den Zellerfall nach der PEF-Behandlung verantwortliche seine, zurück. Im Rahmen von AnViPi wurden schlechtere Extraktionsausbeuten bei höheren Energieeinträgen (125 kJ/kg) in der kontinuierlichen Behandlung beobachtet. Dabei wurden Temperaturen von knapp 60°C erreicht. Ein ähnlicher Effekt könnte hier zugrunde liegen. Die Studie steht somit nicht im Gegensatz zu den Ergebnissen von AnViPi sondern bestätigt diese vielmehr bzw. hilft diese zu interpretieren.

Zu den Themen Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die PEF-Behandlung sowie Untersuchungen der Maßstabsübertragung mittels CFD-Simulationen wurden in den vergangenen Jahren keine Studien veröffentlicht. Dies untermauert den innovativen Charakter von AnViPi.

Biogas aus *A. platensis*

Die Studie von Hawrot-Paw et al. (2023)²³ zur Biogasproduktion aus *Arthrospira platensis* zeigte, dass unbehandelte Biomasse eine Biogasproduktion von 500 ml pro Gramm flüchtiger Feststoffe (VS) erreichen kann. Im Gegensatz dazu wurden im AnViPi-Projekt bei Verwendung unbehandelter Biomasse etwa 100 ml Biogas pro Gramm VS erzielt. Dieser Unterschied lässt sich durch den in der Studie von Hawrot-Paw et al. gemessenen niedrigen Proteingehalt der verwendeten Biomasse erklären. Versuche im AnViPi-Projekt mit behandelter Biomasse, die einen reduzierten Proteingehalt aufwies, führten zu ähnlichen Biogasproduktivitäten wie in der genannten Studie. Daraus lässt sich schließen, dass die Ergebnisse von Hawrot-Paw et al. die Kernaussage des AnViPi-Projekts unterstützen: Biomasserückstände aus einer *A. platensis*-Bioraffinerie sind generell für die Biogasproduktion geeignet.

Einstaz von dynamischer Querstromfiltration zur Konzentration von EPS aus Mikroageln

Die dynamische Querstromfiltration (DQF) wird in der Biotechnologie eingesetzt, um die Effizienz der Filtration zu steigern und Fouling zu reduzieren. Allerdings gibt es derzeit keine spezifischen Veröffentlichungen, die die Anwendung der DQF zur Aufreinigung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) aus Mikroalgen detailliert beschreiben. Jedoch zeigt das ausführliche Review von G. Pierre et al²⁴., dass es in diesem Bereich noch entwicklungsbedarf besteht.

²⁰ Lauceri, R., Cavone, C., Chini Zittelli, G. et al. High Purity Grade Phycocyanin Recovery by Decoupling Cell Lysis from the Pigment Extraction: an Innovative Approach. *Food Bioprocess Technol* **16**, 111–121 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02926-w>

²¹ Kuhnholz, J., Glockow, T., Siebecke, V. et al. Comparison of different methods for extraction of phycocyanin from the cyanobacterium *Arthrospira maxima* (Spirulina). *J Appl Phycol* **36**, 1725–1735 (2024). <https://doi.org/10.1007/s10811-024-03224-y>

²² Alexandros Katsimichas, Athanasios Limnaios, Konstantinos Dimitrakopoulos, George Dimopoulos, Petros Taoukis, Pulsed Electric Fields assisted extraction of proteins and phycocyanin from *Arthrospira platensis* biomass: A kinetic study, *Food and Bioproducts Processing*, Volume 147, 2024, Pages 304-314, ISSN 0960-3085, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.07.012>.

²³ M. Hawrot-Paw, A. Koniuszy, P. Ratomski, M. Sasiadek, A. Gawlik, *Energies*, DOI 10.3390/en16103971.

²⁴ G. Pierre, C. Delattre, P. Dubessay, S. Jubeau, C. Vialleix, J.-P. Cadoret, I. Probert, P. Michaud, *Molecules (Basel, Switzerland)*, DOI 10.3390/molecules24234296.

4. Veröffentlichungen

OTH-AW

Konferenzen:

Sun-Hwa Jung, Niklas Zell; Justus Knappert, Cornelia Rauh, Vivekanand Vivekanand; Christoph Lindenberger. (11.2023) Optimization of Phycocyanin production in upstream and extracting with PEF system and improvement of purity by filtration technique from *Arthrospira Platensis*. BSB2-2022 - International Conference on Biotechnology, Sustainable Bioresources and Bioeconomy, Guwahati, Indien

Christoph Lindenberger. (31.03.2021) Algen-Bioraffinerie-Konzepte – Chancen und Herausforderungen. AquaTechLausitz-Symposium, Dresden Aquatech Lausitz: Algen-Bioraffiniere-Konzepte - Chancen und Herausforderungen

Niklas Zell, Sun-Hwa Jung, S, Fabian Boßle, Marc Herden, Peter Kurzweil, Franz Bischof, Alexander Jahn, Christoph Lindenberger. (12.04.2021) A novel CO₂-free approach for the pH-control and recycling of bicarbonate-carbonate-buffered culture media in microalgae production systems, Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Spring meeting 2021, Seoul, ROK

TUB

Knappert, J., McHardy, C., Rauh, C. No downstream without upstream: Challenges for PEF treatment of *Arthrospira platensis* and studies on the mechanism of phycocyanin release. Vortrag, Konferenz: 4th World Congress on Electroporation & Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine, Food and Environmental Technologies. At: Copenhagen, Denmark

Knappert, J., Schottroff, F., Siemer, C., Rauh, C., Scaling of continuous pulsed electric fields processes by means of dimension analysis and computational fluid dynamics, Vortrag, Konferenz: International Congress on Engineering and Food (ICEF 14). At: Nantes, France

Knappert, J., Schottroff, F., Siemer, C., Rauh, C. Scaling of continuous PEF processes by means of dimensionless numbers and computational fluid dynamics (CFD), Vortrag, Konferenz: EFFosT/IFD-NPD Workshop. At Potsdam, Germany

Knappert J., Friese N., Yang Y., McHardy C., Rauh C. *Charakterisierung der Pulsed Electric Fields (PEF) Behandlung von Arthrospira platensis (Spirulina) -Zellen mit einer neuen fluoreszenzphotometrischen Methode. ProcessNet 2021 (online)*

Knappert, J., *Untersuchung von Zellaufschlussverfahren für die Gewinnung von Lebensmittelzutaten aus phototrophen Mikroalgen*, Webinar der Gesellschaft Deutscher Lebensmitteltechnologien zum Thema: Vegetarische und vegane Lebensmittel –eine technologische Herausforderung?! (2022)

Knappert J., *Skalierung von kontinuierlichen PEF-Prozessen mit Hilfe von dimensionslosen Kennzahlen und numerischer Strömungsmechanik (CFD). Gala 2024, Berlin*

Knappert, J., Schottroff, F., Siemer, C., Rauh, C. Scaling of continuous PEF processes by means of dimensionless numbers and computational fluid dynamics (CFD), Posterpräsentation at 5th World Congress on Electroporation 2024, Rome Italy

Die Posterpräsentation in Rom wurde mit dem dritten Platz beim ISEBTT Student Award ausgezeichnet.

Veröffentlichungen:

Knappert J, Nolte J, Friese N et al. (2022) Decay of Trichomes of *Arthrospira platensis* After Permeabilization Through Pulsed Electric Fields (PEFs) Causes the Release of Phycocyanin. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 6:1–17. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.934552>

Jung S-H, Zell N, Boßle F et al. (2022) Influence of Process Operation on the Production of Exopolysaccharides in *Arthrospira platensis* and *Chlamydomonas asymmetrica*. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 6:1–10. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.883069>

Cogo Badan I, Jung S-H, Singh R et al. (2024) Life Cycle Assessment of Exopolysaccharides and Phycocyanin Production with *Arthrospira platensis*. *Fermentation* 10:163. <https://doi.org/10.3390/fermentation10030163>

ANHANG

Teilvorhaben 1: Kultivierung

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Das Teilvorhaben "Kultivierung" fokussiert sich auf das Upstream-Processing einer *A. platensis*-Kultivierung mit dem Ziel, eine Produktkaskade zur Gewinnung von Phycocyanin (PC) und Exo-Polysacchariden (EPS) zu entwickeln. Beide Produkte stehen als hochwertige Zielsubstanzen im Mittelpunkt, während die verbleibende stickstoffreduzierte Restbiomasse als Substrat in der Biogasproduktion (Bioprozess 2) genutzt werden soll.

Die Zielsetzung umfasst die Entwicklung von Reaktordesigns, die Sicherstellung der Scale-Up-Fähigkeit des Prozesses, die Optimierung der Prozessfahrweise sowie die Untersuchung der Prozessparameter Licht, Temperatur und Nährstoffverbrauch. Ergänzend wird die Produktivität durch gezielte Variation von Erntezeitpunkten und Inokulationsbedingungen weiter gesteigert. Zusätzlich werden ökonomische Aspekte wie Nährstoffrecycling und Energieeffizienz berücksichtigt. Die Medium- und Prozessentwicklung zielt auf die phototrophe Produktion von EPS und PC ab und beinhaltet den Vergleich verschiedener Reaktortypen (Bioprozess 1).

Weitere Schwerpunkte liegen auf der Untersuchung geeigneter Applikationstechniken für EPS. Das Projekt strebt an, die entwickelten Bioprozesse vom Labormaßstab (TRL 4) auf den Technikumsmaßstab (TRL 5) zu skalieren und deren Stabilität und Wirtschaftlichkeit zu validieren.

Ein zentraler Aspekt des Gesamtprojektes ist der Aufbau und Test der skalierten Up- und Downstreamprozesse im Technikumsmaßstab unter Freilandbedingungen. Zusätzlich erfolgt eine stofflich-energetische Bilanzierung und Bewertung der gesamten Wertschöpfungskette.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

Arbeitspaket 1: Prozessführung aquatischer Bioprozesse

Das Arbeitspaket 1 (AP1) ist ein zentrales Element des Gesamtvorhabens und widmet sich der Entwicklung eines Upstream-Prozesses zur Kultivierung von *A. platensis*. Ziel war die Produktion hochwertiger Produkte wie Phycocyanin (PC) und Exopolysacchariden (EPS). Ein Fokus lag dabei auf der Optimierung von Prozessparametern, der Auswahl geeigneter Reaktortypen sowie der Skalierung des Prozesses in den Technikumsmaßstab. Die definierten Meilensteine beinhalteten die Festlegung des Reaktortyps, die Entwicklung einer geeigneten Prozessführung und die Berücksichtigung von Anforderungen für das Downstream-Processing.

Reaktorauswahl und Geometrie: Untersucht wurden verschiedene Reaktorgeometrien, darunter Blasensäulen, Flat-Panel-Reaktoren und Closed Ponds. Entscheidend für die Wahl geeigneter Systeme waren Parameter wie Lichtverteilung, Temperaturregelung und Durchmischung. Die Ergebnisse zeigten, dass zylindrische Reaktoren aus Glas mit integriertem Wärmetauscher eine hohe Flexibilität bieten und für die spätere Freilandkultivierung am besten geeignet sind. Closed Ponds wiesen unter Laborbedingungen früh Limitierungen auf, insbesondere bei steigenden Biomassekonzentrationen, weshalb sie für die Freilandversuche ausgeschlossen wurden. Die ausgewählten Reaktortypen zeigten vergleichbare spezifische Wachstumsraten, wobei zylindrische Systeme eine gleichmäßigere Lichtverteilung und eine höhere Skalierbarkeit aufwiesen.

Prozessparameter und Optimierung: Zur Untersuchung des Einflusses von Licht und Temperatur wurde ein 4x4-faktorielles Design verwendet. Es zeigte sich, dass die optimalen Bedingungen bei einer Lichtintensität von $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und einer Temperatur von $35 \text{ }^\circ\text{C}$ liegen. Während höhere Temperaturen das Wachstum stark beeinflussen, führen Temperaturen über $40 \text{ }^\circ\text{C}$ zu irreversiblen Schädigungen der Biomasse. Die Lichtintensität zeigte bei kontinuierlicher Beleuchtung eine deutliche Korrelation mit der Wachstumsgeschwindigkeit. Besonders bei niedrigen Intensitäten begrenzte der sogenannte Self-Shading-Effekt das Wachstum, was die Bedeutung homogener Lichtverteilung hervorhob.

Produktivität von PC und EPS: Für die Produktion von PC wurden kontinuierliche und Batch-Prozesse verglichen. Bei Lichtintensitäten unter $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ wurden in beiden Betriebsarten ähnlich hohe spezifische Konzentrationen ($\sim 105 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) erzielt. Bei höheren Intensitäten zeigte der kontinuierliche Prozess eine leicht höhere Produktivität, insbesondere bei spezifischen Ausbeuten. Ähnlich verhielt es sich bei EPS: Im Batch-Prozess wurden Konzentrationen von über $0,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erreicht, während die kontinuierliche Produktion geringfügig niedrigere Werte aufwies. Tageslichtbedingungen führten zu einer höheren Gesamtausbeute, insbesondere an sonnigen Tagen.

Prozessführung und Optimierung: Ein Vergleich zwischen Batch-, kontinuierlichen und Repeated-Batch-Verfahren zeigte, dass kontinuierliche Prozesse eine leicht höhere spezifische Produktivität aufweisen. Diese Unterschiede waren jedoch innerhalb der biologischen Schwankungen, weshalb ein Repeated-Batch-Prozess gewählt wurde. Dieser Ansatz bietet Vorteile bei der Handhabung und gewährleistet gleichbleibende Produktqualität. Optimierungen der Erntezyklen ergaben, dass längere Intervalle (zwei bis drei Tage) nicht nur die Produktivität steigern, sondern auch die Handhabbarkeit des Downstream-Prozesses verbessern.

Medium-Recycling und Ressourcenschonung: Um den Nährstoffverbrauch zu minimieren, wurde ein regeneratives Medium-Recycling-Verfahren mittels permselektiver Membranen entwickelt. Das Verfahren, das auf einem Kationenaustausch basiert, erlaubt es, den pH-Wert auf das optimale Niveau zurückzusetzen und somit die Verfügbarkeit von Hydrogencarbonat zu sichern. Tests zeigten, dass das Medium bis zu dreimal regeneriert werden kann, ohne das Wachstum oder die Produktivität der Biomasse zu beeinträchtigen. Dieses Verfahren trägt nicht nur zur Ressourcenschonung bei, sondern reduziert auch den Frischwasserverbrauch und steigert die ökonomische und ökologische Effizienz des Prozesses.

Arbeitspaket 3: Nutzung von Zelldebris als Substrat in Biogasanlagen

Das Arbeitspaket 3 (AP3) hatte das übergeordnete Ziel, die Eignung der Restbiomasse von *A. platensis* als Substrat für Biogasanlagen zu untersuchen und basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen eine maßstabsabhängige Skalierung zu ermöglichen. Dabei wurden vor allem die chemische Zusammensetzung, die Prozessparameter und der Einfluss des Phycocyanin-Gehalts (PC) auf die Biogasproduktion analysiert.

Methodenentwicklung und vorbereitende Analysen: Für eine umfassende Bewertung der Biomasse wurden spezifische Analysemethoden entwickelt und validiert. Diese umfassten die Messung von FOS/TAC-Wert (Stabilität des Gärprozesses), Säureprofil der Gärreste mittels Gaschromatographie (GC), Gesamter organischer Kohlenstoff (TOC) und gelöster anorganischer Kohlenstoff (DIC). Die Methoden ermöglichten eine präzise Bewertung des Abbaupotenzials und der Stabilität der Vergärung, was für die Entwicklung eines robusten Prozesses essenziell ist. Eine Proximate-Analyse der Biomasse (Aschegehalt, TOC, Brennwert) zeigte einen höheren TOC-Gehalt in PC-reduzierten Proben, was eine verbesserte Vergärbarkeit unterstützt und geringeren Aschegehalt in den PC-reduzierten Proben, was die pH-Pufferfähigkeit im Gärprozess leicht beeinträchtigen könnte.

Batch-Gärversuche mit variierendem Phycocyanin-Gehalt: Mit Batch-Gärtests gemäß VDI 4630 wurde der Einfluss des PC-Gehalts auf die Biogasausbeute untersucht. Es zeigte sich, dass die Biogasausbeute mit abnehmendem PC-Gehalt stieg, wobei unbehandelte Biomasse 100 L/kg erreichte und eine Reduzierung des PC Gehaltes um 40% 300 L/kg. Die Ergebnisse legen nahe, dass ein hoher PC-Gehalt die Biogasproduktion hemmt. Trotz dieser Hemmwirkung bestätigte die Untersuchung die generelle Vergärbarkeit von *A. platensis*.

Maßstabsabhängige Skalierung: Für eine Biogasanlage mit 50 kW Leistung wurden theoretische Berechnungen basierend auf den experimentellen Daten und dem Modell nach Baserga zur Skalierung durchgeführt. Ein Prozess mit einem wöchentlichen Erntevolumen von 500 m³ und einem Gesamtkulturvolumen von 1500 m³ wurde als geeignet identifiziert. Dieser Ansatz zeigt, dass bei kleineren Kultivierungen eine Zufütterung in bestehende Anlagen erforderlich ist.

Arbeitspaket 4: EPS-Gewinnung

Das Arbeitspaket 4 widmete sich der Gewinnung von Exopolysacchariden (EPS) aus der Kulturbrühe von *A. platensis*. Ziel war es, ein effizientes und schonendes Verfahren zur Abtrennung der Biomasse und Konzentrierung der EPS zu entwickeln, das sowohl hohe Ausbeuten als auch eine gleichbleibende Produktqualität gewährleistet. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Minimierung mechanischer Zellschäden und der Optimierung der Verfahrensparameter.

Biomasse Abscheidung: Die Abtrennung der Biomasse stellte eine zentrale Herausforderung dar, da Zellintegrität und Produktqualität erhalten bleiben mussten. In diesem Kontext wurde die Kuchenfiltration als die schonendste Methode identifiziert. Hierbei konnte die Biomasse mittels Nylonfiltern mit Porengrößen von 15 bis 25 µm effektiv zurückgehalten werden, wobei die mechanische Beanspruchung der Zellen gering blieb. Allerdings zeigte sich, dass die Filtrierbarkeit der Biomasse mit steigendem Kulturalter deutlich abnahm, was die Anwendung in der stationären Phase der Kultur begrenzte. Im Vergleich dazu erwies sich die Tangentialfiltration (Crossflow CF) zwar als robustes Verfahren, verursachte jedoch durch die hohen Strömungsgeschwindigkeiten und die damit verbundene Rezirkulation signifikante Zellschäden. Selbst durch Anpassungen der Betriebsparameter konnte die Entstehung von Zelldebris nicht ausreichend reduziert werden. Eine potenziell schonendere Alternative bot die dynamische Crossflow-Filtration (DCF), bei der die Turbulenz durch rotierende Filtrations scheiben erzeugt wurde. Dieses Verfahren ermöglichte eine Entkopplung von Strömungsgeschwindigkeit und Verweilzeit, reduzierte jedoch die mechanische Zellbelastung nur teilweise. Letztlich erwies sich die kontinuierliche Zentrifugation als die effizienteste und zugleich schonendste Methode zur Biomasseabtrennung. Die eingesetzte Tellerzentrifuge erreichte Konzentrationsfaktoren von bis zu 24, ohne die charakteristische spiralförmige Zellstruktur von *A. platensis* zu beschädigen. Ergänzende Waschschr itte ermöglichten zudem die Entfernung membrangebundener EPS, wodurch die nachfolgende PEF-Behandlung optimiert werden konnte.

EPS-Konzentrierung: Für die Konzentrierung der EPS wurden Hohlfaser- und dynamischer Querstromfiltration untersucht. Die Hohlfaserfiltration zeigte eine quasi-lineare Beziehung zwischen Transmembrandruck (TMP) und Permeatfluss bis zu einem TMP von 1,5 bar. Oberhalb dieses Druckbereichs führte Fouling zu einer deutlichen Reduktion des Permeatflusses, wodurch ein stabiler Prozesspunkt bei 80 L/m²/h definiert wurde. Die dynamische Querstromfiltration erwies sich hingegen als flexibleres Verfahren. Bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 25 Hz und TMP-Werten zwischen 1,0 und 1,7 bar konnten Permeatflüsse von bis zu 120 L/m²/h erzielt werden, ohne dass Fouling auftrat. Die Analyse der Fluxdynamik zeigte, dass die Abnahme des Permeatflusses nicht durch Fouling, sondern durch die zunehmende Viskosität der Lösung verursacht wurde.

Arbeitspaket 6: Untersuchung und Nutzung der Extrakte

Die Studie untersuchte die Farbstabilität von Phycocyanin (PC) in Alginat-Gelen unter verschiedenen Umweltbedingungen, um die Eignung als Lebensmittelfarbstoff zu bewerten. Die Ergebnisse zeigten, dass Lichteinwirkung die größte Degradation verursachte, mit einem Verlust der Farbintensität von über 50 % innerhalb von vier Tagen. Temperaturen zwischen 5 °C und 25 °C sowie unterschiedliche Luftfeuchtigkeitsbedingungen hatten einen geringeren Einfluss, wobei bei 37 °C die Gele schmolzen. Die Verwendung von Phosphatpuffer (pH 7) erhöhte die Stabilität von PC im Vergleich zu Reinstwasser oder Calciumchlorid-Lösungen.

Arbeitspaket 7: EPS Untersuchungen (OTH-AW Unterauftrag Anhang 2)

Das AP 7 ist im Unterauftrag von der Firma ABK durchgeführt worden. An der Forschungsstelle OTH-AW sind für die Fischversuche die EPS hergestellt worden.

Arbeitspaket 8: Freilandbetrieb Technikumsanlage

Auf Basis der Ergebnisse aus AP1 wurde ein vertikaler Röhrenreaktor mit Airlift-Prinzip entwickelt, an der OTH-AW konstruiert und umfassend charakterisiert.

Technische Charakterisierung: Die Strömungsgeschwindigkeit war bis zu einer Begasungsrate von 0,3 vvm annähernd linear mit dem Gashold-up korreliert und blieb im laminaren Bereich. Die Mischzeit stabilisierte sich bei hohen Begasungsraten auf 150 Sekunden. Der volumetrische Stoffübergangskoeffizient kLa zeigte eine lineare Abhängigkeit von der Begasungsrate und erreichte 30 h⁻¹ für Sauerstoff (entspricht 23,6 h⁻¹ für CO₂). Diese Werte sind ausreichend für das erwartete Wachstum und vergleichbar mit anderen Airlift-Systemen.

Biologische Charakterisierung: Erste Kultivierungen unter kontinuierlicher Beleuchtung (79 μmol m⁻² s⁻¹) erreichten maximale Biomassekonzentrationen von 1 g L⁻¹. Typisch für phototrophe Organismen wurde kein exponentielles Wachstum beobachtet, was durch lichtlimitiertes Wachstum infolge von Selbst-Verschattung erklärt werden kann. Die Ergebnisse zeigten eine gute Übereinstimmung mit einem aus AP1 abgeleiteten Wachstumsmodell (RSS < 0,3), was den erfolgreichen Maßstabtransfer bestätigte.

Vergleiche von frischem und recyceltem Medium ergaben keine Unterschiede im Wachstum. Die spezifische Phycocyanin-Konzentration lag bei 120 mg g⁻¹ und übertraf die Labordaten leicht. Die EPS-Produktion erreichte mit frischem Medium 0,04 g L⁻¹, mit recyceltem Medium jedoch >0,1 g L⁻¹, was auf eine zu frühe Ernte bei frischem Medium zurückzuführen sein könnte.

Langzeitkultivierungen: Mehrere Langzeitkultivierungen (bis zu 160 Tage) verliefen stabil, ohne Biofouling oder Kontaminationen. Eine 90-tägige Tageslichtkultivierung (16:8 Tag-Nacht-Zyklus) zeigte, dass ein 3-Tage-Erntezyklus mit einer Biomassekonzentration von 1,3 g L⁻¹ die höchste Phycocyanin-Produktivität (1,28 g L⁻¹ Tag⁻¹) lieferte. Für EPS wurde die höchste Produktivität (0,25 g L⁻¹ Tag⁻¹) bei 2–3-Tage-Erntezyklen erzielt. Diese Ergebnisse bestätigen die Bedeutung der Erntezyklen für die Prozessoptimierung.

Arbeitspaket 9: Bilanzierung und Bewertung der Wertschöpfungskette

Die Bilanzierung und Bewertung der Wertschöpfungskette im Rahmen des Projekts erfolgte gemäß der Normenreihe ISO 14000 mithilfe der Open-Source-Software OpenLCA (Version 1.11). Die Life Cycle Assessment (LCA)-Modellierung wurde unter Berücksichtigung der ISO 14044:2006-Richtlinien durchgeführt. Ziel war es, die Umweltauswirkungen der Prozessentwicklung umfassend zu bewerten und die Auswirkungen unterschiedlicher Erntezyklen sowie Betriebsbedingungen auf die Wertschöpfungskaskade zu analysieren.

Zwei Szenarien wurden modelliert: ein Repeated-Batch-Prozess (Szenario I) mit einem Erntevolumen von 20 L und ein klassischer Batchprozess (Szenario II) mit 70 L Erntevolumen. Beide Szenarien wurden unter zwei Lichtintensitäten – „Low (lo)“ mit 100 μmol m⁻² s⁻¹ und „High (lo)“ mit 450 μmol m⁻² s⁻¹ – untersucht. Die Systemgrenzen umfassten die Kultivierung sowie das Downstream-Processing der Hochwertprodukte EPS und Phycocyanin (PC). Für die Bewertung wurde angenommen, dass die Prozesse über ein Jahr konstant betrieben werden, wobei die Material- und Energiebilanzen auf den generierten Projektdaten basierten. Zur Analyse wurden die European Reference Life Cycle Database (ELCD) und die Ecoinvent-Datenbank verwendet.

Die Umweltbewertung erfolgte anhand verschiedener Ansätze, darunter ReCiPe 2016 Midpoint (H), IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) und Kumulativer Energiebedarf (CEM). Während ReCiPe-Indikatoren wie Wasserverbrauch und Auswirkungen auf aquatische Ökosysteme bewerteten, ermöglichte die IPCC-Methode die Berechnung des Global Warming Potential (GWP) in CO₂-Äquivalenten. Die CEM-Analyse fokussierte sich auf den Verbrauch fossiler und erneuerbarer Ressourcen.

Die Ergebnisse zeigten, dass höhere Lichtintensitäten erwartungsgemäß zu einer gesteigerten Produktivität führten, jedoch auch die Umweltbelastung durch den Energieverbrauch erhöhten. Szenario I (20 L Erntevolumen) erzielte insgesamt eine höhere Energieeffizienz pro produzierter Einheit EPS oder PC. In Szenario II (70 L Erntevolumen) war der absolute Ressourcenverbrauch durch das größere Kulturvolumen jedoch höher. Die Produktionsprozesse für EPS erwiesen sich als bis zu 40-mal energieintensiver als für PC, was vor allem auf die zusätzlichen Schritte zur EPS-Konzentrierung zurückzuführen ist.

Eine detaillierte Sensitivitätsanalyse der Umweltindikatoren ergab, dass bei geringen Lichtintensitäten sowohl die Wasserbelastung als auch die Auswirkungen auf die aquatischen Ökosysteme erheblich zunahmen. Gleichzeitig zeigte sich, dass Repeated-Batch-Prozesse aufgrund des geringeren Energiebedarfs eine umweltfreundlichere Option darstellen könnten. Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz einer sorgfältigen Prozessplanung und -optimierung, insbesondere im Hinblick auf die Licht- und Energieversorgung sowie die Wahl der Prozessführung.

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Basierend auf den Ergebnissen konnte ein effizienter und nachhaltiger Prozess für die Kultivierung von *A. platensis* entwickelt werden, der sich durch hohe Produktivität und Skalierbarkeit auszeichnet. Zylindrische Glasreaktoren mit Wärmetauschern erwiesen sich als optimal. Im Vergleich dazu zeigten Closed Ponds bereits bei höheren Biomassekonzentrationen deutliche Limitierungen und wurden daher ausgeschlossen. Die besten Wachstumsbedingungen wurden bei einer Lichtintensität von 180 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und einer Temperatur von 35 °C erreicht. Self-Shading-Effekte unterstrichen die Bedeutung homogener Lichtverteilung, insbesondere bei kontinuierlicher Beleuchtung.

Die Produktivität war sowohl bei Phycocyanin (PC) mit 105 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ als auch bei Exo-Polysacchariden (EPS) mit $>0,12\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ unter Tageslichtbedingungen besonders hoch, wobei sonnige Tage zu einer erhöhten Gesamtausbeute führten. Für die Ressourceneffizienz wurde ein Medium-Recycling-Verfahren entwickelt, das eine dreifache Wiederverwendung des Kultivierungsmediums ermöglichte, ohne das Wachstum oder die Produktivität negativ zu beeinflussen.

Die Restbiomasse erwies sich als potenzielles Substrat für Biogasanlagen. Der Phycocyanin-Gehalt beeinflusste die Biogasproduktion signifikant: PC-reduzierte Biomasse erreichte bis zu 300 L/kg, während unbehandelte Biomasse nur 100 L/kg lieferte. Für eine 50-kW-Biogasanlage wurde ein wöchentliches Erntevolumen von 500 m³ und ein Gesamtkulturvolumen von 1500 m³ als optimal berechnet, um einen skalennmäßigen Abgleich des entwickelten Prozesses mit einer Biogasanlage zu gewährleisten.

Für die Gewinnung und Konzentrierung von EPS wurden verschiedene Methoden evaluiert. Die Tellerzentrifugation erwies sich als effizienteste Methode zur Biomasseabtrennung, während die dynamische Querstromfiltration durch Flexibilität und hohe Permeatflüsse von bis zu 120 L/m²/h ohne Fouling überzeugte. Die Hohlfaserfiltration erreichte stabile Flüsse bei 80 L/m²/h, zeigte jedoch Einschränkungen bei erhöhtem Fouling.

Für den Technikumsmaßstab bestätigte ein selbst konstruierter vertikaler Röhrenreaktor mit Airlift-Prinzip seine Eignung für die Kultivierung. Der volumetrische Stoffübergangskoeffizient k_La von 30 h⁻¹ für Sauerstoff, entsprechend 23,6 h⁻¹ für CO₂, war ausreichend für ein stabiles Wachstum. Erste Ergebnisse zeigten maximale Biomassekonzentrationen von 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, während Phycocyanin (120 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) und EPS ($>0,1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) die Werte aus dem Labormaßstab leicht übertrafen. Langzeitkultivierungen von bis zu 160 Tagen verliefen stabil und erreichten bei einem 3-Tage-Erntezyklus und einer Zielbiomasse von 1,3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ die höchste Phycocyanin-Produktivität von 1,28 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Für EPS wurde die höchste Produktivität von 0,25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ bei Erntezyklen von zwei bis drei Tagen erzielt.

Die Umweltbewertung zeigte, dass höhere Lichtintensitäten zwar die Produktivität steigerten, jedoch auch den Energieverbrauch und die Umweltbelastung erhöhten. Szenarien mit kleineren Erntevolumina (20 L) waren energieeffizienter, während größere Volumina (70 L) mehr Ressourcen erforderten. Die EPS-Produktion war bis zu 40-mal energieintensiver als die von PC. Repeated-Batch-Prozesse erwiesen sich aufgrund ihres geringeren Energiebedarfs als umweltfreundlichste Option. Diese Ergebnisse bilden eine solide Grundlage für die industrielle Umsetzung effizienter und nachhaltiger Bioprozesse.

Teilvorhaben 2: Downstreamprozesse

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Das Teilvorhaben zielt darauf ab, innovative Verfahren zur Verwertung Biomasse von *A. platensis* zu entwickeln und in die Praxis umzusetzen. Im Mittelpunkt steht die Entwicklung einer Downstream-Kaskade, die es ermöglicht, zwei hochwertige Wertprodukte, nämlich antiviral wirksame extrazelluläre Substanzen (EPS) und Phycocyanin, effizient zu gewinnen. Ein zentraler Bestandteil des Projekts ist die Entwicklung eines Prognosetools, das mithilfe vorhergesagter Wetterbedingungen adaptive Empfehlungen zur optimalen Erntemenge und den besten Erntezeitpunkten während der Kultivierung liefert. Darüber hinaus erfolgt eine umfassende Charakterisierung der gewonnenen Wertstoffe, um deren Eigenschaften und potenzielle Einsatzmöglichkeiten zu analysieren. Ein weiterer Schwerpunkt liegt in der Skalierung der entwickelten Downstream-Prozesse vom Labormaßstab in den Technikumsmaßstab, um die industrielle Anwendbarkeit der Verfahren sicherzustellen.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

Arbeitspaket 2: Adaptives Prozessmodell

Das Arbeitspaket 2 widmete sich der Entwicklung eines adaptiven Prozessmodells zur Vorhersage des Biomassewachstums auf Basis der Wettervorhersage. Dies ermöglicht die Kontrolle des Prozesses unter Outdoorbedingungen und trägt somit wesentlich zur Implementierung vorhersagbarer und sicherer Prozesse zur Herstellung von Lebensmitteln bei.

Prozesssimulation von Photobioreaktoren: Zunächst wurden mechanistische Wachstumsmodelle für *A. platensis* aus der Literatur implementiert, um die Entwicklung der Biomasse- und Phycocyaninkonzentration in Abhängigkeit von Nitratgehalt, Lichtintensität und Temperatur zu simulieren. Wetterdaten des Deutschen Wetterdienstes wurden genutzt, um realistische Temperatur- und Helligkeitsverläufe innerhalb eines Jahres zu modellieren. Die Globalstrahlung wurde in photosynthetisch aktive Strahlung (PAR) umgerechnet.

Kalibrierung eines bestehenden mechanistischen Modells und Erzeugung artifizierlicher Trainingsdaten: Zur Entwicklung eines adaptiven Prozessmodells wurden verschiedene plausible Kalibrierungen der mechanistischen Modelle erstellt, um unterschiedliche Prozessvarianten abzubilden. Wetterdaten ermöglichten die Simulation von Wachstumskurven für unterschiedliche Wetterverhältnisse. Diese Daten dienten dem Training künstlicher neuronaler Netze (ANN) und k-nearest neighbors regression (kNN). Die Algorithmen approximierten die Wachstumsrate von *A. platensis* und sagten die Biomassekonzentration zeitkontinuierlich voraus.

Validierung des trainierten KNN im Laborversuch: Die Qualität der adaptiven Prozessmodelle wurde zunächst *in silico* validiert. Dabei wurden Modelle mit artifizierlichen Trainingsdaten trainiert und die Prognosequalität für Folgetage überprüft. Zusätzlich erfolgte ein Test an Wachstumsverläufen mit konstanter Temperatur und wechselnder Beleuchtung. Die Modelle erreichten nach einigen Trainingstagen eine Biomasse-Prognosegenauigkeit mit einem Vorhersagefehler von 10-20%.

Erweiterung des KNN mit einem Optimierungsalgorithmus und Validierung der Prognose: Die Optimierung von Bioprozessen unter Freilandbedingungen ist komplex. Zur Maximierung der Produktivität wurde ein modellbasiertes Reinforcement Learning (RL) getestet, das Prognosemodelle und Steuerungsoptimierung kombiniert. Erste Tests zeigten, dass RL-Agenten nach einer Lernphase Prozesse effizient steuern können. Training *in silico* ist unerlässlich, um Kosten und Fehlsteuerungen zu vermeiden.

Test des KNN Modells an verschiedenen Reaktortypen: Die Übertragbarkeit zwischen verschiedenen Prozessvarianten wurde *in silico* durch Veränderung der Parametrisierung der mechanistischen Modelle getestet. RL-Agenten zeigten die Fähigkeit, sich schnell an neue Reaktorgeometrien anzupassen, sofern ausreichend Gemeinsamkeiten zwischen dem vortrainierten RL und dem neuen Prozess bestehen.

Arbeitspaket 5: Zellaufschluss und Wertstoffextraktion

Ziel des Arbeitspaketes ist es, einen effizienten Zellaufschluss zur Extraktion von Phycocyanin mittels der PEF-Technologie (gepulste elektrische Felder) zu entwickeln. Dabei sollen die relevanten Prozessparameter wie elektrische Feldstärke, Pulsweite, Frequenz sowie Leitfähigkeit der Zellsuspension systematisch im Küvettenmaßstab untersucht und optimiert werden. Mit Hilfe von CFD-Simulationen wird das Design der Behandlungszelle für einen kontinuierlichen Prozess analysiert, um eine optimale Prozessauslegung für den Zellaufschluss sicherzustellen. Parallel dazu erfolgt die Übertragung der Ergebnisse aus den Küvettenversuchen auf den Technikumsmaßstab. Zusätzlich erfolgen vergleichende Untersuchungen mit anderen Zellaufschlussverfahren (Hochleistungsschall u.a.) um PEF hinsichtlich der Energieeffizienz und der Reinheit der erhaltenen Extrakte zu bewerten.

Optimale Prozessparameter: Zur Ermittlung der optimalen Behandlungsparameter für die *Arthrospira platensis* Zellen wurde zunächst ein Färbeprotokoll entwickelt, um den Permeabilisierungsgrad der

Zellmembran zu bestimmen. Es zeigte sich eine starke Wechselwirkung zwischen der Behandlungstemperatur und der angewandten Feldstärke. Während bei einer Behandlungstemperatur von 30°C mindestens 15 kV/cm notwendig waren um 100% der Zellen zu permeabilisieren waren bei 40°C und 45°C 10 kV/cm ausreichend. Jedoch zeigten die Behandlungen bei niedrigeren Feldstärken größere Schwankungen, was mit unterschieden in der Kultur erklärt werden kann. Eine Behandlung bei 20 kV/cm ist deshalb empfehlenswert. Die Behandlungstemperatur zeigte auch einen großen Einfluss auf die notwendige Behandlungszeit. So Verkürzte sich die Behandlungszeit bei einer Erhöhung der Temperatur auf ca. 50%. Die Wahl der richtigen Behandlungsparameter ist im kontinuierlichen Fall stark von der Konfiguration der Anlage abhängig. Je größer die thermische Belastung (je größer die Verweilzeit), desto niedriger sollte die Behandlungstemperatur gewählt werden, um thermische Schäden am Phycocyanin zu vermeiden. Die Versuche zeigten, dass zur Permeabilisierung von der gesamten Zellkultur ein Energieeintrag von 25- 50 kJ/kg notwendig waren. Spätere Versuche zeigten jedoch, dass dies nicht zwangsweise zu einer vollständigen Freisetzung des Phycocyanins führte bzw. dass die Ergebnisse starken Schwankungen unterlagen. Deshalb wurden spezifische Energieeinträge von 100 kJ/kg als vorteilhaft eingestuft, da dies verlässlich zu einer vollständigen Freisetzung des Phycocyanins führte. Zusammengefasst sollte *A. platensis* bei 20 kV/cm, 100 kJ/kg und einer Behandlungstemperatur von möglichst 40°C behandelt werden. Die Versuche zeigten auch, dass viele Pulse mit kurzer Pulsbreite (130 Pulse, Pulsbreite 3-5µs) vorteilhaft gegenüber wenigen Pulsen mit langer Pulsbreite (20 Pulse mit 20 µs Breite).

Aufschluss in kontinuierlicher Technikumsanlage: Die Ergebnisse aus dem vorigen Teil konnten erfolgreich auf eine kontinuierliche Anlage im Technikum (HVP 5, Elea GmbH, Germany) übertragen werden. Dazu wurde eine Behandlungskammer mit rechteckiger Elektrodenkonfiguration, zwei Behandlungszonen und einem Plattenabstand von 7 mm verwendet. Es erwiesen sich Feldstärken von 20 kV/cm und ein spezifischer Energieeintrag von 100 kJ/kg als vorteilhaft. Die Pulsbreite wurde in diesen Versuchen auf 20 µs bei einer Frequenz von 65 Hz und einem Massenstrom von 33 kg/h festgelegt. Eine kürzere Pulsbreite war aufgrund von Einschränkungen der Anlage nicht umsetzbar. Eine weitere Erhöhung des spezifischen Energieeintrags auf 125 kJ/kg hatte eine Verschlechterung der Phycocyaninausbeute zur Folge. Dies kann mit der hohen thermischen Belastung erklärt werden.

Einfluss der Extraktionsbedingungen: Die in diesem Arbeitspaket durchgeführten Experimente zeigten, dass eine Extraktion bei 30°C am besten funktioniert. Zwar läuft die Extraktion bei höheren Temperaturen schneller, es zeigen sich allerdings auch verstärkt Verunreinigungen mit Chlorophyll, was eine weitere Aufreinigung der Extrakte bedeutet. Die Versuche zeigten außerdem, dass die Zugabe von ¼ unverdünntem Natrium-Phosphat Puffer (0,1M, pH7) den Extraktionserfolg bei Biomassen > 5 g/l verbessern. Die Extraktionsdauer war je nach Kultivierungsbedingung stark verschieden. Wurden die Zellen in Erlenmeyerkolben oder der Blasensäule kultiviert, waren 4 Stunden ausreichend. Bei Zellen aus dem Röhrenreaktor waren bis zu 6 Stunden Extraktionszeit notwendig. Die systematische Erforschung des Mechanismus zu diesem Phänomen ging über das Ziel dieses Projektes hinaus, sollte aber in Zukunft weiter erforscht werden.

Einfluss der Kultivierungsbedingungen: Ein Ziel des Projektes war es, die Medienkomposition so anzupassen, dass die Leitfähigkeit des Mediums eine direkte Behandlung der Zellen mit PEF im Kulturmedium möglich ist. In Standardmedien ist dies aufgrund der hohen Leitfähigkeiten und den daraus resultierenden hohen elektrischen Strömen nicht möglich, wodurch das Downstreamverfahren erschwert wird. Dafür wurden Kultivierungsmedien mit reduziertem Carbonatgehalt erstellt (5%, 20%, 50% und 100% des Carbonatgehalts vom SOT-Medium). Die Versuche zeigten, dass es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Wachstums, des Phycocyaningehaltes und dem EPS-Gehalt gab, sofern der pH-Wert während der Kultivierung mittels CO₂ kontrolliert wird. PEF-Versuche zeigten außerdem, dass sich die Zellen, die in dem 5% und 20%-SOT Medium kultiviert wurden mit einem geringeren spezifischen Energieeintrag (75 kJ/kg bei 20 kV/cm) aufschließen lassen. Dieser Effekt war nach 7 Tagen Kultivierung stärker als nach 14 Tagen. Insgesamt war nach 14 Tagen die Ausbeute schlechter. Die Ergebnisse zeigen, dass der Upstream- und der Kultivierungsprozess bei der Planung eines geeigneten Downstreamverfahrens mit PEF berücksichtigt werden müssen, da diese einen großen Einfluss auf das Ergebnis haben. Die Ergebnisse zeigen aber auch das große Potential des Ansatzes. Durch die Reduzierung des Salzgehaltes können nicht nur die Zellen direkt in dem Behandlungsmedium kultiviert werden (Leitfähigkeit von 4-7 mS/cm), es können auch signifikante Mengen an Salz eingespart werden, wodurch der Gesamtprozess nachhaltiger wird.

Untersuchungen zur Übertragbarkeit von Prozessparametern mittels CFD-Simulationen: Um die Übertragbarkeit der Prozessparameter (mittlere elektrische Feldstärke, spezifischer Energieeintrag, Inhomogenität des elektrischen Feldes) auf andere Prozessmaßstäbe zu untersuchen wurden CFD-Simulationen des PEF-Prozesses für Behandlungskammern mit unterschiedlicher Größe und Isolatorgeometrie durchgeführt. Auf Basis der Transportgleichungen wurden dimensionslose Kennzahlen hergeleitet, die zur Beschreibung der Prozessgrößen verwendet wurden. Es zeigte sich, dass sich unter Berücksichtigung der Abmaße der Isolatoren und deren Volumen einfache Zusammenhänge zwischen den dimensionslosen Kennzahlen und den genannten Prozessgrößen herleiten lassen. Diese können mit einfachen quadratischen oder Power-Law Modellen beschrieben werden. Diese Ergebnisse bilden eine Grundlage bei der Übertragung von Prozessen aus dem Labor- in den vorindustriellen Maßstab.

Vergleichende Untersuchungen zum Zellaufschluss mit anderen Aufschlussverfahren: Zum Vergleich von PEF mit anderen Aufschlussverfahren wurden weiterhin Versuche mit Hochleistungsschall, Hochdruckhomogenisator und Sprühtrockner durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch die Zugabe von CaCl_2 die Freisetzung von Chlorophyll bei der kontinuierlichen Ultraschall- und Hochdruckhomogenisatorbehandlung verhindern lässt. Allerdings müsste dies im Falle einer industriellen Anwendung wieder aus dem Extrakt entfernt werden. Die vergleichenden Verfahren konnten bei vergleichbarem Energieeintrag (100-200 kJ/kg) eine vergleichbare Ausbeute (90-100%) erzielen. Eine Ausnahme bildete die Sprühtrocknung welche einen deutlich höheren spezifischen Energieeintrag hatte (13900 kJ/kg). Inwieweit sich die erhaltenen Extrakte hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Qualität unterscheiden wurde in AP6 untersucht.

Arbeitspaket 6: Produktcharakterisierung

Die in AP5 mit Ultraschall, PEF, Hochdruckhomogenisation und Sprühtrocknung mit anschließender wässriger Extraktion hergestellten Extrakte (vgl. AP5, Abschnitt „Kontinuierliche PEF-Behandlung und vergleichende Untersuchungen mit anderen Verfahren“) wurden im Rahmen von diesem Arbeitspaket auf Ihre qualitativen Eigenschaften und deren Eigenschaften als funktionelle Lebensmittel untersucht. Dafür wurde neben dem Phycocyaninertrag und der Reinheit, der Gehalt an Polyphenolen und die antioxidative Kapazität untersucht. Um Einflüsse der Aufschlussverfahren auf die Proteinstruktur zu untersuchen, wurden außerdem die Sekundärstrukturen der Proteine mit FTIR-Spektroskopie untersucht. Die Zusammensetzung der Extrakte wurde mit SDS-Page analysiert. Eine Ultraschallbehandlung im Batch-Verfahren ohne die Zugabe von CaCl_2 diente als Vergleich (Referenzmethode).

Phenolgehalt und antioxidative Kapazität: Keine der getesteten Methoden erreichte den Gesamtpolyphenolgehalt der Referenzmethode. Die Methoden Sprühtrocknung (SD), Hochdruckhomogenisierung (HPH) und gepulste elektrische Felder (PEF) erzielten etwa 60 %, während Ultraschallbehandlungen (US) nur 45 % erreichten. Bei der antioxidativen Kapazität übertrafen SD und PEF die Referenzmethode, während US und HPH diese nicht erreichten. Die hohe antioxidative Kapazität der SD- und PEF-Proben könnte auf geringere thermische Belastungen zurückzuführen sein. Dies zeigt, dass PEF-Proben gegenüber den anderen Verfahren einen gesundheitlichen Mehrwert haben können.

Molekulargewicht und Proteine

Die SDS-Page-Analyse zeigte homogene Verteilungen der Molekulargewichte über alle Proben hinweg. Auffällig war, dass Ultraschallextrakte schwächere oder fehlende Banden im Bereich von 25-37 kDa aufwiesen, was mit einer geringeren Freisetzung von Molekülen in Zusammenhang stehen könnte. Die Referenzproben zeigten intensivere Banden, insbesondere bei größeren Molekülen, was auf eine größere Vielfalt von Molekülen hinweist.

Sekundärstrukturen der Proteine

Die Analyse des Amidband I zeigte, dass sich random coils hauptsächlich in HPH- und US-Extrakten bildeten, während alpha-helices bei diesen Methoden nicht nachweisbar waren. Diese Strukturänderungen, möglicherweise durch thermische Einflüsse verursacht, traten bei PEF- und SD-Proben nicht auf.

Fazit: PEF und Sprühtrocknung sind zur Herstellung von Phycocyaninextrakten mit Lebensmitteleignung den anderen Methoden überlegen. Die Sprühtrocknung hat im Vergleich jedoch einen um Größenordnung höheren Energiebedarf. HPH benötigt den geringsten Energieeintrag, liefert jedoch qualitativ schlechtere Extrakte. PEF-Proben bieten die höchste antioxidative Kapazität und könnten einen hohen gesundheitlichen Mehrwert bieten, was die Wertschöpfung von Phycocyanin aus *Arthrospira platensis* steigert. Die Untersuchung der Sekundärstrukturen ergab zudem, dass bei den US- und HPH-Proben teilweise Umfaltung der Proteine auftraten, was die Stabilität und die technofunktionellen Eigenschaften negativ beeinflussen könnte. Die Arbeiten der OTH-AW zeigten, dass die Stabilität des Phycocyanins durch die Zugabe von CaCl_2 gemindert wird, was ein weitere Vorteil für die PEF-Behandlung ist.

Arbeitspaket 8: Testbetrieb unter Freilandbedingungen

Für den Testbetrieb unter Freilandbedingungen wurden an der TUB Versuche in zwei 120 L Reaktoren durchgeführt um das in AP2 entwickelte Vorhersagemodell auf seine Eignung unter Realbedingungen zu testen. Für einen Reaktor wurde die Erntestrategie mit klassischen Wachstumsmodellen ausgelegt, für den anderen kam das entwickelte Prozessmodell zum Einsatz. Jeden Tag wurde morgens mithilfe des Prognosemodells Erntemenge bestimmt, die laut dem Modell für den Folgetag den größtmöglichen Biomassezuwachs zur Folge hatte. Das entsprechende Volumen wurde dann geerntet. Der andere Reaktor wurde immer dann geerntet, wenn die Biomasse bei der morgendlichen Messung 0.8 g/L überschritten hat. Es wurden dann jeweils exakt 32 L geerntet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Produktivität in dem Reaktor, welcher mit dem adaptiven Prozessmodell gefahren wurde, über die gesamte Kultivierungsdauer höher war als in dem Vergleichsreaktor. Dies zeigt, dass das gewählte Verfahren den Ertrag erhöhen kann, wenn die aktuellen Wetterdaten zur Wachstumsvorhersage genutzt werden. Außerdem konnte bewiesen werden, dass sich das Vorhersagemodell auf Outdoorbedingungen übertragen lässt. Untersuchungen zum

Phycocyaningehalt und EPS-Gehalt zeigten keine Unterschiede zwischen den beiden gewählten Prozessführungen. Zur Absicherung der Ergebnisse sollten Vorhersagemodelle zukünftig um die Abhängigkeit der Wertstoffprodukte von den Wetterbedingungen erweitert werden.

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Das Teilvorhaben zielte auf die Entwicklung innovativer Verfahren zur Gewinnung von Phycocyanin und antiviral wirksamen extrazellulären Substanzen (EPS) aus *Arthrospira platensis* ab. Wesentliche Ergebnisse wurden in mehreren Arbeitspaketen erzielt:

Adaptives Prozessmodell: Ein Prognosetool, basierend auf Wetterdaten, ermöglichte eine präzise Vorhersage des Biomassewachstums und eine optimierte Erntesteuerung. Das Modell wurde erfolgreich in Freilandtests validiert und zeigte eine höhere Produktivität gegenüber klassischen Verfahren. Die Kombination mit Reinforcement Learning (RL) verbesserte die Steuerungsprozesse und Effizienz weiter.

Zellaufschluss und Wertstoffextraktion: Die PEF-Technologie (gepulste elektrische Felder) erwies sich als besonders effizient. Optimale Parameter (20 kV/cm, 100 kJ/kg, 40 °C) führten zu einer vollständigen Freisetzung von Phycocyanin. Im Technikumsmaßstab wurde die industrielle Anwendbarkeit bestätigt, wobei PEF hinsichtlich Energieeffizienz und Produktqualität traditionellen Verfahren überlegen ist. Die Extraktion sollte unter Zugabe von $\frac{1}{4}$ Natrium-Phosphatpuffer bei 30°C erfolgen. Die Dauer kann, je nach Kultivierungsbedingungen, zwischen 4 und 6 Stunden variieren.

Kultivierungsbedingungen: Angepasste Medien mit reduziertem Salzgehalt verbesserten die Downstream-Prozesse und reduzierten den Ressourcenverbrauch, was die Nachhaltigkeit des Gesamtprozesses erhöhte. Dies ermöglicht die PEF-Behandlung im Kultivierungsmedium, wodurch der komplette Austausch vor der PEF-Behandlung vermieden wird.

Produktcharakterisierung: PEF-Extrakte zeigten eine hohe antioxidative Kapazität und einen geringen Einfluss des Zellaufschlusses auf die Proteinstruktur, die sie besonders für funktionelle Lebensmittel geeignet machen. Im Vergleich zu anderen Methoden bot PEF die höchste Qualität und einen hohen gesundheitlichen Mehrwert.

Das Projekt zeigt, dass die skalierbare, nachhaltige Produktion von Phycocyanin und EPS möglich ist, und legt somit die Grundlage für industrielle Anwendungen.