

Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Futterergänzungsmittel auf Basis von Mikroalgen, wirtschaftliche Ganzjahresproduktion durch Kopplung an flexibilisierten Biomasse-Konversionsanlagen und Nutzung des Regelenergiemarktes – Power2Feed

Zuwendungsempfänger:

Teilvorhaben 1: Subitec GmbH

Teilvorhaben 2+3: Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V.

Teilvorhaben 4: Verein zur Förderung des Technologietransfers an der Hochschule Bremerhaven e. V.

Förderkennzeichen:

Teilvorhaben 1: 22017418

Teilvorhaben 2+3: 2219NR375

Teilvorhaben 4: 2219NR377

Laufzeit: 1.07.2020 bis 30.06.2023

Monat der Erstellung: 12/2023

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

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

Inhaltsverzeichnis

I.	Kurzbericht	1
	1. Aufgabenstellung	1
	2. Planung und Ablauf des Vorhabens	1
	3. Resümee der wesentlichen Ergebnisse.....	2
	a) Arbeitspakete und Meilensteine	2
	b) Zusammenfassung	6
II.	Ausführliche Darstellung der Ergebnisse	7
	1. Erzielte Ergebnisse	7
	Arbeitspaket 1: Prozessentwicklung	7
	AP1.1: Kultivierung ω -3 fettsäure-haltiger Algen für Futterergänzungsmittel	8
	AP1.1.1: Prozessoptimierung - Vergleich ein- und zweiseitiger Beleuchtung	8
	AP1.1.2: Flüssiggärrest einer landwirtschaftlichen Biogasanlage als Mediumsbestandteil	12
	AP1.1.3: Kultivierung Carotinoid-haltiger Algen für Futterergänzungsmittel	14
	AP1.2: Entwicklung künstlicher Beleuchtungskonzepte	15
	AP1.2.1: Entwicklung künstlicher Beleuchtungskonzepte für carotinoid-haltige Algen	15
	AP1.2.2: Neues Beleuchtungskonzept für den Demonstrator	22
	AP 1.3 Entwicklung Automatisierungskonzept für den Demonstrator	22
	Arbeitspaket 2: Skalierung	23
	AP2.1 und AP2.3: Übertragung und Charakterisierung im Pilotmaßstab und Demolauf.....	23
	AP2.4: Durchführbarkeitsstudie	26
	Arbeitspaket 3: Produktformulierung.....	29
	AP 3.1: Vorbehandlung Biomasse	29
	AP3.1.1: Orientierende Aufschlussversuche bzw. Extrusionsversuche mit Spirulina	30
	AP3.1.2: Aufschlussversuche mittels „Hydrogrind-Verfahren“ und Extrusionsverfahren von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	33
	AP 3.2: Pelletierung im Extruder	39
	AP3.2.1 Verwendetes Pelletierungsequipment.....	39
	AP3.2.2: Herstellung eines Forellenfutters mit <i>Haematococcus</i>	40
	AP3.2.3: Herstellung von Pellets zur Ermittlung des Einflusses eines Extrusions- und Trocknungsprozesses auf aufgeschlossene <i>Haematococcus</i> -Zellen.....	42
	AP3.3: Analytischer Nachweis der Bioverfügbarkeit von Futterpellets mit Astaxanthin- haltiger <i>Haematococcus</i> -Biomasse	46
	AP3.4: Produktcharakterisierung	51
	Arbeitspaket 4: Projektkoordination	53
	2. Verwertung	54
	a) Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen.....	54
	b) .. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende	54
	c) .. Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende	54
	d) .. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit	55
	3. Erkenntnisse von Dritten	55
	4. Veröffentlichungen	55

ANHANG	56
Teilvorhaben 1: Subitec GmbH	56
1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens	56
2. Bearbeitete Arbeitspakete.....	56
Arbeitspaket 1:Prozessentwicklung: Entwicklung künstlicher Beleuchtungskonzepte.....	56
Arbeitspaket 2.2: Skalierung – Produktion relevanter Biomassemengen für Pelletierung	Fehler!
Textmarke nicht definiert.	
Arbeitspaket 2.4: Durchführbarkeitsstudie	56
3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens 1	56
Teilvorhaben 2 und 3: Fraunhofer IGB	58
1. Ziel und Gegenstand der Teilvorhaben.....	58
2. Bearbeitete Arbeitspakete.....	58
Arbeitspaket 1: Prozessentwicklung, neue Beleuchtungs- und Automatisierungskonzepte	58
Arbeitspaket 2: Skalierung –Übertragung und Charakterisierung des Wachstums	58
in den Pilotmaßstab	58
Arbeitspaket 3: Produktformulierung - Analytischer Nachweis der Bioverfügbarkeit	58
3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens 2 und 3.....	58
Teilvorhaben 4: TTZ Bremerhaven	60
1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens 4	60
2. Bearbeitete Arbeitspakete.....	60
Arbeitspaket 3.1: Vorbehandlung Biomasse / Pre-Processing	60
Arbeitspaket 3.2: Pelletierung durch Extrusion	60
Arbeitspaket 3.4: Produktcharakterisierung	61
3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens	61

I. Kurzbericht

1. Aufgabenstellung

Ziel des Vorhabens war die Erzeugung von **carotinoid- und fettsäurereicher Algenbiomasse** in geschlossenen Photobioreaktoren unter Nutzung von **Kunstlicht für die Produktion von hochwertigen Futterergänzungsmitteln**. Carotinoide und Omega-3-Fettsäuren der Mikroalgen sollen dabei die Verwendung von sogenannten *Microingredients*, also Bestandteilen welche in Futtermitteln nur in geringen Mengen Anwendung finden, ersetzen. Die Wirtschaftlichkeit der Wertschöpfungskette wird hierbei durch zwei innovative technische Ansätze erreicht: Zum einen die Entwicklung eines idealen Lichtregimes, das durch den **Einsatz modernster LED-Technologie** erfolgen sollte, durch deren Anwendung sollten die Biomasseproduktivität erhöht werden, bei gleichzeitig hoher Lichtausbeute um die Stromkosten im wirtschaftlichen Bereich zu halten. Ein weiterer Fokus lag auf den **Downstream- und Formulierungstechniken, die auf die Trocknung der Algenbiomasse verzichten** und möglichst ohne zwischengeschaltetes Aufschlussverfahren die Bioverfügbarkeit der gewünschten Algeninhaltsstoffe allein durch Pelletierung der Futtermittel sicherstellen. Dies sollte wiederum die Kosten senken.

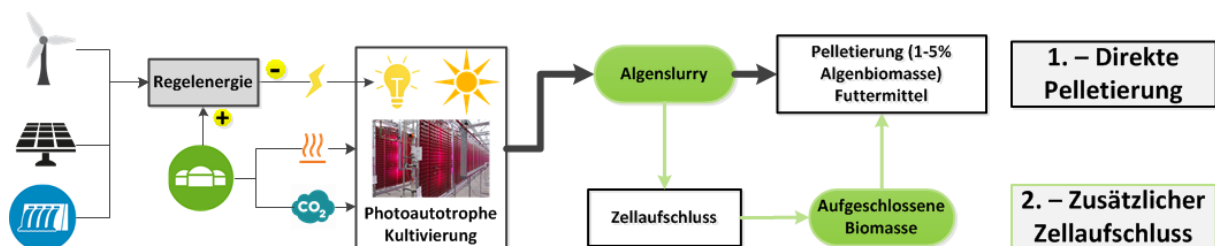


Abbildung 1: Fließschema der Produktion von Futtermitteln unter Verwendung von Mikroalgenbiomasse. Durch den innovativen Einsatz von LED-Technik können Kosten und hier insbesondere die Stromkosten signifikant reduziert werden.

2. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt war in drei Arbeitspakete unterteilt, der Prozessentwicklung mit dem Fokus auf die Entwicklung künstlicher Beleuchtungssysteme für Algenprozesse, einem Arbeitspaket zur Skalierung der Prozesse in den Pilotmaßstab mit Demolauf, und in AP3 sollte das Produkt Futtermittel für die Aquakultur formuliert und die Bioverfügbarkeit nachgewiesen werden.

Für die Charakterisierung des Produktes in AP3.4 konnte die Firma AllerAqua GmbH gewonnen werden. Diese setzte das erste entwickelte Produkt in der Fischzucht ein.

Arbeitspakete (AP) (lt. Planung im Antrag)	Bearbeitungszeit- raum (lt. Balkenplan in Tabelle 1)	Zielerreichung
		<p>Beleuchtungskonzept definiert und auf Zielerreichung hin geprüft.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mit dem Stamm <i>Phaeodactylum</i> wurde eine Prozessoptimierung hinsichtlich des Einflusses der Photonenfluxdichte auf die Reaktoroberfläche bei ein- und zweiseitiger Beleuchtung durchgeführt. - Mit zweiseitiger Beleuchtung konnte bei gleichem Energiebedarf die Biomasseproduktivität verdoppelt werden bei höherer Effizienz der Konversion der Lichtmenge in Biomasse (Lichtausbeute). - Abschließende Bewertung der industriellen Machbarkeit unter Berücksichtigung von Anschaffungskosten, Industrialisierungspotenzial, Langlebigkeit und eventuell damit verbundenen Kosten (Personal und Material).
AP 1.2 Entwicklung LED- Beleuchtungskonzepte	07/2020 bis 09/2021	<p>Für den Haematococcus-Prozess wurden die zu verwendenden LED-Paneele aus den verfügbaren ausgewählt und charakterisiert im Haematococcus-Prozess.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Das Fraunhofer IGB hat für die Skalierung der Prozesse (AP2.1 und AP2.2) die Anforderungen an die LED-Paneele spezifiziert, Prototypen wurden gefertigt und ausgewählte Paneele wurden physiologisch charakterisiert. - Insbesondere die Effizienz der neuen LEDs reduziert den Strombedarf nochmals
AP 1.3 Entwicklung Automatisierungskonzept	07/2021 bis 06/2022	<p>Ein bereits entwickeltes Automatisierungskonzept wurde um mehrere Sensorkomponenten erweitert und auf den Demonstrator übertragen. Im Demolauf in AP 2.3 wurde das Automatisierungskonzept überprüft.</p>
AP 1.4 Entwicklung Prozessmodell Regelenergie	01/2022 bis 01/2022	<p>Konzepte zur Einbindung von Regelenergie wurden diskutiert. Mit der Neuausrichtung stand nicht mehr die Regelenergie im Vordergrund, sondern die Entwicklung eines effizienten Beleuchtungssystems.</p>
AP2 Skalierung		
AP2.1 Übertragung und Charakterisierung im Pilotmaßstab	01/2021 bis 06/2022	<p>Als Demonstrator wurde ein kompaktes FPA-Reaktormodul bestehend aus 5 FPA-Paneelen mit je 30L Reaktorvolumen aufgebaut. Die Reaktormodule sind miteinander verbunden und bilden ein gemeinsames Reaktorvolumen. Zwischen den Reaktorpaneelen ist die LED-Beleuchtung beidseitig der Reaktoren angeordnet.</p>
AP2.2 Produktion relevanter Biomasse- mengen für Pelletierung	07/2020 bis 09/2022	<p>Im Berichtszeitraum wurden ausreichend Haematococcus-Biomassechargen geliefert, so dass das tztz Bremerhaven die Versuche zur Produktformulierung durchführen konnte.</p>
AP 2.3 Demolauf mit fiktiver Anbindung an Biogasanlage und Regelenergie	07/2022 bis 01/2022	<p>Ein Demolauf mit dem kompakten FPA-Reaktormodul ist durchgeführt worden um sowohl LED-Beleuchtung als auch Steuerungs- und Automatisierungskonzepte zu testen.</p>
AP2.4 Durchführbarkeits- studie inkl. Wirtschaftlich- keitsbetrachtung und	10/2022 bis 06/2023	<ul style="list-style-type: none"> - Betrachtung der gesamten Wertschöpfungskette in Bezug auf die Frage der diskontinuierlichen Produktion

Arbeitspakete (AP) (lt. Planung im Antrag)	Bearbeitungszeit- raum (lt. Balkenplan in Tabelle 1)	Zielerreichung
Energie- und Stoffstrom- Bilanzierung		<p>sowie des wirtschaftlichen Einsatzes des Produktionsfaktors Strom.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ausführliche wirtschaftliche Bewertung des Ansatzes der Produktion niedriger Astaxanthinkonzentrationen und der damit verbundenen Wirtschaftlichkeit (OPEX), Gegenüberstellung mit hohen Astaxanthinkonzentrationen und Bewertung der damit verbundenen kostenseitigen Anforderungen an den Aufarbeitungsprozess.
AP3 Produktformulierung		
AP 3.1 Vorbehandlung Biomasse	01/2021 bis 12/2022	<ul style="list-style-type: none"> - Aufschlussversuche von <i>Haematococcus</i>-Zellen am ttz Bremerhaven, mittels Extrusion, Nassvermahlung und Hochdruckbehandlung haben gezeigt, dass mittels der im Antrag favorisierten Verfahren kein oder nur ein unzureichender Aufschluss erreicht werden konnte. Deshalb wurde am Fraunhofer IGB, mittels eines speziellen Hochdruck-Homogenisierungsverfahrens <i>Haematococcus</i>-Biomasse aufgeschlossen.
AP 3.2 Pelletierung im Extruder	06/2021 bis 03/2023	<ul style="list-style-type: none"> - Um die wirkenden Kräfte (Druck, Scherung, Temperatur und Reibung) auf das Astaxanthin möglichst repräsentativ abbilden zu können, wurde die getrocknete Algen-Biomasse in eine Trockenmischung, bestehend aus Fischmehl, Weizenmehl und Fisch-Öl eingemischt, welche in der Regel die Hauptkomponenten eines Fischfutters darstellen. Auf weitere Zutaten wie bspw. Soja, Vitamine, Mineralien und Proteinkonzentrate, wurde aus Gründen der Ressourcenschonung verzichtet, da diese nur in geringen Mengen im Fischfutter eingesetzt werden und keinen signifikanten Einfluss auf die oben genannten Extrusionskräfte haben. - Für die Versuche wurde u.a. Futter mit einem Astaxanthingehalt von jeweils 40 ppm, 80 ppm und 120 ppm hergestellt. Die Motivation hierbei war, bei einem möglichen Einfluss des Fischfutter-Herstellungsverfahrens, auf die chemische Beschaffenheit des Astaxanthins, quantitative Abhängigkeiten identifizieren und verstehen zu können.
AP3.3 Analytischer Nachweis der Bioverfügbarkeit	05/2021 bis 06/2023	<ul style="list-style-type: none"> - Analysemethode wurde etabliert, die zwischen nicht-aufgeschlossener und aufgeschlossener <i>Haematococcus</i>-Biomasse differenziert. - Überprüfung der Methode mit unbehandelter <i>Haematococcus</i>-Biomasse - Übertragung der Methode auf Astaxanthin-haltige Futtermittelpellets und Bestimmung des bioverfügbaren Astaxanthins.
AP 3.4 Produkt- charakterisierung	08/2021 bis 06/2023	<ul style="list-style-type: none"> - Der Nachweis des Aufschlusses bzw. der Verfügbarkeit des Astaxanthins sollte direkt am Zielorganismus durchgeführt werden. Die zugrundeliegende Theorie für dieses Vorgehen war, dass eine etwaige Beschädigung der <i>Haematococcus</i>-Zellwand, durch den Extrusionsprozess ausreichend ist, damit der

Arbeitspakete (AP) (lt. Planung im Antrag)	Bearbeitungszeit- raum (lt. Balkenplan in Tabelle 1)	Zielerreichung
		<p>Zielorganismus „Regenbogenforelle“ das Astaxanthin aus der Zelle resorbieren und verstoffwechseln kann.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Die Fütterungs-Versuche wurden kostenneutral von der Firma Aller Aqua durchgeführt. An dieser Stelle möchten wir uns ausdrücklich, für die tatkräftige Unterstützung bedanken! Als Zielorganismus wurden Regenbogenforellen definiert. - Werden die Ergebnisse der Fütterungsversuche mit den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchungen in Bezug auf den Aufschluss ins Verhältnis gesetzt, so ist das Ergebnis als durchaus positiv zu werten. Denn obwohl nur ein kleiner Teil der Haematococcus-Zellen durch die Extrusion zerstört wurde, hat das „Haematococcus-Futter“ im Vergleich zu dem Futter ohne Astaxanthin zu einer Rotfärbung im Filet geführt.
AP4 Projektkoordination	07/2020 bis 06/2023	<ul style="list-style-type: none"> - Durchführung von Projektbesprechungen - Koordination der Absprache zwischen den Projektpartnern nach Bedarf.

Meilensteine (M) (lt. Planung im Antrag)	Fälligkeit (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
M 1 nach 15 Monaten ...	09/2021	<p>Subitec: Prozessentwicklung für den Stamm Haematococcus ist erfolgt und abgeschlossen entsprechend der Meilensteinplanung.</p> <p>Der Abschluss der Prozessentwicklung für den Stamm Phaeodactylum hat sich aufgrund der Corona-Pandemie bis in M20 verzögert (Fraunhofer IGB).</p> <p>Die LED-Panele wurden ausgewählt und getestet.</p> <p>Die Aufgabe des Demonstratorbaus wurde von der Subitec auf das Fraunhofer IGB übertragen. Aufgrund von Pandemie und erheblichen Lieferschwierigkeiten von Komponenten und Dienstleistungen wie Schaltschrankbau wurde der Meilenstein erst nach M34 erreicht.</p>
M 2 nach 24 Monaten ...	06/2022	<p>Subitec: Insgesamt wurden fast kontinuierlich Mikroalgen kultiviert und über 1 kg an getrockneter Biomasse für die Versuche der Projektpartner produziert.</p> <p>Die Charakterisierung der Prozesse wurde abgeschlossen</p> <p>Die Daten für die Durchführbarkeitsstudien und Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen wurden ausgewertet.</p> <p>Die Charakterisierung der Prozesse im Pilotmaßstab konnte erst nach Fertigstellung des Demonstrators in M34 erfolgen.</p>
M 3 nach 30 Monatenxx ...	X12/2022	<ul style="list-style-type: none"> - verschiedene Probechargen von pelletierten Futtermitteln mit Algenzusatz wurden hergestellt und eine Charge wurde durch die Firma AllerAqua in der

Meilensteine (M) (lt. Planung im Antrag)	Fälligkeit (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
		Fischzucht getestet. - Die analytischen Methoden zum Nachweis der Bioverfügbarkeit sind etabliert worden - Demolauf mit Einbindung neuer LED-Panele und Automatisierungskonzepten ist erfolgt in M36. - Die Daten für die Durchführbarkeitsstudien und Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen standen zur Verfügung

b) Zusammenfassung

Die Nutzung von Mikroalgen in der Herstellung von Futtermitteln insbesondere in der Aquakultur erfordert eine ressourceneffiziente und kosteneffiziente Produktionsweise. Im Projekt Power2Feed wurde eine Kostenreduktion der Algenproduktion durch die Implementierung mehrerer Maßnahmen erfolgreich umgesetzt. In geschlossenen Photobioreaktoren wurden die Kultivierungsparameter optimiert am Beispiel der in der Aquakultur interessanten Algenproduktion von Haematococcus- und Phaeodactylum, die zu einer deutlichen Steigerung der Produktivität und einer Reduktion der Kosten führen. Hauptparameter ist die Beleuchtung mit energieeffizienten LEDs. Eine Optimierung der einzusetzenden LEDs hinsichtlich Energieeffizienz (Konversion von Strom in Licht) und Wirkung der Lichtintensität auf die Produktivität und vor allem auf die Lichtausbeute (Konversion von Licht in Biomasse/Produkt) wurde untersucht. Über den Einsatz entsprechender Sensortechnologie können nicht nur die Umweltbedingungen in Photobioreaktoren kontrolliert werden, sondern sind auch ein Schritt in Richtung kostenreduzierende Automatisierung.

Die Fähigkeit das Reaktorkonzept entsprechend zu skalieren, ermöglicht erst eine kostengünstige Massenproduktion von Mikroalgen und ihren Inhaltsstoffen. Mit Hilfe der Automatisierung von Prozessen wie Nährstoffzufuhr, Ernte und Reinigung ermöglicht eine effiziente und arbeitsaufwandsarme Produktion von Mikroalgen und damit Kostenreduktion.

Eine weitere Kostenreduktion wurde durch eine effiziente Aufarbeitung und Futtermittelproduktion mittels Extrusionsprozess erzielt, um Astaxanthin-haltige Algenbiomasse in Fischfutter mit hoher Bioverfügbarkeit der Aquakultur bereit zu stellen. Der Extrusionsprozess wurde optimiert und die Bioverfügbarkeit über einen analytischen Nachweis erbracht.

II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

Einführung in das Projekt

Die Nutzung von Mikroalgen in der Herstellung von Futtermitteln insbesondere in der Aquakultur erfordert eine nachhaltige und effiziente Produktionsweise. Diese kann nur in geschlossenen Photobioreaktoren erfolgen, da Photobioreaktoren eine bessere Kontrolle über Umweltbedingungen wie Licht, Temperatur und CO₂-Gehalt bieten, was zu einer höheren Produktivität führen kann. Die Produktivität der Mikroalgenkultur ist entscheidend, um genügend Biomasse für die Futtermittelproduktion zu erzeugen. Insbesondere die Beleuchtung von Algenkulturen, sowohl was Lichtintensität als auch Lichtspektrum haben einen großen Einfluss auf die Produktivität. Eine nachhaltige Mikroalgenkultivierung sollte ressourceneffizient sein, d.h. sie sollte wenig Wasser und Energie verbrauchen. Ein hoher Energieverbrauch wird v.a. durch die künstliche Beleuchtung mit LEDs hervorgerufen. Eine Optimierung der einzusetzenden LEDs hinsichtlich Energieeffizienz (Konversion von Strom in Licht) und Wirkung der Lichtintensität auf die Produktivität und vor allem auf die Lichtausbeute (Konversion von Licht in Biomasse/Produkt) sind hier zu untersuchen. Eine entsprechende Sensortechnologie kann bei diesen Entwicklungen unterstützen um die optimalen Kulturbedingungen effizient zu steuern.

Die Fähigkeit das Reaktorkonzept entsprechend zu skalieren, ermöglicht erst eine kostengünstige Massenproduktion von Mikroalgen und ihren Inhaltsstoffen. Mit Hilfe der Automatisierung von Prozessen wie Nährstoffzufuhr, Ernte und Reinigung ermöglicht eine effiziente und arbeitsaufwandsarme Produktion von Mikroalgen und damit Kostenreduktion.

Die Integration von Photobioreaktoren in industrielle Prozesse, um Abfallströme wie CO₂ oder Gärrest als Nährstoffe für die Mikroalgen zu nutzen, ist eine weitere Möglichkeit Produktionskosten zu senken. Soll Mikroalgenbiomasse in der Herstellung von Futtermitteln für die Aquakultur eingesetzt werden, ist die Aufarbeitung, also Zellernte, Zellaufschluss und evt. Extraktion ein Kostenfaktor. Deshalb sollte in diesem Projekt untersucht werden, ob die Bedingungen im Extrusionsprozess für die Herstellung von Futtermittelpellets ausreichend für einen Zellaufschluss sind, um Astaxanthin-haltige Biomasse für Fische bioverfügbar zu machen.

Änderungen im Fokus des Projektes nach M12

Im Juni 2021 wurde zwischen den Partnern des Verbundvorhabens eine Änderung bzw. Fokussierung des Projektes beantragt und vom Projektträger FNR genehmigt. Dies betraf die Partner Subitec GmbH und Fraunhofer IGB und CBP, die in Arbeitspaket 1.2. sich auf neue effiziente und spezifisch auf Algenstämme angepasste LED-Beleuchtungssysteme die zukünftig in Standardanlagen von Subitec eingesetzt werden sollen fokussieren wollten. Damit könnte der Markt für Algenproduktionsanlagen auch im ländlichen Raum mit verbesserter Wirtschaftlichkeit bedient werden.

Arbeitspaket 1: Prozessentwicklung

Die Stammauswahl beschränkte sich auf 3 Algen mit entsprechend hohen Gehalten an ω -3 Fettsäuren (EPA/DHA, min. 3%) und Carotinoiden für Futterergänzungsmittel und erfolgte basierend auf den folgend dargestellten Anforderungen und der langjährigen Erfahrung der Projektpartner. Die Auswahl, der für das Gelingen des Vorhabens am besten geeigneten Algen, richtete sich nach der Kultivierbarkeit mit hohem Wachstum im FPA Reaktor, bevorzugt in einem Süßwassermedium, deren Eignung auf schwankende Lichtbedingungen zu reagieren und damit einhergehend deren Auswirkungen auf das Produktspektrum, sowie die Zellwandbeschaffenheit um eine vorteilhafte Extrusion zu ermöglichen.

AP 1.1 Kultivierung ω -3 Fettsäure-haltiger Algen für Futterergänzungsmittel

Zu Beginn des Projektes wurden die 3 folgenden Algenstämme ausgewählt:

1. *Haematococcus pluvialis* mit den für Futtermittel interessanten Inhaltsstoffen Astaxanthin (bis zu 5 Gewichtsprozent)
2. *Phaeodactylum tricornutum* SAG 1090-1b enthält die omega-3-Fettsäure EPA mit bis zu 6 Gewichtsprozent und kann in Medien von schwacher Salinität bis Meerwasserstärke wachsen. Durch Zusatz zum Futtermittel kann EPA aus Fischöl ersetzt werden. Zusätzlich enthält *Phaeodactylum* das Carotinoid Fucoxanthin mit bis zu 2 Gewichtsprozenten, das neben seiner färbenden Wirkung auch die Gesundheit von Tieren fördert.
3. *Nannochloropsis limnetica* SAG 18.99 ist eine Süßwasseralge die EPA enthält mit bis zu 4 Gewichtsprozenten. Im Vergleich zu *Phaeodactylum* liegt EPA in der Zelle als Phospholipid vor, in *Phaeodactylum* zumeist als Glycolipid. Dies hat einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit. Die Zellwand und Zellgröße unterscheiden sich von den anderen 2 Stämmen.

Subitec bearbeitet den Algenstamm *Haematococcus pluvialis*, die beiden anderen Stämme werden durch das Fraunhofer IGB bearbeitet. Nach der Fokussierung des Projektes hat das Fraunhofer IGB sich insbesondere die Prozessoptimierung hinsichtlich ein- und zweiseitiger Beleuchtung von *Phaeodactylum*-Kulturen in FPA-Reaktoren untersucht.

1.1.1. Prozessoptimierung - Vergleich ein- und zweiseitige Beleuchtung

Der Einfluss der Lichtintensität oder Photonenfluxdichte PFD ($\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) auf der Reaktoroberfläche auf die Biomasseproduktivität der *Phaeodactylum*-Kultur ($\text{g TS l}^{-1}\text{d}^{-1}$), der Produktproduktivität (z.B. $\text{mg EPA L}^{-1}\text{d}^{-1}$) sowie der Lichtausbeute ($\text{g TS/mol Photonen eingestrahlt auf Reaktoroberfläche}$) wurde im Fraunhofer IGB bereits intensiv für verschiedene Algenstämme wie beispielsweise *Phaeodactylum tricornutum* untersucht^{1,2}. Dabei wurde nicht nur die Lichtintensität, die auf die Reaktoroberfläche auftrifft betrachtet, sondern in Relation zur Biomassekonzentration im Reaktor gesetzt. D.h. wieviel mol Photonen stehen theoretisch jeder Zelle bzw. pro g Biomasse zur Verfügung bei optimaler Verteilung über die Durchmischung im Reaktor ($\mu\text{mol Photonen g TS}^{-1} \text{s}^{-1}$). Diese sogenannte spezifische Lichtverfügbarkeit hat einen großen Einfluss auf die Biomasseproduktivität als auch auf die Lichtausbeute als Maß für die Effizienz der Konversion von Licht über die Photosynthese in Biomassewachstum oder Produktbildung. Ausgehend von früheren Freilandstudien mit direkter Sonnenlichteinstrahlung von einer Seite wurden zunächst die Optimierungen bei einseitiger Beleuchtung durchgeführt. Die Biomasseproduktivität nimmt mit steigender spezifischer Lichtverfügbarkeit und steigender Biomassekonzentration zu, während die Lichtausbeute abnimmt¹. Dies ist auf die schlechtere Verteilung und Eindringtiefe des Lichtes in dichten Kulturen zurückzuführen. Im Falle von künstlicher Beleuchtung, mit hohen Kosten für LEDs und v.a. den Strombedarf, kommt der Lichtausbeute eine größere Bedeutung zu als im Freiland mit deutlich reduzierterem Strombedarf, aber auch um den Faktor 4-5 niedrigerer Produktivität.

Der Vorteil einer zweiseitigen künstlichen Beleuchtung liegt darin, dass pro Seite niedrigere Lichtintensitäten eingestrahlt werden können, die von beiden Seiten in die Kultur eindringen und damit besser auf alle Algenzellen verteilt werden können. Dies ermöglicht höhere Biomassekonzentrationen und damit höhere Biomasseproduktivitäten und gleichzeitig verbesserte Lichtausbeuten.

Versuchsordnung:

Die Versuche wurden in 6L Flachplatten-Airlift-Reaktoren mit 3 cm Schichtdicke durchgeführt. Die Reaktoren sind mit einer speicherprogrammierbaren Steuerungseinheit (SPS, Siemens) mit Bedienpanel versehen (*Abbildung 3*). Die Reaktoren konnten einseitig oder zweiseitig mit warmweißen

¹ Derwenskus F. et al. (2020): Coproduction of EPA and Fucoxanthin with *P. tricornutum* – A Promising Approach for Up- and Downstream Processing. Chem. Ing. Tech. 2020, 92, No. 11, 1–11; Special Issue: Bioraffinerien November 2020 Pages 1780-1789 DOI: 10.1002/cite.202000046

² Derwenskus F. Entwicklung und Bewertung eines Verfahrens zur Herstellung von Fucoxanthin und Eicosapentaensäure mit *Phaeodactylum tricornutum*. Dissertation Universität Stuttgart 2020.

LEDs (Nichia, mit Farbtemperatur 3000K) der Fa. Lumitronix beleuchtet werden. Die Photonenflussdichte ($\mu\text{mol Photonen}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$) auf der Reaktoroberfläche kann über das Bedienpanel eingestellt werden (siehe *Abbildung 3*). Um zu vergleichen wurde die spezifische Lichtverfügbarkeit in $\mu\text{mol Photonen gTS}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Lichtintensität, die auf die Reaktoroberfläche auftrifft in Relation zur Biomassekonzentration im Reaktor) eingestellt. Die Versuche wurden bei gleicher Biomassekonzentration gestartet und jeweils von einer oder zwei Seiten die gleiche spezifische Lichtverfügbarkeit eingestellt. Die Photonen-Flussdichte auf einer Reaktoroberfläche bei einseitiger Beleuchtung war demnach doppelt so hoch als bei zweiseitiger Beleuchtung. Die anderen Versuchsparameter waren identisch.

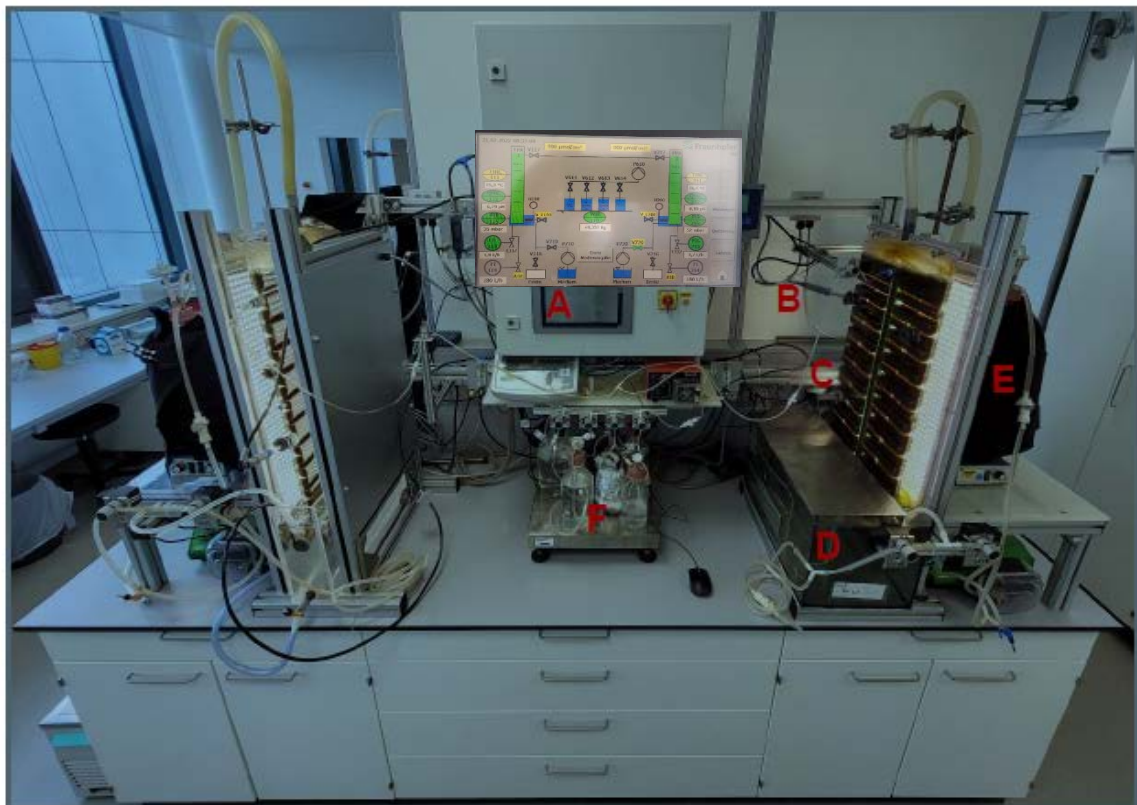


Abbildung 3: 6L FPA-Reaktor mit einseitiger (rechts) und zweiseitiger (links) Beleuchtung über LEDs. Über die Steuerung kann die Lichtintensität die auf die Reaktoroberfläche einstrahlt auf die Biomassekonzentration im Reaktor angepasst werden (spezifische Lichtverfügbarkeit in $\mu\text{mol Photonen g TS}^{-1} \text{s}^{-1}$).

[A] Steuerung mit Touchpad Interface, [pH- und Temperatur-Sensor, [C] Drucksensor für die Füllstandkontrolle, [D] Wasserbad für die Temperierung der Kultur, [E] Mediumszufuhr, [F] Nährstoff-Lösungen (Ammonium/Nitrat und Phosphat) die über eine Waage mit der Steuerung zudosiert werden kann.

Ergebnisse:

Der Einfluss der Lichtintensität, ein- und zweiseitig eingestrahlt auf die Reaktoroberfläche, auf die Biomasse-Produktivität ($\text{g TS l}^{-1} \text{d}^{-1}$) und der Lichtausbeute (g TS/mol Photonen eingestrahlt auf Reaktoroberfläche) wurde mit dem Algenstamm *Phaeodactylum tricornutum* durchgeführt. Aus *Abbildung 4* und *Abbildung 5* ergeben sich folgende Erkenntnisse zum Vergleich einseitiger mit zweiseitiger Beleuchtung von Algenkulturen in FPA-Reaktoren:

- Bei gleicher Lichtverfügbarkeit ($\mu\text{mol Photonen g TS}^{-1}\text{d}^{-1}$) wird mit zweiseitiger Beleuchtung im gleichen Zeitraum eine fast doppelt so hohe Biomassekonzentration (g TS/l) erreicht. Damit ist die spezifische Lichtverfügbarkeit ($\mu\text{mol Photonen g TS}^{-1} \text{s}^{-1}$) ein Haupteinflussfaktor auf die Biomasseproduktivität ($\text{g TS l}^{-1}\text{d}^{-1}$) (siehe *Abbildung 4*), wobei bei zweiseitiger Beleuchtung der Effekt ausgeprägter ist.
- Die höchste Biomasseproduktivität wurde bei einer spezifischen Lichtverfügbarkeit von $2 \times 3 \mu\text{mol Photonen g TS}^{-1} \text{s}^{-1}$ und Biomassekonzentrationen bis $9,5 \text{ g TS/l}$ erreicht (*Abbildung 4 D*). Die so erzielte Biomasseproduktivität von $2,7 \text{ g TS l}^{-1}\text{d}^{-1}$ (*Abbildung 4 E*) ist die bisher höchste beschriebene Biomasseproduktivität in künstlich beleuchteten Photobioreaktoren für den Stamm *Phaeodactylum tricornutum*. Diese hohe Produktivität von bis zu $2,7 \text{ g TS/l}$ wird allerdings mit niedrigerer Lichtausbeute erkauft.
- Die Lichtausbeute nimmt mit steigender Lichtintensität die pro Reaktorseite eingestrahlt wird ab. Bei einseitiger Beleuchtung liegt sie unter $1 \text{ g TS/mol Photonen}$, bei zweiseitiger Beleuchtung nimmt sie bei $> 500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erst ab. Die zweiseitige Beleuchtung hat den Vorteil, dass eine geringere Lichtintensität pro Reaktorseite nötig ist (*Abbildung 5*) und die Lichteindringung von beiden Seiten erzeugt eine bessere Lichtverteilung. Dies resultiert in einer besseren Lichtausnutzung und damit einer höheren Lichtausbeute (*Abbildung 5 B, D*). Die Lichtausbeute ist ein wichtiger Kostenfaktor der berücksichtigt werden muss, da durch LEDs ein hoher Strombedarf besteht.
- Die maximale Biomasseproduktivität und Lichtausbeute wird bei einseitiger Beleuchtung bereits bei einer Biomassekonzentration von 4 g/l erreicht, während bei zweiseitiger Beleuchtung dies erst bei 7 g/l erreicht wird. Danach wird Licht schlechter in Biomasse konvertiert, bzw. die Lichtintensität auf der Reaktoroberfläche ist so hoch, dass eine Hemmung eintritt (siehe *Abbildung 6*).

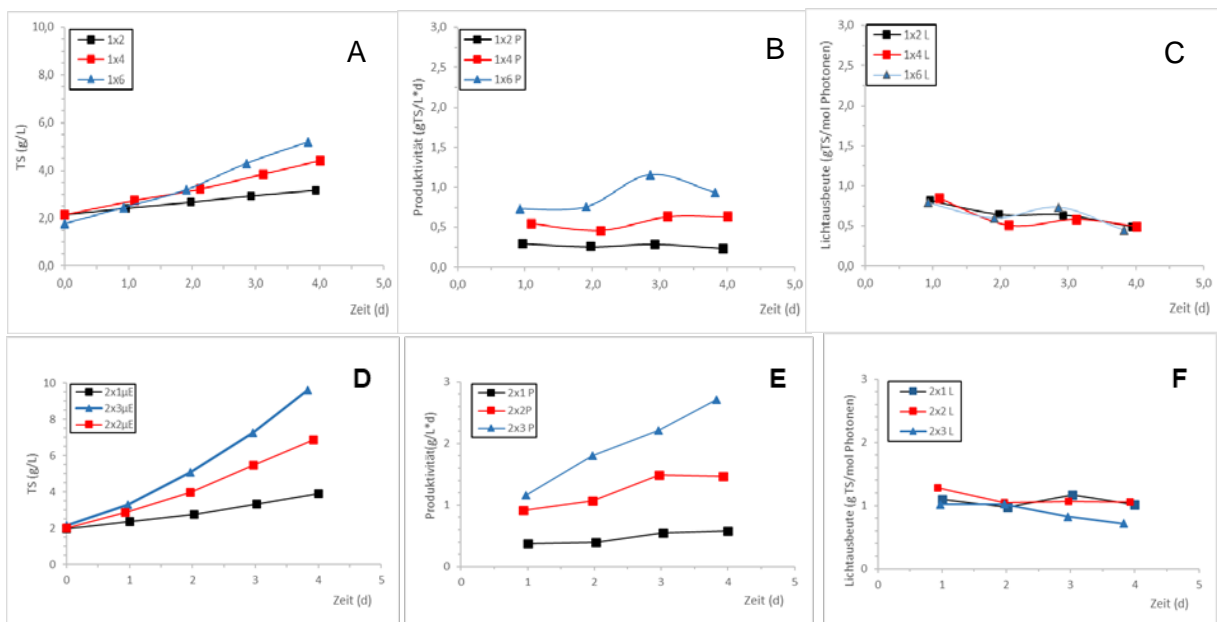


Abbildung 4: Verlauf der Biomassekonzentration (A, D), der volumetrischen Biomasseproduktivität (B, E) und der Lichtausbeute (C, F) bei drei verschiedenen spezifischen Lichtverfügbarkeiten. **Das Licht**

wurde einseitig (A – C) oder zweiseitig (D – F) eingestrahlt, entsprechend der Biomassekonzentration im Reaktorvolumen (insgesamt 2, 4 oder 6 $\mu\text{mol Photonen g TS}^{-1}\text{s}^{-1}$).

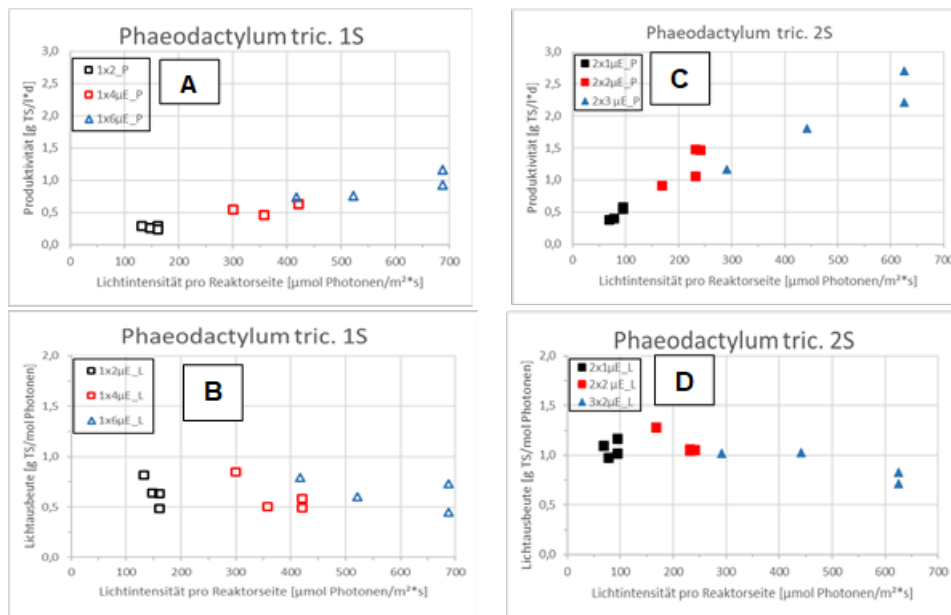


Abbildung 5: Verlauf der Biomasseproduktivität und Lichtausbeute mit steigender Lichtintensität (PFD) pro Reaktorseite bei (A, C) einseitiger und (B, D) zweiseitiger Beleuchtung.

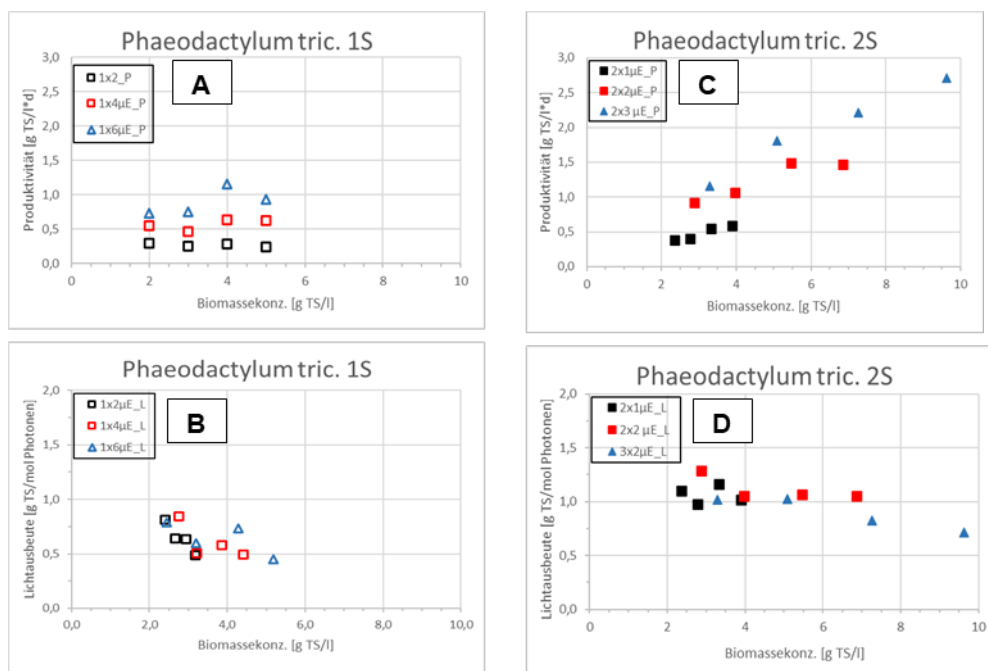


Abbildung 6: Verlauf der Biomasseproduktivität und Lichtausbeute mit steigender Biomassekonzentration bei (A, C) einseitiger und (B, D) zweiseitiger Beleuchtung.

Vergleich ein- und zweiseitige Beleuchtung hinsichtlich optimalem Prozessfenster:

In Tabelle 2 sind die bestimmenden Parameter für ein optimales Prozessfenster aufgeführt:

- für eine optimale Produktivität kann der Prozess bei zweiseitiger Beleuchtung mit 25-50 % höherer Biomassekonzentration gefahren werden, was sich wiederum auf den Energiebedarf für die Biomasseernte auswirkt.
- für eine optimale Produktivität reduziert sich die dafür benötigte spezifische Lichtverfügbarkeit um 30-50% (4 bei zweiseitig vs. 6-8 $\mu\text{E/g TS}\cdot\text{s}$ bei einseitiger Beleuchtung). Damit reduziert sich der Strombedarf bei zweiseitiger Beleuchtung um maximal die Hälfte.
- Bei zweiseitiger Beleuchtung erhöht sich die max. Produktivität bei hoher spezifischer Lichtverfügbarkeit nur wenig, da dann Lichtinhibierung eintritt.
- Die Lichtausbeute ist ein wichtiger Kostenfaktor, der berücksichtigt werden muss, da durch LEDs ein hoher Strombedarf erzeugt wird.
- Der geringere Strombedarf sollte nun in Relation zu den Mehrkosten für die zweiseitige LED-Beleuchtung gestellt werden.

Tabelle 2: Vergleich der ermittelten optimalen Prozessfenster bei einseitiger und zweiseitiger Beleuchtung. Der Auswertung liegen weitere nicht dargestellte Daten zugrunde.

	Biomassekonzentration. [g/l]	Biomasseproduktivität [g TS l ⁻¹ d ⁻¹]	spezifische Lichtverfügbarkeit [$\mu\text{mol Photonen g TS}^{-1}\text{s}^{-1}$]	Lichtausbeute [g TS/mol Photonen]
Prozessfenster einseitige Beleuchtung	4 - 6	1,2	4 - 6	0,4 - 0,65
Prozessfenster zweiseitige Beleuchtung	4 - 7	1,5 - 1,8	4 - 6	1,0 – 1,1

Daraus ergibt sich ein **optimales Prozessfenster** bei zweiseitiger Beleuchtung: die optimale Biomassekonzentration liegt im Bereich 4-7 g TS/l (siehe *Abbildung 6* und *Tabelle 2*) und mindestens $2 \times 2 \mu\text{mol Photonen g TS}^{-1}\text{s}^{-1}$. Daraus ergibt sich eine Biomasseproduktivität von bis zu 1,8 g l⁻¹ d⁻¹ bei einer Lichtausbeute von >1 g TS/mol Photonen. Die Lichtausbeute ist ein wichtiger Kostenfaktor, der berücksichtigt werden muss, der den zu erwartenden Strombedarf widerspiegelt.

AP1.1.2 Flüssiggärrest einer landwirtschaftlichen Biogasanlage als Mediumbestandteil

Dieses Arbeitspaket wurde zusätzlich in den Förderbescheid aufgenommen.

Mit diesem Arbeitspaket sollte der Anschluss an eine landwirtschaftliche Biogasanlage über die Nutzung des Flüssiggärrestes als Nährstoffquelle für Ammonium und Phosphat überprüft werden. Folgendes ist dabei zu beachten:

- Während der anaeroben Vergärung wird Stickstoff und Phosphor in Form von löslichem Ammonium und Phosphat freigesetzt. Ammonium ist im Gegensatz zu Pflanzen die bevorzugte Stickstoffquelle für viele Mikroalgen. Für ein optimales Wachstum ist ein N:P-Verhältnis von mindestens 6-7:1 nötig.
- Für den Einsatz in geschlossenen Photobioreaktoren sollte der Flüssiggärrest partikelfrei sein.

Für das Power2Feed-Projekt wurde zunächst Flüssiggärrest der Kläranlage Wutöschingen/Schwarzwald getestet. Diese Anlage wird als Hochlastfaulung betrieben mit integriertem Rotationsscheibenfilter zur Abtrennung des Flüssiggärrestes. Der Flüssiggärrest hatte eine Gelbfärbung (siehe *Abbildung 7 D*). Parallel dazu wurde Gärrest einer landwirtschaftlichen Biogasanlage (Familie Veas Hof Weitenau in Eutingen-Weitingen, BW) besorgt. Die nach Abtrennung der Feststoffe verbleibende Flüssiggärrest enthielt sehr viele, sehr kleine Schwebstoffe, die weder filtriert noch abzentrifugiert werden konnten, auch nach Verdünnung mit Wasser (*Abbildung 7 A und B*). Der Flüssiggärrest war sehr stark gefärbt auch nach der Verdünnung mit Wasser (*Abbildung 7 C*).

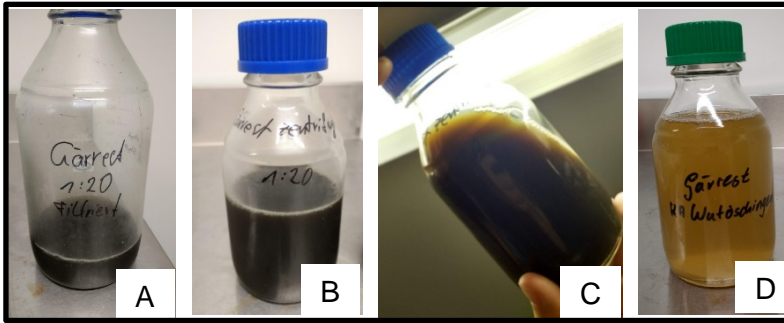


Abbildung 7: Vorbehandelter Gärrest von der Biogasanlage Veess/Weitenau; A: Flüssiggärrest wurde mit Wasser 1:20 verdünnt und anschließend filtriert; B: Flüssiggärrest wurde 1:20 mit Wasser verdünnt und zentrifugiert ($\times 10000g$); C: Tiefe Braunfärbung des Flüssiggärrests nach 1:20 Verdünnung mit Wasser und Zentrifugation zur Entfernung der Schwebstoffe; D: Flüssiggärrest der Kläranlage Wutöschingen, unverdünnt ohne weitere Vorbehandlung.

Der Nährstoffgehalt der zwei Gärreste ist in **Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.** aufgeführt.

Tabelle 3: Nährstoffgehalt der getesteten Flüssiggärreste.

	Ammoniumgehalt [mg/l]	Phosphatgehalt [mg/l]
Flüssiggärrest der KA Wutöschingen	500	37
Flüssiggärrest der Biogasanlage Veess / Weitenau	746	100

Versuchsergebnisse:

Mit dem Gärrest der kommunalen Kläranlage als N- und P-Quelle konnten im 6L FPA-Airliftreaktor fast vergleichbare Biomasseproduktivitäten wie mit Standardmedium erzielt werden (Abbildung 8). Nachdem die Biomasseproduktivität bis Tag 17 zurückging wurden separat Magnesium- und Kaliumsalze, sowie Spurenelemente des Standardmediums zugegeben. Dies bewirkte eine Stabilisierung der Biomasseproduktivität. Dies zeigt aber, dass Flüssiggärrest allein nicht alle für das Wachstum benötigten Mediumbestandteile enthält, Flüssiggärrest aus der kommunalen Klärschlammvergärung stellt dennoch eine gute N- und P-Quelle für Mikroalgen dar.

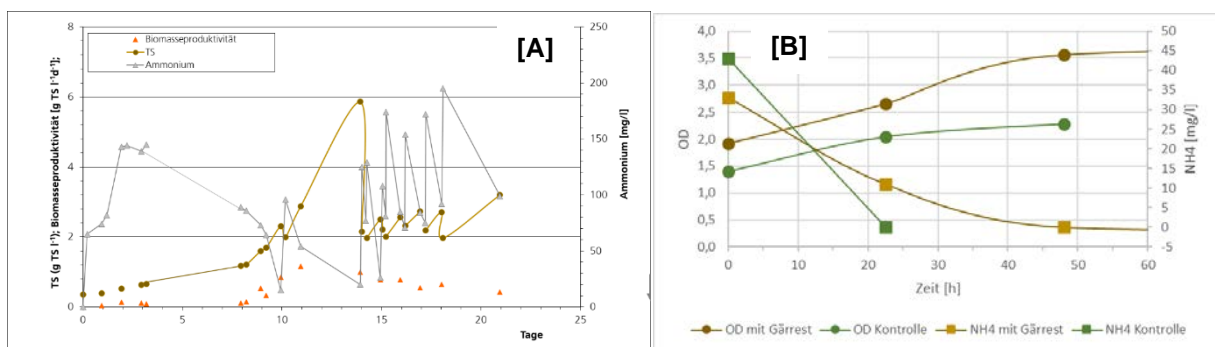


Abbildung 8: **[A]** Wachstum von *Phaeodactylum* auf Flüssiggärrest von der Kläranlage Wutöschingen. Ab Tag 10 wurde Flüssiggärrest als Ammoniumquelle zugegeben. Phosphat wurde auf 70-90 mg/l mit separater Phosphatlösung aufgefüllt.

[B] Wachstum und Ammoniumverbrauch von *Phaeodactylum*-Kulturen auf filtriertem Gärrest aus der landwirtschaftlichen Biogasanlage Veas (Weitingen) in 10 ml Parallel-Gefäßen (CELL-DEG).

Der Gärrest der landwirtschaftlichen Biogasanlage enthielt viele Schwebstoffe, die auch durch Zentrifugation nicht entfernt werden konnten. Von einer geringen Menge konnte durch Filtration partikelfreier Flüssiggärrest gewonnen werden. Dieser wurde in 10ml-Parallelgefäßen mit CO₂-Begasung und Beleuchtung (CELL-DEG-Plattform) auf Wachstum getestet. Mit Flüssiggärrest konnte keine Hemmung im Vergleich zur Kontrolle in Standardmedium festgestellt werden (*Abbildung 8 B*)

Für die Versuche im 6L-FPA-Reaktor mit *Phaeodactylum tricornutum* konnte keine ausreichende Menge partikelfreier Gärrest durch Filtration hergestellt werden. Mit unbehandeltem Gärrest als N- und P-Quelle traten erhebliche Schaumprobleme auf. Die Schwebstoffe führten zu einem Ausflottieren der Mikroalgen und letztendlich zum Austrag von Algenzellen in die Schaumfalle. Routinemäßige Zugabe von Antischaummittel war keine Lösung des Problems. Deshalb war auch die erzielte Biomasseproduktivität deutlich reduziert im Vergleich zu Flüssiggärrest der Klärschlammvergärung. Dies zeigt wie wichtig ein partikelfreier Gärrest beim Einsatz als Mediumbestandteil in der Algenkultivierung ist.

AP1.1.3 Kultivierung Carotinoid-haltiger Algen für Futterergänzungsmittel

Wie zuvor erwähnt erfolgte die Stammauswahl basierend auf bestehenden Erkenntnissen der Subitec GmbH sowie einer erweiterten Literaturrecherche.

H. pluvialis ist eine "komplizierte" Spezies, die tatsächlich durch einen komplexen Lebenszyklus gekennzeichnet ist. Sie durchläuft signifikante morphologische Veränderungen von der grünen aktiven Zelle zur roten unbeweglichen Zelle. Daher, beinhaltet die kommerzielle Produktion von *H. pluvialis*-abgeleitetem Astaxanthin ein zweistufiges Kultursystem, mit einer grünen Stufe zur Steigerung der Biomasseproduktion, gefolgt von einer roten Stufe, um die Astaxanthin-Akkumulation zu induzieren. Jede Stufe erfordert Optimierungsmaßnahmen, um entweder die Biomasseproduktion (Phase 1 - "Wachstum") oder die Astaxanthin-Akkumulation (Phase 2 - "Rötung") zu maximieren. Darüber hinaus ist es wichtig zu erwähnen, dass *H. pluvialis* sowohl im grünen als auch in den roten Phasen anfällig für Pilzkontamination ist. Daher mussten für jede Phase spezifische Maßnahmen evaluiert und optimiert werden, um es unter akzeptablen Werten zu halten, die die Produktivität und somit das Ergebnis nicht beeinträchtigen.

Mehrere physikalische, chemische Parameter sowie biologische Faktoren haben einen großen Einfluss auf die Wachstumsrate von *H. pluvialis* und die anschließende Akkumulation von Astaxanthin. Die untersuchten Testumgebungen wurden hinsichtlich der Investitions- und Betriebskosten so eingerichtet, dass ihre Übertragbarkeit auf eine großtechnische Produktion begünstigt wird. Insbesondere, unter den wichtigsten Kultivierungs-/Induktionsparametern wurden (1) Lichtqualität (d.h. Wellenlängenzusammensetzung), -intensität -dauer und -verteilung, (2) Nährstoffgehalt (d.h. Übersättigung oder Verhungern), (3) Bioverfügbarkeit von Kohlenstoff, in Form von Kohlendioxid (CO₂) und (4) Temperatur, als die relevanteren für industrielle Anwendungen identifiziert.

Das anfängliche Inokulum basiert auf SAG (The Culture Collection of Algae at Goettingen University). Mehrere, wöchentliche Scale-up-Schritte waren notwendig, um das Inokulum von festem auf flüssiges Medium zu übertragen, gefolgt vom Scale-up in Kolben und schließlich Flaschen, um das notwendige Algenkulturvolumen zu erhalten, um Tests in 28L-Flat Panel Airlift Photobioreactor (FPA-PBR) zu starten.

Der Umfang für interne Analysen und Abstimmungen mit dem Fraunhofer IGB konzentrierte sich neben der Auswahl der zu betrachtenden Algen auch auf die unterschiedlichen Leuchtmittel für AP 1.2.

Die Experimente wurden in 6 L und 28L FPA Reaktoren im Labor mit bereits etablierter Beleuchtungstechnik durchgeführt. Auch hierbei ergänzten sich die Vorarbeiten der Projektpartner und ermöglichten durch die physische Nähe und etablierte Technologie den Austausch adäquater Lichtquellen.

Neben der kontinuierlichen Analytik der Konzentration und Zusammensetzung der Fettsäuren und Carotenoide, wurde das Wachstum und die Nährstoffverbräuche bei unterschiedlichen Lichtbedingungen (Über- und Unterangebot an Licht im Sinne zur der zur Verfügung stehenden Regelenergie) untersucht und eine angepasste Fütterungsstrategie (fluktuierendes Wachstum auf Grund fluktuierender Lichtverfügbarkeit) etabliert, um eine maximale Produktkonzentration bei minimalem Eintrag von Energie und Nährstoffen zu realisieren. Hierfür war es nötig, diverse Stämme über Passagen in Schüttelkolben bis zu einem Volumen von > 2L zu skalieren und permanent vorzuhalten, um kontinuierlich ausreichend Vorkultur für die Initiierung von Experimenten bereitzustellen.

Nach wiederholten (fed-)batch Experimenten ergab sich hieraus ein algenspezifisches, charakteristisches Stammprofil mit der Kenntnis über die optimalen Betriebspunkte. Mit dieser Datenbasis konnten im Projektverlauf die vorgesehenen weiteren Arbeiten zu künstlichen Beleuchtungsstrategien, Modellbildung, die Automatisierungsaufgaben sowie die Skalierung der Prozesse vorteilhaft ausgelegt werden.

AP1.2: Entwicklung künstlicher Beleuchtungskonzepte

AP 1.2.1: Entwicklung künstlicher Beleuchtungskonzepte für Carotinoid-haltige Algen

Die Wahl der richtigen LED für die Kultivierung von *Haematococcus pluvialis* (aber auch aller anderen im Rahmen des Projektes betrachteten Mikroalgenspezies) erfordert zahlreiche Tests.

Auf Basis der Voruntersuchungen von Subitec wurden insgesamt sechs unterschiedliche LED-Quellen für die Versuche ausgewählt, jeweils zwei wurden auf insgesamt 3 Prototypen-Testständen untersucht. Die LED-Quellen unterschieden sich insbesondere in dem zu Verfügung gestellten Lichtspektrum, der Lichtintensität (teilweise dimmbar), dem Stromverbrauch (OPEX) und den Anschaffungskosten (CAPEX).

Um repräsentative Ergebnisse zu generieren und für den seriennahen Einsatz auf den Anlagen von Subitec mussten die einzelnen LED-Quellen zudem in der individuell geforderten Baugröße (Beleuchtete Fläche = Fläche des Reaktors) vom Hersteller zu Verfügung gestellt werden. Zudem mussten die LED-Panels (und die LED-Verteilung) dem in der Anlage (Zielanwendung) geplanten Abstand entsprechen (um notwendige Anpassungen zu minimieren).

Neben der kontinuierlichen Analytik der Konzentration und Zusammensetzung der Carotenoide, wurden das Wachstum und die Nährstoffverbräuche bei unterschiedlichen Lichtbedingungen (Über- und Unterangebot an Licht im Sinne zur der zur Verfügung stehenden Regelenergie) und die Auswirkungen einer angepasste Fütterungsstrategie (fluktuierendes Wachstum auf Grund fluktuierender Lichtverfügbarkeit) untersucht, um eine maximale wirtschaftliche und hochproduktive Produktkonzentration zu generieren.

Erst auf dieser Basis konnten vergleichbare Rahmenbedingungen für Tests geschaffen werden. Um das Ziel der maximalen Produktivität bei gleichzeitig hoher Zellkonzentration zu erreichen, müssen zahlreiche Testreihen durchgeführt werden.

Eine Testreihe (Durchführung von 2 Kultivierungen unter gleichen Rahmenbedingungen) dauerte bei optimalen Startbedingungen mindestens 2 Wochen. Vor und nach jedem Test musste das System gereinigt werden, um einheitliche Rahmenbedingungen für Tests zu schaffen.

Die im Rahmen der Tests variierbaren Rahmenbedingungen waren insbesondere durch unterschiedliche Temperaturen, Lichtintensitäten, Lichtdauer, Nährstoffzugabe, CO₂ Eintrag und

Startkonzentration bzw. Startbedingungen variierbar. Aus all diesen Variablen ergaben sich n-fach mögliche Tests, die es zu optimieren galt.

Licht

Um den Einfluss der verschiedenen Lichtparameter auf Phase 1 und 2 des Produktionsprozesses gezielt zu untersuchen, wurden die zu verwendenden Kunstlichtsysteme in LED (Lichtemittierenden Dioden) -Lampen identifiziert.

Der Grund dafür war, dass der Einfluss der Lichtqualität bei Mikroalgen mit hoher Präzision untersucht werden kann. Tatsächlich sind LEDs im gesamten PAR-Lichtspektrum (Photosynthetisch Aktiver Bereich) zu finden und können monochromatisches Licht mit schmaler Bandbreite emittieren. Diese Geräte sind zugänglich, produzieren wenig Wärme, erlauben einen großen Bereich von Bestrahlungsstärken, haben eine lange Lebensdauer und können das Licht präzise über eine Fläche lenken und verteilen. Darüber hinaus sind LEDs effizienter in Bezug auf die benötigte Energiemenge pro erzeugtem Photon als andere Lichtquellen und obwohl sie nicht die billigsten Lichtquellen sind, wird prognostiziert, dass die Kosten mit den kontinuierlichen Entwicklungsbemühungen und einer erhöhten Produktionsnachfrage sinken werden. Da jedes Stadium unterschiedliche Anforderungen an die Lichtqualität und -intensität sowie die Dauer der optimalen Beleuchtung stellt, bieten LEDs die nötige Flexibilität, um spezifische Kultivierungsphasen zu erfüllen.

Nährstoffgehalt

Während der Tests in Phase 1 wurde sichergestellt, dass für die gesamte Dauer der Studie ausreichend Nährstoffe zur Verfügung standen. Aus diesem Grund wurden die Nährstoffe, insbesondere Stickstoff, Phosphor und Eisen, kontinuierlich überwacht und gegebenenfalls angepasst, entsprechend dem "Fed-Batch"-Kultivierungsmodus.

Im Gegensatz dazu wurde in Phase 2 der Versuche sichergestellt, dass jeder Versuch unter nährstoffarmen Bedingungen begann, da in der Literatur berichtet wird, dass Stress durch Stickstoffmangel einen signifikanten Einfluss auf die Induktion und Akkumulation von Astaxanthin in *H. pluvialis* haben kann.

CO₂

Die CO₂-Werte stellen einen begrenzenden Faktor für das Wachstum von phototrophen Organismen wie Mikroalgen dar. Daher ist eine CO₂-Anreicherung erforderlich, um das Wachstum und die Photosynthese von Mikroalgenkulturen im Maßstab zu fördern. Eine übermäßige CO₂-Injektion kann jedoch die Photosynthese von Mikroalgen hemmen.

Aus diesen Gründen wurde ein spezifisches Maß an CO₂-Versorgung untersucht, um festzustellen, wie sich die Bioverfügbarkeit von Kohlenstoff sowohl in Phase 1 als auch in Phase 2 auf die Produktivität von *H. pluvialis* auswirkt.

Temperatur

Die Temperatur kann einen signifikanten Einfluss auf den *H. pluvialis*-Metabolismus haben, daher auf die Akkumulation von Biomasse oder Akkumulation von Astaxanthin. Daher wurde auf der Grundlage des aktuellen Standes der Technik ein optimaler Temperaturwert für beide Phasen ausgewählt

IM Rahmen des APs wurden Tests vereinfacht mit nachfolgender Anzahl unterschiedlicher Rahmenbedingungen (jeweils in Klammer) bei den benannten Parametern durchgeführt:

- Lichtintensität (3)
- Lichtdauer (2)

- CO₂ (2)
- Nährstoffe (2)

Zum Einsatz kamen die LEDs der Firmen Valoya Variante 1 und 2, Sunlight, Growlight Variante 1 und 2 und Evolys.

Um den Aufwand zu minimieren haben wir einen frühen Entscheidungspunkt eingezogen, bei dem wir zwei LEDs ausgeschlossen haben. Das Entscheidungskriterium läuft über die Produktivität im Vergleich zum Energieverbrauch bzw. die Zellvitalität. Die Entscheidung über die Weiterverfolgung von lediglich 4 LED-Typen wurde bereits nach 2 Monaten aktiver Kultivierung getroffen.

Im Ergebnis wurden im Arbeitspaket zwei LED-Quellen (jeweils eine pro Kultivierungsphase) definiert werden, die im weiteren Projektverlauf weiter untersucht bzw. verbessert wurden.

Versuchsaufbau

H. pluvialis, Stamm SAG 192.80, wurde in 3 x 100 ml 3N-BBM-Medium + OHM-Vitamine gehalten und auf einem Schütteltisch bei 120 U/min in 250-ml-Erlenmeyerkolben bei 20 ± 1 °C kultiviert, die kontinuierlich von oben mit weißem Licht bei suboptimaler Intensität beleuchtet wurden, bis die exponentielle Wachstumsphase erreicht war.

Die drei Kolben wurden kombiniert, um genügend Biomasse für die Beimpfung eines fünf Liter fassenden Glaskolben zu erhalten, der mit Luft und technischem CO₂ ergänzt wurde. Der Chemostat wurde kontinuierlich von oben mit weißem Licht beleuchtet, bis die exponentielle Wachstumsphase erreicht war. Die Kultur wurde weiterhin in 3NBBM Medium + OHM Vitamine kultiviert.

Das gesamte Kulturvolumen wurde wie auch in vorherigen Wachstumsversuchen in einen sechs Liter fassenden Flat Panel Airlift Bioreaktor (FPA) inokuliert und mit einem Liter steril filtriertem 3NBBM-Medium + OHM-Vitaminen aufgefüllt. Der FPA bestand aus PVC, und seine Oberfläche wurde kontinuierlich von einer Seite (Hell: Dunkel = 24h:0h) mit GrowLight Variante 1 beleuchtet. Die Kultur wurde über eine Keramikmembran mit steriler Luft und technischem CO₂ belüftet. Die Nährstoffe wurden extern über eine Sterilfiltration zugeführt. Diese Kultur wurde semikontinuierlich bei 20 ± 1°C gezüchtet, bis eine Biomassekonzentration von ~2,5 g/L erreicht war, und schließlich in den 28L PVC FPA überführt.

Der 28L PVC FPA wurde mit einer Silikonmembran belüftet und von einer Seite (Hell:Dunkel = 24h:0h) mit *GrowLight Variante 1_scaleup* beleuchtet. Die Kultur wurde mit steriler Luft und technischem CO₂ versorgt. Die Kultur wurde so lange gezüchtet, bis der gewünschte Ausgangswert der Biomasse erreicht war.

Sowohl beim Maßstabsaufbau als auch während des Prozesses wurde die Abwesenheit von Verunreinigungen routinemäßig durch eine mikroskopische Untersuchung überprüft.

Ergebnisse Phase 1 - Wachstum

Die nachfolgende Tabelle 4 gibt einen Überblick zu den für eine Vorentscheidung erzielten Kultivierungs-Ergebnissen.

Tabelle 4: Überblick über bisher bereits erzielte Kultivierungsergebnissen für die LED-Auswahl.

	Typ	Max Stromverbrauch gemessen pro Lampe (Watts)	Produktivität (g L ⁻¹ Tag ⁻¹)
<i>Valoya Variante 1</i>	Wachstum	130	0,4 ÷ 0,6
<i>Valoya Variante 2</i>	Rötung	420	0,04 ÷ 0,05
<i>SANlight</i>	Wachstum	245	0,2 ÷ 0,3
<i>GrowLight Variante 1</i>	Wachstum	100	0,2 ÷ 0,5
<i>GrowLight Variante 2</i>	Rötung	185	0,02 ÷ 0,03
<i>Evolys</i>	Rötung	130	0,025 ÷ 0,04

Aus diesen Vorversuchen konnte ein LED-Typ für Phase 1 und ein LED-Typ für Phase 2 verworfen werden: SANlight und Evolys.

Die SANLight-LEDs zeichneten sich durch einen relativ hohen Stromverbrauch aus, der nicht mit einer höheren Leistung in Bezug auf die Biomasseakkumulation korrespondierte. Weitere große Probleme wurden im Fehlen von Systemen zur Feinabstimmung der Lichtintensität sowie in der inhomogenen Verteilung über die Oberfläche des Reaktors gesehen.

Die Evolys-LEDs wiesen mehrere positive Eigenschaften auf, insbesondere hinsichtlich des relativ geringen Stromverbrauchs und der Möglichkeit, die angewandte Lichtintensität fein abzustimmen. Das Lichtspektrum zeichnete sich jedoch durch das Vorhandensein mehrerer unspezifischer Wellenlängen aus, die nicht für die Induktion der Astaxanthin-Akkumulation benötigt wurden, was zur Folge hatte, dass die berichteten Ergebnisse nur in der doppelten Zeitspanne erzielt werden konnten, die mit den anderen untersuchten Beleuchtungssystemen benötigt wurde.

Die Valoya Variante 1 LED schied aufgrund der vergleichbaren Biomasseproduktivität, die mit GrowLight Typ 1 bei höherem Stromverbrauch erreicht wurde aus.

Die Testbedingungen und die entsprechenden Ergebnisse sind in [Tabelle 4](#) und in [Abbildung 9](#) und [Abbildung 10](#) ausführlich beschrieben.

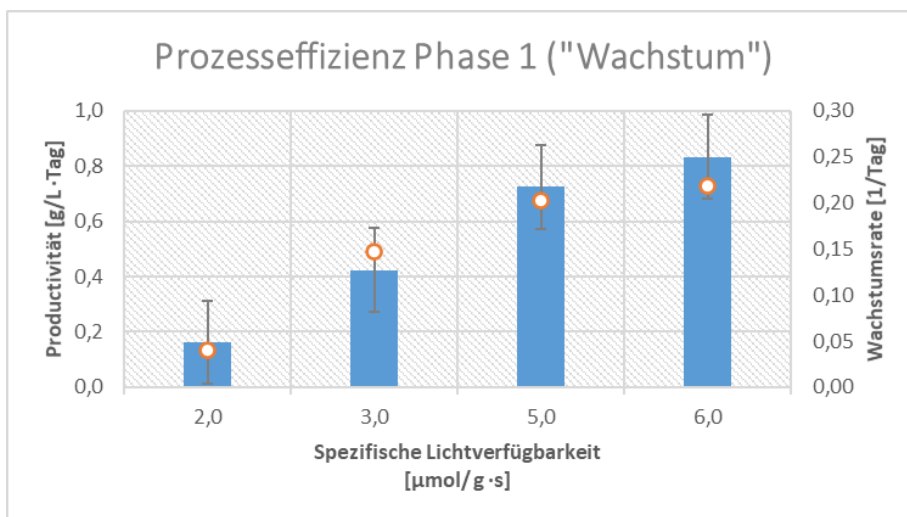


Abbildung 9: Prozesseffizienz – GrowLight Variante 1_scaleup

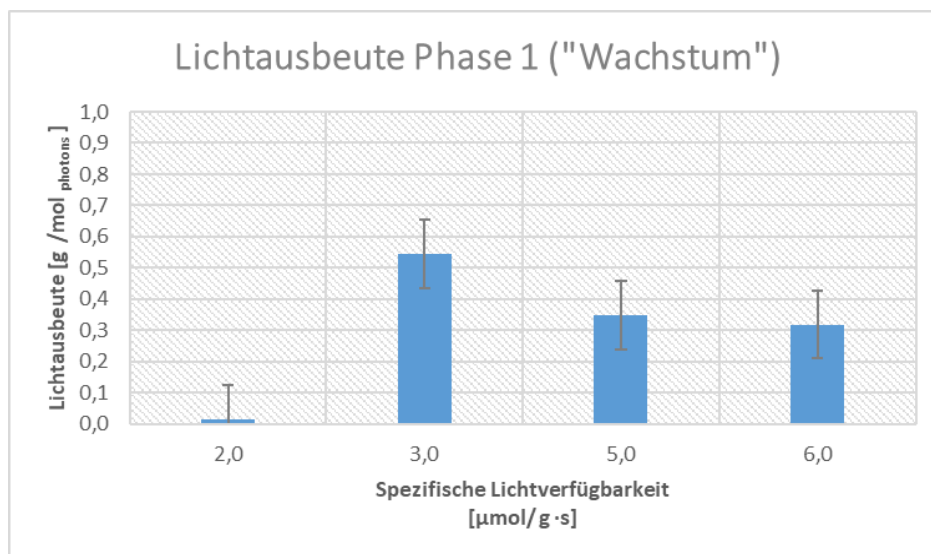


Abbildung 10: Lichtausbeute – GrowLight Variante 1_scaleup

Ergebnisse Phase 2 - Rötung

Vorversuche in LS6

Vorversuche wurden nach wie vor in einem kleineren Laborsystem (LS6, i.e. V = 6L) durchgeführt, um die notwendige Vorkultur herzustellen. Zwei LS6 aus PVC mit Keramikmembranen wurden mit grünen, sauberen und gesunden Kulturen aus Phase 1 beimpft und 1:3 mit sterilem Leitungswasser verdünnt. Eine Kultur wurde mit GrowLight Variante 2 und die andere mit Valoya Variante 2 beleuchtet. Beide Kulturen wurden 7 Tage lang (Hell:Dunkel = 24h:0h) von beiden Seiten bei "Medium" konstanter Lichtintensität und mittelkonstanter Temperatur beleuchtet und mit Luft und technischem CO₂ belüftet.

Die Ergebnisse sind in *Tabelle 5* aufgeführt.

Tabelle 5: Weitere Versuche in LS6 – Ergebnisse zu Astaxanthingehalt [Ax % w/w] und erreichte Biomassekonzentration.

Zeit (Tage)	GrowLight Variante 2		Valoya Variante 2	
	Ax [%]	Kulturdichte [g/L]	Ax [%]	Kulturdichte [g/L]
0	0,05	2	0,04	2,1
6	2,4	4,8	2,3	4,6

Die mit GrowLight Variante 2 erzielten Ergebnisse lagen diesmal im positiven und produktiven Bereich. Der deutlich geringere Stromverbrauch und die Bereitschaft des Herstellers, maßgeschneiderte LED Paneele nach den Anforderungen der FPAs zu liefern schafft eine sehr gute Ausgangsposition für die Integration in das Industrieprodukt von Subitec.

Tabelle 6: Weitere Versuche in LS6 Ergebnisse – Growlight Variante 2

	#1	#2
Beleuchtung	<i>Schrittweiser Anstieg, Doppelseitig</i>	<i>Schrittweiser Anstieg, Doppelseitig</i>
Abstand zwischen LEDs und Reaktor [cm]	4	4
Stromverbrauch pro Lampe [W]	420	420
Verdünnung [%]	30	30
Zeitintervall [Tage]	7	7
CO₂	<i>Optimal</i>	<i>Optimal</i>
Temperatur	<i>Konstant</i>	<i>Schrittweiser Anstieg</i>
Diagnostik	<i>Mikroskopie</i>	<i>Mikroskopie</i>
Fütterungsregime	<i>Mangel</i>	<i>Mangel</i>
Gesamtprozessbewertung	<i>Stabil, aber nicht effizient</i>	<i>Stabil und Effizient</i>

Die Ergebnisse dieser weiteren Versuche waren in Bezug auf die Astaxanthin-Akkumulation positiv und aufgrund des neuerlichen Einsatzes der GrowLight Lampen auch in Puncto Stromverbrauch akzeptabel.

Außerdem gab es keine Möglichkeit, vom Hersteller maßgeschneiderte Modifikationen zu erhalten, die eine Verwendung in weiter ausgebauten Systemen ermöglicht hätten.

Dazu wurden definierte Kulturvolumen aus Phase 1 in einen 28L FPA (LS28) überführt, der mit Luft und technischem CO₂ belüftet und mit sterilem Leitungswasser auf das Endvolumen gebracht wurde. Detaillierte Einstellungen sind in [Tabelle 7](#) und den Abbildung 11 und Abbildung 12 dargestellt.

Tabelle 7: Testbedingungen – GrowLight Variante 2_ Version 2

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Test 7	Test 8	Test 9	Test 10	Test 11	Test 12	Test 13	Test 14
Inoculum Volume [L]	8	8	14	14	14	9	10	14	14	13	13	13	13	9
Illumination Regime	Step-Wise Increase, Double Side	Step-Wise Increase, Double Side	Step-Wise Increase, Double Side	Step-Wise Increase, Double Side	Step-Wise Increase, Double Side	Step-Wise Increase, Double Side	Step-Wise Increase, Double Side	Step-Wise Increase, Double Side	Step-Wise Increase, Double Side	Step-Wise Increase, Double Side	Step-Wise Increase, Double Side	Step-Wise Increase, Double Side	Step-Wise Increase, Double Side	Step-Wise Increase, Double Side
Power Input [V]	7,5→9→10	7,5→9→10	7,5→9→10	7,5→9→10	7,5→9→10	7,5→9→10	7,5→9→10	7,5→9→10	7,5→9→10	7,5→9	7,5→9→10	7,5→9	7,5→9	5→7,5→9→10
Distance between LEDs and FPA [cm]	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Temperature Regime	Step-Wise Increase	Step-Wise Increase	Step-Wise Increase	Step-Wise Increase	Step-Wise Increase	Step-Wise Increase	Step-Wise Increase	Step-Wise Increase	Step-Wise Increase	Step-Wise Increase	Step-Wise Increase	Step-Wise Increase	Step-Wise Increase	Step-Wise Increase
Salinity Stress								0,1% NaCl on Day 6	0,1% NaCl on Day 5	0,1% NaCl on Day 4	0,1% NaCl on Day 1	0,1% NaCl on Day 1	0,5% NaCl on Day 1	
Duration [days]	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	N/A	7	7	7

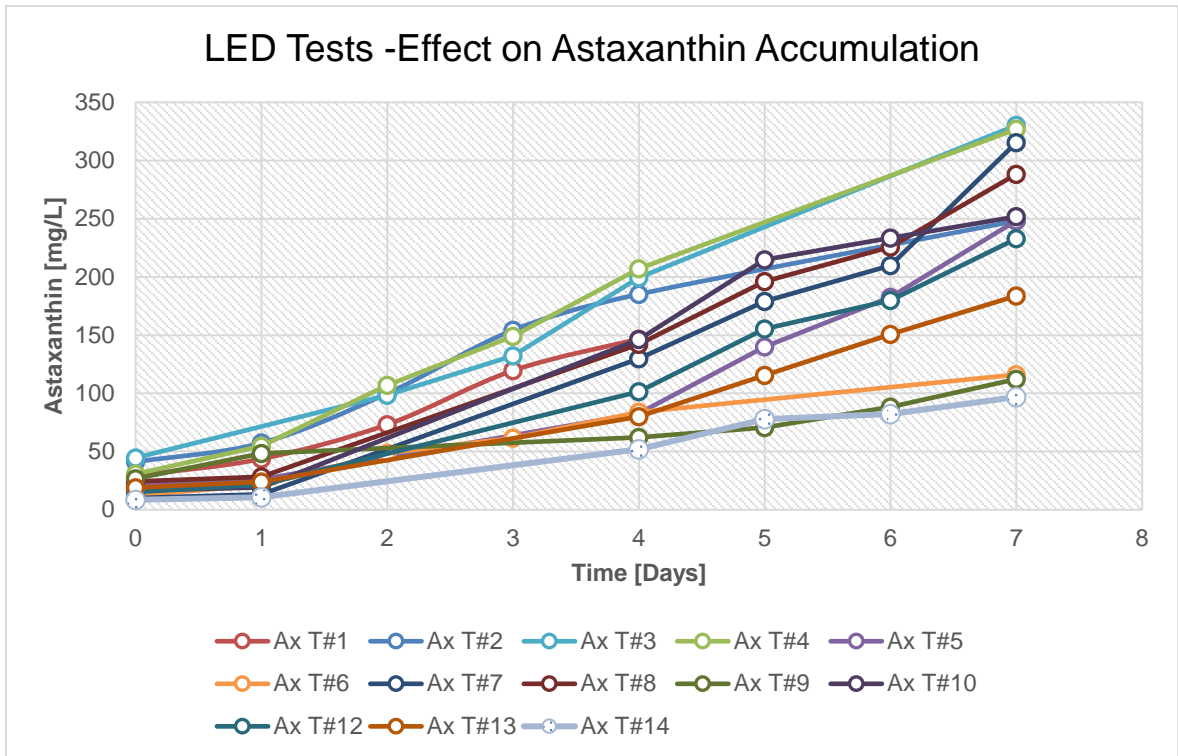


Abbildung 11: Effizienz der Konversion von Licht in Astaxanthin– GrowLight

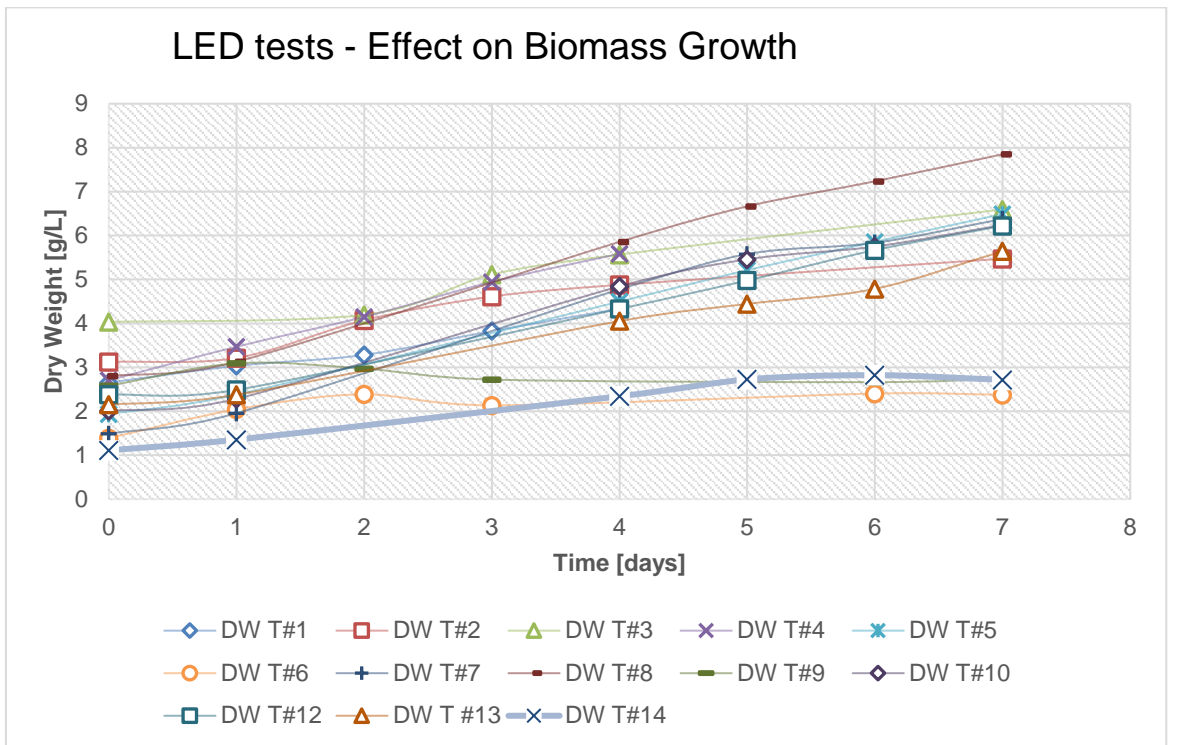


Abbildung 12: Astaxanthin-Gehalt in Prozent des Gesamtgewichts – GrowLight

AP1.2.2 Neues Beleuchtungskonzept für den Demonstrator

Parallel zur Entwicklung eines neuen Beleuchtungskonzeptes für den Mikroalgenstamm *Haematococcus pluvialis* wurde im Fraunhofer IGB für den Stamm *Phaeodactylum tricornutum*, insbesondere für die Ausstattung des skalierten Demonstrators, ein neues Beleuchtungskonzept entwickelt. Es erfolgte eine Recherche, Auswahl und Beschaffung eines neuen maßgeschneiderten Beleuchtungskonzeptes mit Fokus auf Reduktion der LED-Kosten als auch des Strombedarfes. Konzepte von mehreren Herstellern wurden angefragt, Prototypen wurden angefertigt und im Labormaßstab getestet. Kriterien waren Effizienz der LEDs (erzeugte Lichtmenge pro Watt), erzeugte Wärmelast, Wellenlängenprofil und Integrationsmöglichkeit ins neue Reaktorkonzept. Das Ziel der geringstmöglichen Wärmeabgabe und hoher Konversionseffizienz Watt:PAR Photonen von 1:4 für die gewählten 30L Photobioreaktoren wurde erreicht. Dabei wurden die LED-Panelaufbauten mit den verschiedenen LED-Chips nicht bei maximaler Leistung betrieben, sondern im Effizienzpunkt bei etwas niedrigerer Bestromung. In der Konsequenz erzielt man mit dem Panel eine vernachlässigbare Wärmeabstrahlung bei der höchsten Lichtausbeute (lm) pro eingesetzte Leistung (Watt). Damit konnte der Stromverbrauch pro kg erzeugte Algenbiomasse halbiert werden im Vergleich zu den bisher eingesetzten LEDs.

Diese LED-Panels wurden in den Demonstrator integriert (siehe [Abbildung 13](#)). **Weiterer Aufbau siehe Abschnitt**



Abbildung 13: Integration der neuen LED-Panels in den Stack-Photobioreaktor bestehend aus 5x 25L FPA-Panele.

AP 1.3 Entwicklung Automatisierungskonzept für den Demonstrator

Der Fokus in diesem AP sollte auf der Automatisierungsstrategie liegen, die für den Betrieb des Demonstrators nötig ist. Automatisierte Prozesse, die im optimalen Parameterbereich gefahren werden, haben nicht nur eine höhere Produktivität, sondern sind auch stabiler und haben damit eine längere Laufzeit. Dies reduziert die Kosten für die erzeugte Biomasse. Wie in AP1.1 gezeigt, hat die LED-Beleuchtung bzw. das verfügbare Licht pro g Biomasse im Reaktorvolumen einen großen Einfluss auf die Produktivität und damit auch auf Fütterungskonzepte und Erntestrategien. Für deren Automatisierung ist die Kopplung des OD-Sensors mit dem Lichtsensor nötig, um sich bei sich ändernder Biomassekonzentration im Reaktor die Lichtintensität anzupassen und darüber verbrauchte Nährstoffe zu ergänzen und Erntezyklen auszulösen. Aber auch Reinigungszyklen können entsprechend automatisiert werden.

Das bereits im Fraunhofer IGB entwickelte Steuerungs- und Automatisierungskonzept wurde um eine OD-Sonde erweitert (siehe [Abbildung 14 B](#)), nach Kalibrierung [A] kann daraus die Biomassekonzentration berechnet werden und die Lichtintensität auf der Reaktoroberfläche eingestellt werden [D], mit dem Ergebnis einer konstanten Lichtverfügbarkeit, die die Biomasseproduktivität und Lichtausbeute (g BTM/mol Photonen) bestimmt. Aber auch Fütterungszyklen [E] könne über eine OD-Sonde automatisch ausgelöst werden (siehe [Abbildung 15](#)).

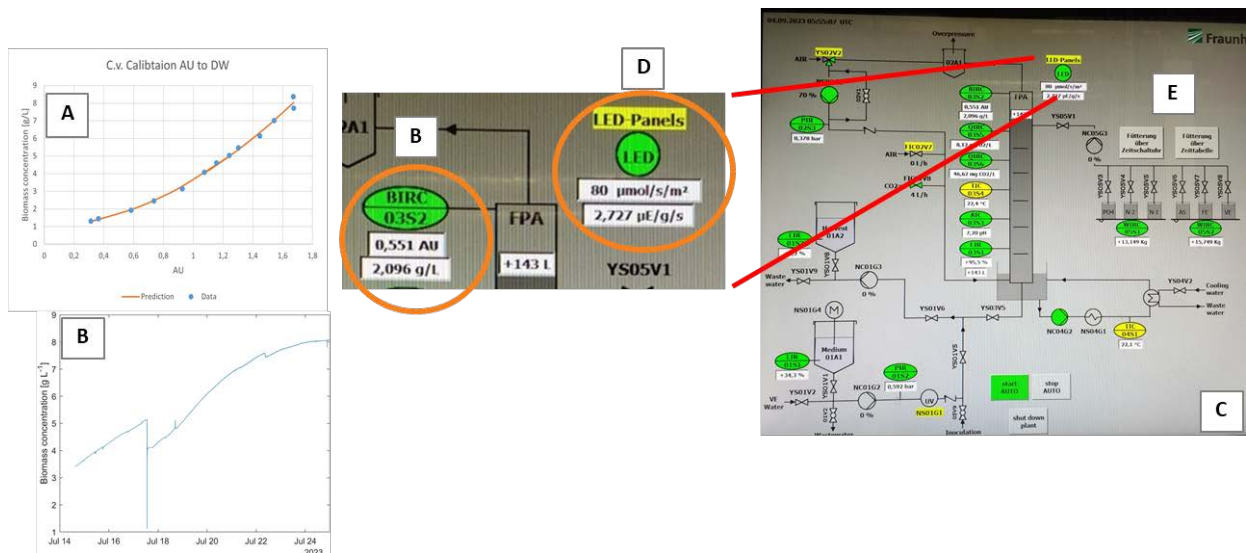


Abbildung 14: Integration einer OD-Sonde in die Steuerung, nach deren [A] Kalibrierung die aktuelle Biomassekonzentration erfasst [B] und über das Bedienpanel der Demonstrator SPS [C] sowohl für die Anpassung der Lichtintensität [D] als auch Fütterungsereignisse [E] ausgelöst werden können.

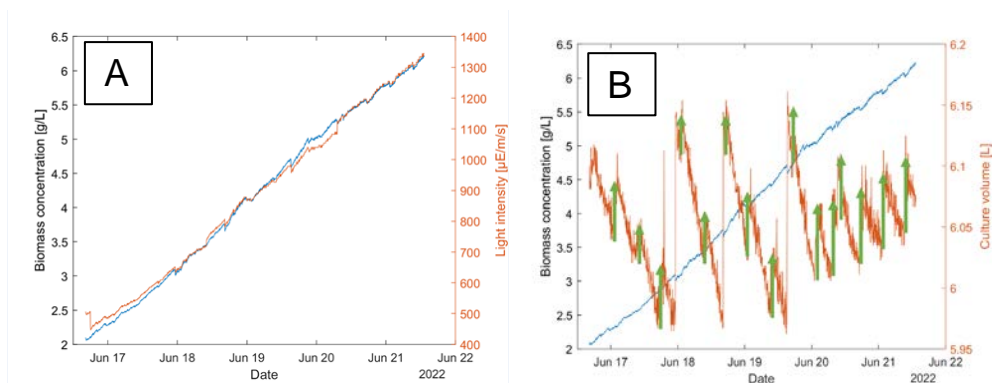


Abbildung 15: Erweiterung des Steuerungskonzeptes mit einer OD-Sonde (A) zur Anpassung der Lichtintensität an die steigende Biomassekonzentration im Reaktorvolumen. (B) Über die OD-Sonde wurde der potentielle Nährstoffverbrauch berechnet und bei den grünen Pfeilen zugegeben. Die Zunahme des Kulturvolumens (online-Daten rote Linie) zeigt die Fütterungszyklen an, die jeweils zu einer Volumenzunahme führten.

Arbeitspaket 2: Skalierung

AP2.1 und AP2.3 Übertragung und Charakterisierung im Pilotmaßstab und Demolauf

Der Aufbau eines Demonstrators im Fraunhofer IGB wurde nach Absprache mit dem Projektträger von der Subitec GmbH übernommen. Die Konzepterstellung und das Engineering mit fünf im Verbund hintereinander angeordneten Flat-Panel Reaktoren als kompaktes Modul ist erfolgt. Hierfür wurde die Funktion des Demonstrators spezifiziert und daraus die benötigten planerischen Dokumente abgeleitet (Fließbild, Zeichnungen, Bilanzen, Spezifikationen der Komponenten, MSR, Elektro, Stahlbau, Verrohrung, Beschaffung, Aufbauplanung). Der Demonstrator wurde mechanisch fertiggestellt (**Fehler!**

Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.) Der Schaltschrank mit allen elektrischen Verbrauchern wurde verkabelt und das programmierte Steuerungskonzept auf den Schaltschrank übertragen. Über „Loop-Checks“ mit Wasserfahrten und Algenkultur wurden alle Verbraucher und Sensoren in Betrieb genommen und auf ihre ordnungsgemäße Funktion getestet. Nach elektrischer Fertigstellung erfolgte die Abnahme durch den TÜV. Danach erfolgten die Demoläufe.

Reaktorverbund

Zentrale Anlagenkomponente ist der aus mehreren FPA-Reaktoren zusammenschaltete Photobioreaktor mit 150L Arbeitsvolumen. Dabei verteilt sich das Volumen auf 5 Kunststofflaminplatten von ca. 1m² Oberfläche (HxB) und 3 cm Schichtdicke, die hintereinander angeordnet und miteinander durch Verschlauchung dichtest gepackt, verbunden sind (*siehe Abbildung 16*). Zwischen den Platten ist die dimmbare LED-Beleuchtung integriert. Es wurde eine Kühlung mittels Wasserbad integriert. Die zu erwartende Wärmebelastung hat sich auf Grund der neuen LED-Boards stark reduziert. Dabei muss je nach Beleuchtungsszenario Wärme zu oder abgeführt werden. Der Reaktor kann für eine optimale Durchmischung mit max. ca. 3,6m³/h eines CO₂/Luft Gemisches begast werden. Dabei ist der CO₂-Anteil in der Zuluft mit der pH-Regelung gekoppelt. Aus Effizienzgründen wird der Gasstrom im Kreislauf rückgeführt um eine möglichst vollständige Verwertung des CO₂ sicherzustellen. Versuche hierzu erfolgten in einem anderen Projekt. Dazu wurden Sonden für die Messung des Gelöst-Sauerstoffs und Gelöst-CO₂ integriert um eine Limitierung durch CO₂ bzw. Hemmung durch eine zu hohe Gelöst-CO₂-Menge zu verhindern.

Aufbau und Test des Prototypen Modulreaktor

Die folgenden zuvor entwickelten oder neu hinzugekommenen und getesteten Komponenten wurden integriert:

- CO₂-Rückführungssystem zur Steigerung der Effizienz der CO₂-Verwertung.
- Sensorik: AU (optische Dichte), Gelöst-CO₂- und Gelöst-O₂
- Integration der Sensoren und weiterer Prozessparameter in die Steuerung.
- Integration eines Fütterungssystems für die automatisierte Zugabe von Nährstoffen oder Stellmittel.
- Energieeffiziente LED-Boards (warmweiße und rote LEDs) mit der Option der Änderung der Lichtfarbe (zuschaltbare blaue LEDs). Die Lichtintensität kann über die Steuerung reguliert werden, oder über die AU-Sonde an steigende Biomassekonzentrationen automatisch angepasst werden.

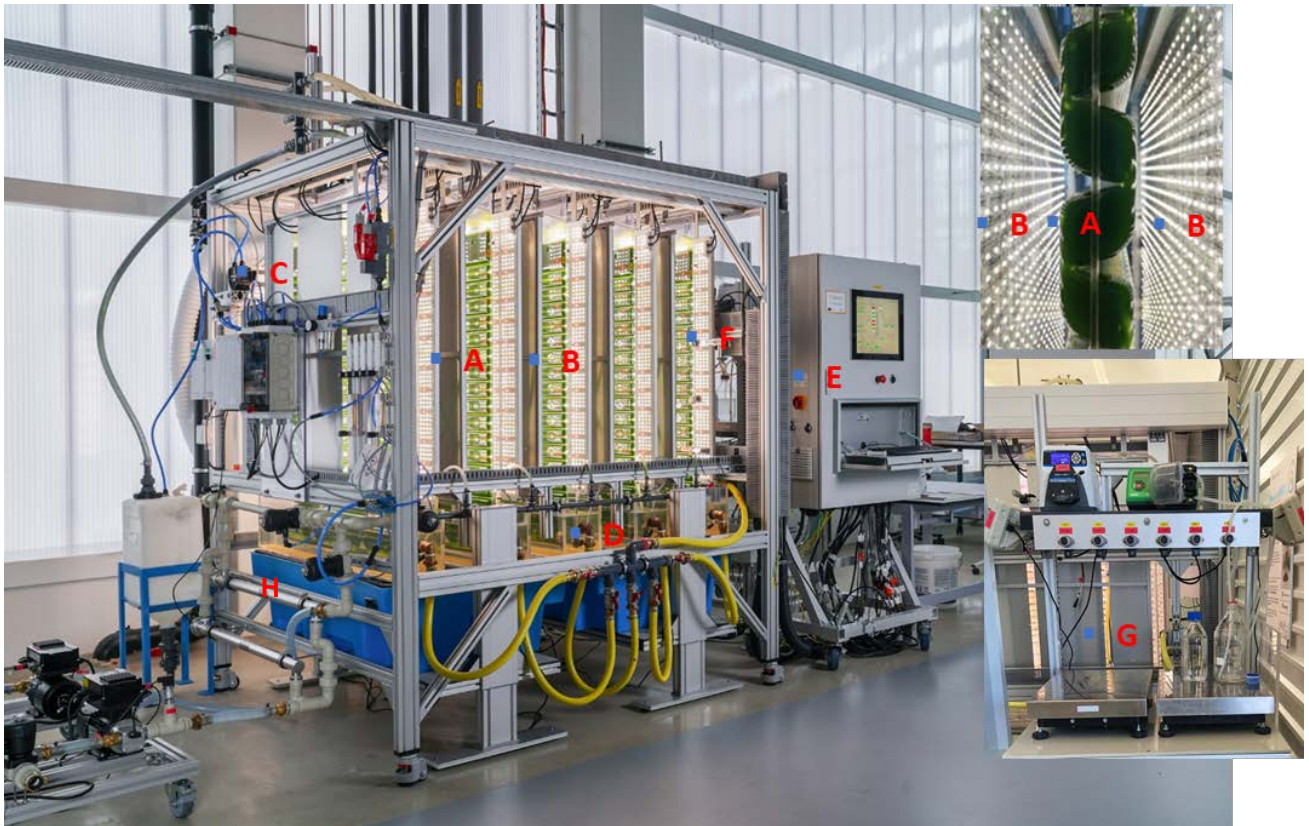


Abbildung 16: **Komponenten des 5x25L Stack-FPA-Reaktors:**

- **[A]** Flachplatten-Airliftreaktor Einzelpaneele
- **[B]** Die FPA-Reaktoren werden je Reaktoroberfläche mit einem LED-Panel beleuchtet
- **[C]** Eine Membranpumpe rezirkuliert den Abgasstrom (Luft + CO₂) zwischen Abluft und Zuluft
- **[D]** Die Kühlung erfolgt durch Eintauchen der Reaktoren in ein temperiertes Wasserbad
- **[E]** Steuerungseinheit mit Touchpanel. Erfassung und Speicherung der Prozessdaten (und der online-Daten der Sensoren [F])
- **[F]** Integrierte online-Sensoren: pH, Temp, Druck (Füllstandsmessung), AU (OD), CO₂- und O₂ gelöst.
- **[G]** Automatische Fütterung von Nährstoffen und Stellmittel
- **[H]** Sterilisation des Zulaufs (Medium oder Spülwasser) mittels UV
- Nicht gezeigt sind Mediums- und Erntebehälter

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Prototyps und der Übertragung der Ergebnisse aus den Laborversuchen, wurde jeweils eine Kultivierung mit *Phaeodactylum tricornutum* durchgeführt.

Abbildung 17 zeigt die Offline-Daten und daraus berechnete Biomasseproduktivität und Lichtausbeute für den Algenstamm *Phaeodactylum tricornutum*.

Die Anpassung der Lichtintensität über den AU-Sensor erfolgte ab Tag 5. Somit konnte die Lichtverfügbarkeit nahezu konstant gehalten werden.

Über die Integration einer Membranpumpe, die den Abgasstrom rezirkulierte konnte der CO₂-bedarf um den pH-Wert konstant zu halten um > 90% reduziert werden.

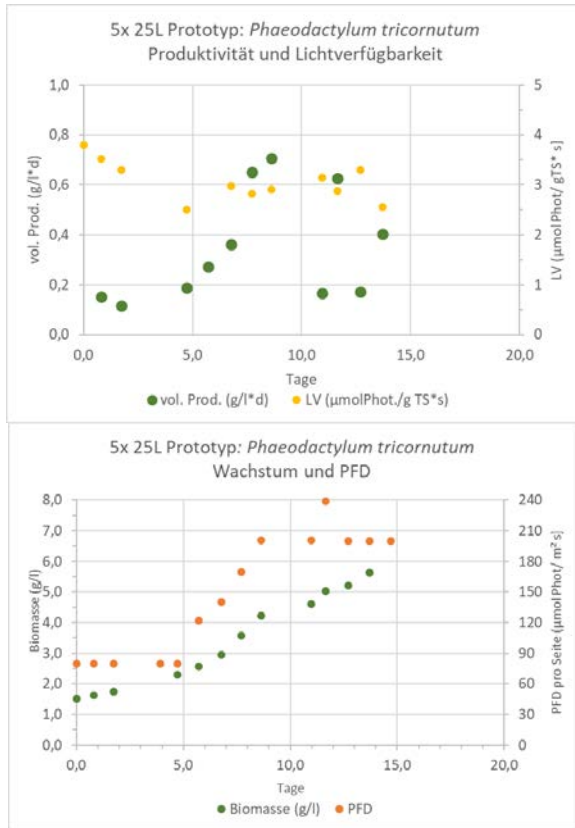


Abbildung 17: Kultivierung von *Phaeodactylum tricornutum* im 5 x 25L Prototypen. [A]: Zeitlicher Verlauf der Biomassekonzentration und der Lichtintensität PFD pro Reaktoroberfläche [$\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$]. [B]: Zeitlicher Verlauf von volumetrischer Biomasseproduktivität in [$\text{g TS l}^{-1}\text{d}^{-1}$] und Lichtverfügbarkeit [$\mu\text{mol Photonen gTS}^{-1}\text{s}^{-1}$].

Fazit: Der Prototyp eines neuen Modulreaktors wurde aufgebaut und das neue Beleuchtungs- und Steuerungskonzept etabliert und getestet. Die Funktionsfähigkeit des Prototyps 5 x 25L Modulreaktor konnte mit zwei Algenstämmen aufgezeigt werden. Für die Erweiterung des Steuerungskonzeptes wurden neue Komponenten und Sensoren, sowie das CO_2 -Abgasrückführungssystem erfolgreich etabliert und im Prozessverlauf eine mögliche Hemmung ausgeschlossen. Die im Labormaßstab optimierten Prozessparameter wurden auf den Prototypen übertragen. Die somit erzielten Biomasseproduktivitäten und Lichtausbeuten sind mit beiden Stämmen niedriger als im Labormaßstab. Daraus ergeben sich Ansatzpunkte für weitere Verbesserungen in der Prozessführung im skalierten Maßstab bzw. Komponenten die einer weiteren Optimierung bedürfen. Während der Kultivierung gab es Probleme mit der Temperierung durch den Einsatz von Kühlwasser aus der Hausleitung. Ein weiteres Problem war die Durchmischung zwischen den Reaktoren. Beides wurde zwischenzeitlich behoben und wird derzeit getestet.

AP. 2.4 Durchführbarkeitsstudie

Die Untersuchung konzentriert sich auf die Bereiche Astaxanthin-Akkumulation, Kultivierungsdauer, Stromkosten und die damit verbundenen Kosten pro kg Biomasse bzw. Endprodukt.

Hierfür wurde eine OPEX Betrachtung entwickelt, in der basierend auf den zwei Phasen der Kultivierung von *Haematococcus pluvialis* die direkt zuordenbaren Kosten in Relation zu dem Anteil des Hochwertstoffes gesetzt werden.

Der Produktionsprozess ist – abhängig von den Strompreisen – sehr stark bis überwiegend abhängig von dem Strompreis. Durch mehr Stromeinsatz können höherer Astaxanthingehalte erreicht werden. Im Gegensatz dazu erreicht man bei geringem Stromeinsatz nur geringe Astaxanthinanteile im Produkt.

Hieraus lassen sich letztlich Szenarien ableiten, die, je nach Strompreis und Astaxanthinkonzentration unterschiedliche Kosten pro Anteil Astaxanthin ermitteln.

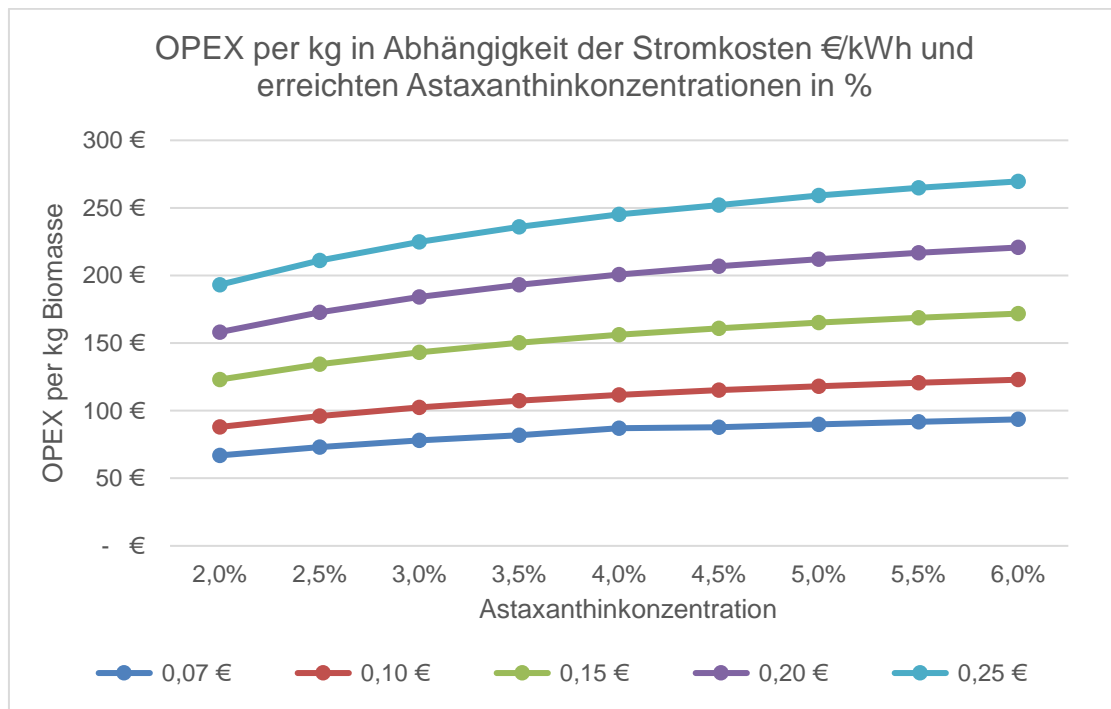


Abbildung 18: OPEX per kg in Abhängigkeit der Stromkosten €/kWh und erreichten Astaxanthingehalten in der Biomasse in %

Abbildung 18 zeigt den Einfluss der Strompreise auf die OPEX (Operational Expenditures, direkt zuordenbaren Produktionskosten) von *Haematococcus pluvialis* mit Fokus Astaxanthinproduktion. Auffällig ist einerseits der signifikante Einfluss des wichtigsten Kostenfaktors Energiekosten auf die gesamten OPEX. Bei zu erzielenden Astaxanthingehalten von 2% steigen die OPEX von einer Basis bei 7 Eurocent/kWh mit 67 Euro/kg auf knapp 193 Euro/kg bei 25 Eurocent/kWh und somit um Faktor 2,9 annähernd so stark wie die Energiekostensteigerung (Faktor 3,5).

Das eigentliche Interesse gilt aber der Frage der Produktionskosten von Astaxanthin. Je nach Astaxanthin Gehalt werden unterschiedliche Mengen an Biomasse zur Produktion von 1kg Astaxanthin benötigt. Um die Frage der Wirtschaftlichkeit der Astaxanthinproduktion unter Vernachlässigung des Zellaufschlusses zu beantworten, sind geringere Astaxanthinkonzentrationen erforderlich, um die gewünschte Bioverfügbarkeit zu erreichen und somit eine geringere Kostenstruktur im Downstreaming zu erreichen. Ist die Produktion von Astaxanthin mit geringerer Astaxanthinkonzentration aber wirtschaftlich im Vergleich zu hohen Astaxanthinkonzentrationen? Diese Fragestellung stellt aus unserer Sicht dem Kern da und die Basis der Marktfähigkeit des Ansatzes.

Die nachfolgende [Abbildung 19](#) zeigt daher die Kosten für ein kg Astaxanthin in Abhängigkeit von den Stromkosten (in Eurocent/kWh) sowie in Abhängigkeit von den Astaxanthinkonzentrationen (in %).

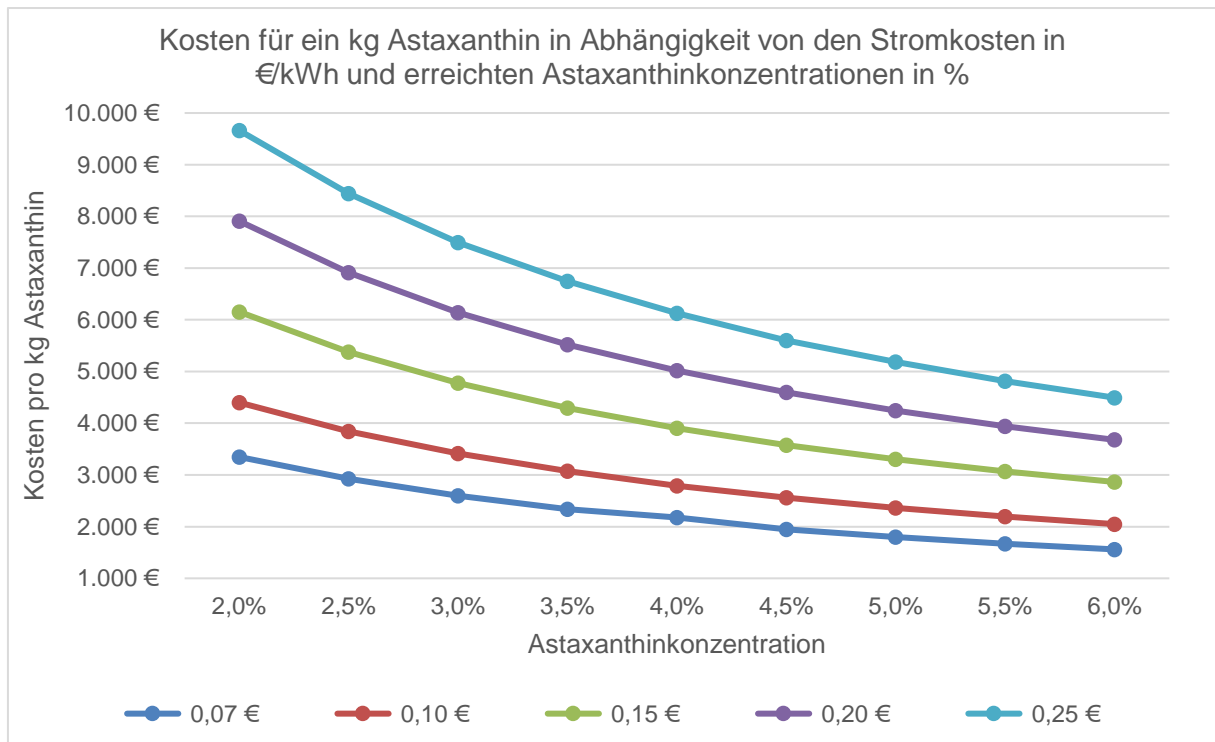


Abbildung 19: Kosten für ein kg Astaxanthin in Abhängigkeit von den Stromkosten in €/kWh und erreichten Astaxanthinkonzentrationen in %

Die Produktion von Astaxanthin auf Basis geringer Astaxanthinkonzentrationen von 2% schafft OPEX-Kosten von etwa 3.347 Euro/kg bei 7 Eurocent/kWh bzw. 9.662 Euro/kg bei 25 Eurocent/kWh. Auf Basis hoher Astaxanthinkonzentrationen von 6% sinken die Kosten stark auf OPEX-Kosten von etwa 1.560 Euro/kg bei 7 Eurocent/kWh bzw. 4.494 Euro/kg bei 25 Eurocent/kWh. Das Kilogramm Astaxanthinhaltiger Biomasse ist demnach bei Produktion von hochwertiger, also 6% haltiger Biomasse um 1.787 Euro/kg günstiger im Falle von Stromkosten von 7 Eurocent/kWh. Im Falle von 25 Eurocent/kWh steigt der Kostenunterschied auf 5.168 Euro/kg.

Im Ergebnis muss der Kostenvorteil aus dem Wegfall des Zellaufschlusses und der Extraktion beim Downstreaming mindestens so groß sein, wie der Kostenanstieg je nach standortindividuellen Stromkosten, um einen Kostenvorteil im Gesamtprozess zu erzielen.

Ziele und Auswirkung:

Ziel der Betrachtung war die gesamte Wertschöpfungskette in Bezug auf die Frage einer diskontinuierlichen Produktion sowie der wirtschaftliche Einsatz des Produktionsfaktors Strom. Bei alleiniger Betrachtung der Mikroalgenkultivierung ist der OPEX-Kostenvorteil von hohen Astaxanthingehalten durch entsprechende Kultivierung so überragend, dass die Kosteneinsparung im Downstreaming in Abhängigkeit von den standortindividuellen Energiekosten mindestens die Hälfte der Kultivierungskosten dieser Biomasse betragen muss, um einen Kostenvorteil zu generieren.

Arbeitspaket 3: Produktformulierung

AP 3.1: Vorbehandlung Biomasse

Nachfolgend wird das eingesetzte Aufschluss-Equipment „Hydrogrind“ und „Extruder“ kurz erläutert.

Extruder „DNDL44“

Die Extrusionsversuche wurden mit einem gleichsinnig drehenden Doppelwellen-Heißextruder der Firma Bühler durchgeführt (Typ DNDL-44, *Abbildung 20*).



Abbildung 20: Bühler DNDL-44 im Technikum des ttz Bremerhaven

- Gehäuseanzahl: 5 (à 4 D = 0,176 m)
- Gehäuse einzeln oder zusammenhängend temperierbar
- Heizmedium: Dampf
- Kühlmedium: Wasser
- Verfahrenslänge: 20 D (1 D = 0,044 m)
- Doppelschnecke
- Schneckenwellen gleichsinnig drehend
- Vielkeilwellen auf denen Förder-, Knet- und Scherelemente aufgesteckt sind
- Angepasst an die jeweilige Verfahrensaufgabe
- Schneckendurchmesser: 44 mm
- Schneckenlänge (ohne Kupplungsansatz): 0,88 m (entspr. 20 D)

Hydro-Grind

Die Aufschlussversuche mittels Hydrogrind-Verfahren wurden mit einem Hydro-Grind® der Firma AK-System durchgeführt.



Abbildung 21: Links: „Vermahlungskammer“ des Hydrogrind; Rechts: Steuereinheit des Hydrogrind

Das innovative Hydro-Grind-Verfahren der Firma AK System ist für Homogenisierungs-, Emulgier-, Misch- und Zerkleinerungsprozesse im Allgemeinen entwickelt worden, im Kosmetik-, Lebensmittel- und auch im Pharmabereich. Diese o.g. Prozesse werden durch eine Kombination aus schnell drehenden Scheiben, der sog. Dispergierturbine, erreicht. Durch die Scherwerkzeuge der Dispergierturbine werden Wechseldrücke (Kavitation) erzeugt und es entsteht zusätzlich noch eine innere Reibung im Produkt. Außerdem haben die rotierenden Scheiben noch eine Schneidfunktion. Das Wechselspiel aus diesen drei Wirkmechanismen ermöglicht die oben genannten Prozesse

AP3.1.1. Orientierende Aufschlussversuche bzw. Extrusionsversuche mit Spirulina

Zur visuellen Beurteilung des Aufchlusses wurde am ttz eine bildgebende Analysemethode mittels CLSM-Mikroskopie (confocal laser scanning microscopy bzw. konfokales Laser-Mikroskop) etabliert.

Da zu Beginn des Projektes sehr wenig bzw. keine Algenbiomasse, der in diesem Vorhaben fokussierten Spezies zur Verfügung stand, hat das ttz Bremerhaven für orientierende Aufschluss- bzw. Extrusionsversuche, sowie den Aufbau der Analyse-Infrastruktur auf kommerziell zu erwerbende, getrocknete Spirulina zurückgegriffen. Es ist darauf hinzuweisen, dass „Spirulina“ (Arthrospira sp.) zu den prokaryotischen Algen bzw. den Cyanobakterien zählen und im Vergleich zu der im Projekt fokussierten Algenbiomasse, eine vergleichsweise leichter aufzuschließende Zellwand aufweist.

Um einen Zellaufschluss bzw. eine Beschädigung der Zellen nachweisen zu können, wird zunächst die Größe bzw. die „Zellform“ der später zu bewertenden Algenart evaluiert. Zu diesem Zweck wurden Aufnahmen von einem getrockneten Spirulina-Pulver mit einem CLSM-Mikroskop (confocal laser scanning microscopy bzw. konfokales Laser-Mikroskop) gemacht (Abbildung 22).

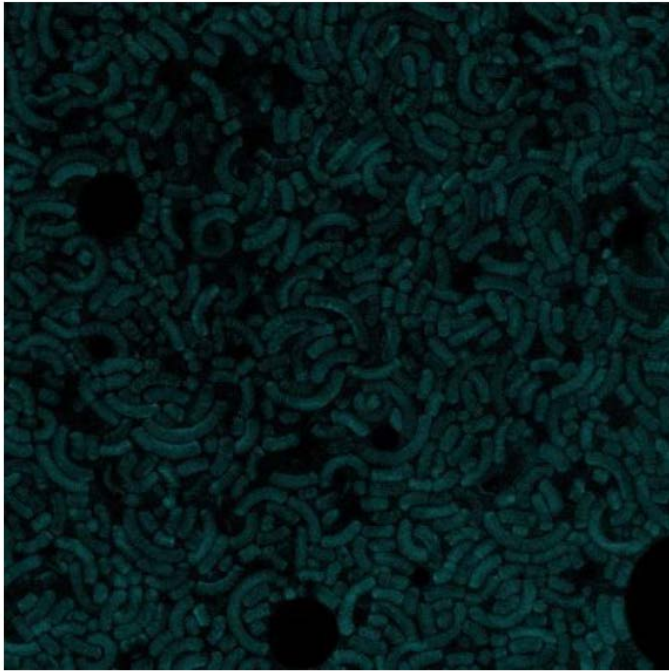


Abbildung 22: CLSM-Aufnahme von Spirulina-Pulver, typische „Spiralen- bzw. Helixform“ ist deutlich zu erkennen (Quelle: ttz Bremerhaven)

Anschließend wurde ein sog. Premix angemischt. Da dieser lediglich für Extrusionsversuche und nicht für Fütterungsversuche angemischt werden musste, wurde dieser so einfach wie möglich formuliert und auf teure additive wie bspw. Vitamine, Mineralien, Aminosäuren verzichtet (50% Fischmehl, 40% Weizenmehl, 10% Spirulina-Pulver) (Abbildung 23).

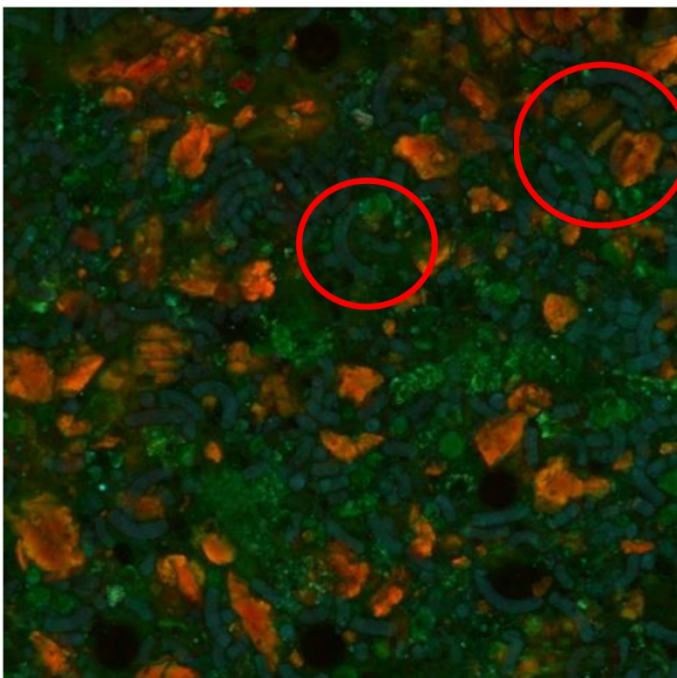


Abbildung 23: CLSM- Aufnahme eines Premixes (50% Fischmehl, 40% Weizenmehl, 10% Spirulina), deutlich zu erkennen sind die länglich runden Bruchstücke des eingemischten Spirulina-Pulvers

Anhand der CLSM-Aufnahmen des Premixes konnte gezeigt werden, dass die Spirulina-Teilchen in dem Premix identifiziert werden können und dass die Spirulina-Teilchen den Mischungsprozess größtenteils unbeschadet überstehen (längliche Teilchen, leicht gekrümmt).

Mit dem in Rede stehenden Premix wurde ein erster, orientierender Aufschlussversuch durch einen spezifischen Extrusionsprozess durchgeführt. In den nachfolgenden Tabellen ist das angewendete Schneckenprofil (*Tabelle 8*) sowie die Verfahrensparameter (*Tabelle 9*) dargestellt.

Tabelle 8: Verwendetes Schneckenprofil

Anzahl / Richtung	Einzug		Mischen	Fördern	Druck	Temp.	Scherzone			
	///	/	\\	/	///	///	\	/	\	///
Steigung [Grad]	66	44	Poly	66	44	33	44	44	44	33
Länge [mm]	66	44	20	66	44	33	15	15	15	33
Versetzt [Grad]	-	-	-	-	0	0	90	90	90	90

Tabelle 9: Verwendete Verfahrensparameter

Proben Nr.	Spirulina
Drehmoment [%]	31
Drehzahl [%]	52
Messergeschw. [%]	35
H ₂ O-Zugabe [kg/h]	4
Prod.-Dosierung [kg/h]	35
Druck [bar]	28
Temp. Modul 2 [°C]	100
Temp. Modul 3 [°C]	110
Temp. Modul 4 [°C]	120
Temp. Modul 5 [°C]	130

Im Anschluss an die Extrusion wurden die Pellets auf eine Restfeuchte von 4% getrocknet, vermahlen und mittels CLSM-Mikroskopie untersucht.

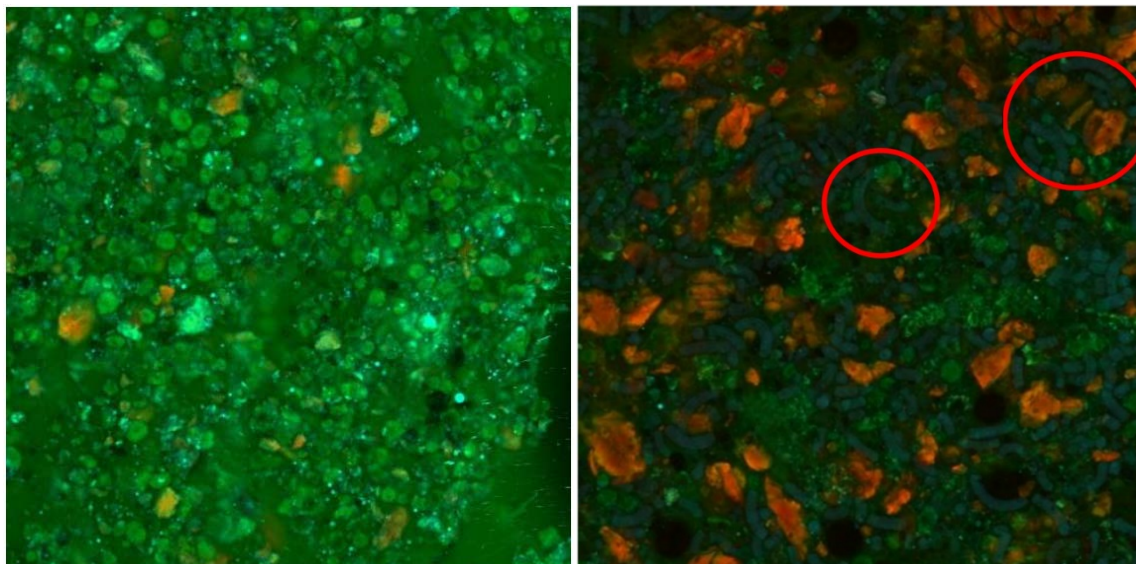


Abbildung 24: CLSM-Aufnahme des getrockneten und vermahlenden Extrudates (links) und eine CLSM-Aufnahme des Premixes (rechts). Es können keine Spirulina-Teilchen im Extrudat identifiziert werden.

Anhand der CLSM-Aufnahme (*Abbildung 24*) können keine Spirulina-Teilchen identifiziert werden. Dies ist als Erfolg zu werten und kann auf eine Zerstörung/ Aufschluss der Spirulina-Zellen hindeuten. Die

Versuche bilden somit eine wichtige Grundlage zur Vorbereitung der Aufschlussversuche von repräsentativer Mikroalgen-Biomasse.

AP3.1.2. Aufschlussversuche mittels „Hydrogrind-Verfahren“ und Extrusionsverfahren von *Phaeodactylum tricornutum*

Um entsprechende Versuche mit repräsentativer Biomasse, in Bezug auf die Zellhärte durchführen zu können, hat das Fraunhofer CBP dem ttz Bremerhaven 18kg *Phaeodactylum*-Slurry (20% Trockenmasse) bereitgestellt.

Um einen Zellaufschluss bzw. eine Beschädigung der Zellen nachweisen zu können, musste wie bei den orientierenden „Spirulina-Versuchen“, zunächst die Größe bzw. die „Zellform“ des „*Phaeodactylum*-Slurries“ bzw. einer *Phaeodactylum*-Zelle bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden CLSM-Mikroskop Aufnahmen von einem *Phaeodactylum*-Slurry gemacht (*Abbildung 25*).

Abbildung 25 verdeutlicht die typische Form der Mikroalge *Phaeodactylum tricornutum*.

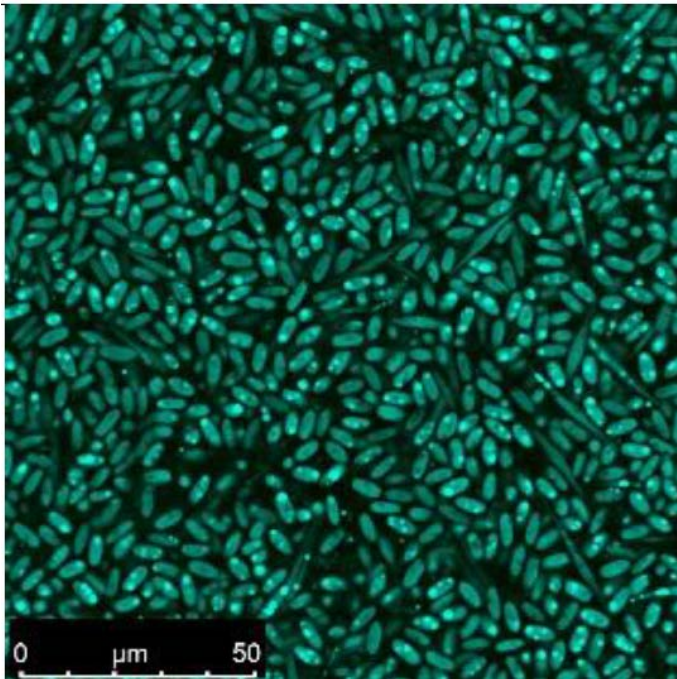


Abbildung 25: CLSM-Aufnahme des Phaeodactylum-Slurries (Vergrößerung 63x)

Aufschlussversuche von *Phaeodactylum tricornutum* mittels Hydrogrind-Verfahren

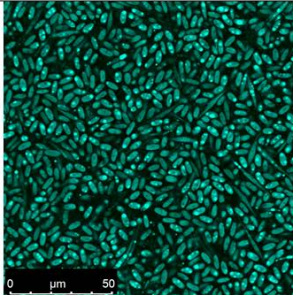
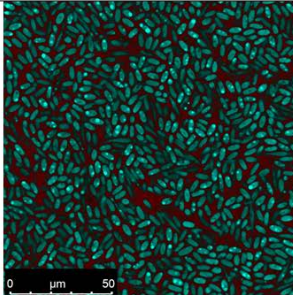
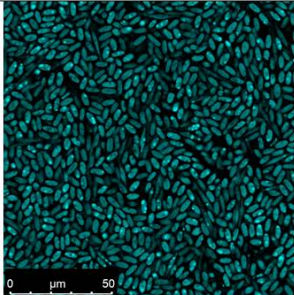
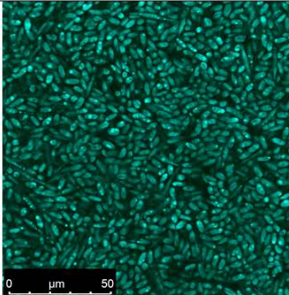
Um möglichst hohe Energieeinträge zu generieren, wurden die in Rede stehenden Aufschlussversuche mittels Hydrogrind-Verfahren, mit höchster Drehzahl und maximaler Leistung gefahren. Eine Probenentnahme aus der „Turbinenkammer“ erfolgte jeweils nach 0, 5, 15 und 25 Minuten Scherung.



Abbildung 26: „Dispergierturbine“ des Hydrogrind (links) und *Phaeodactylum*-Slurry nach 25 Minuten Scherung (rechts).

Die nach 0, 5, 15 und 25 Minuten Vermahlungsdauer entnommenen Proben, wurden dann mittels CLSM-Mikroskopie untersucht. (Abbildung 26)

Tabelle 10: CLSM-Aufnahmen von *Phaeodactylum*-Slurry (20% Trockensubstanz, (Vergrößerung 63x) nach 0, 5, 15 und 25 Minuten Nassvermahlung im sog. „Hydrogrind“

Referenz	5 Minuten	15 Minuten	25 Minuten
			

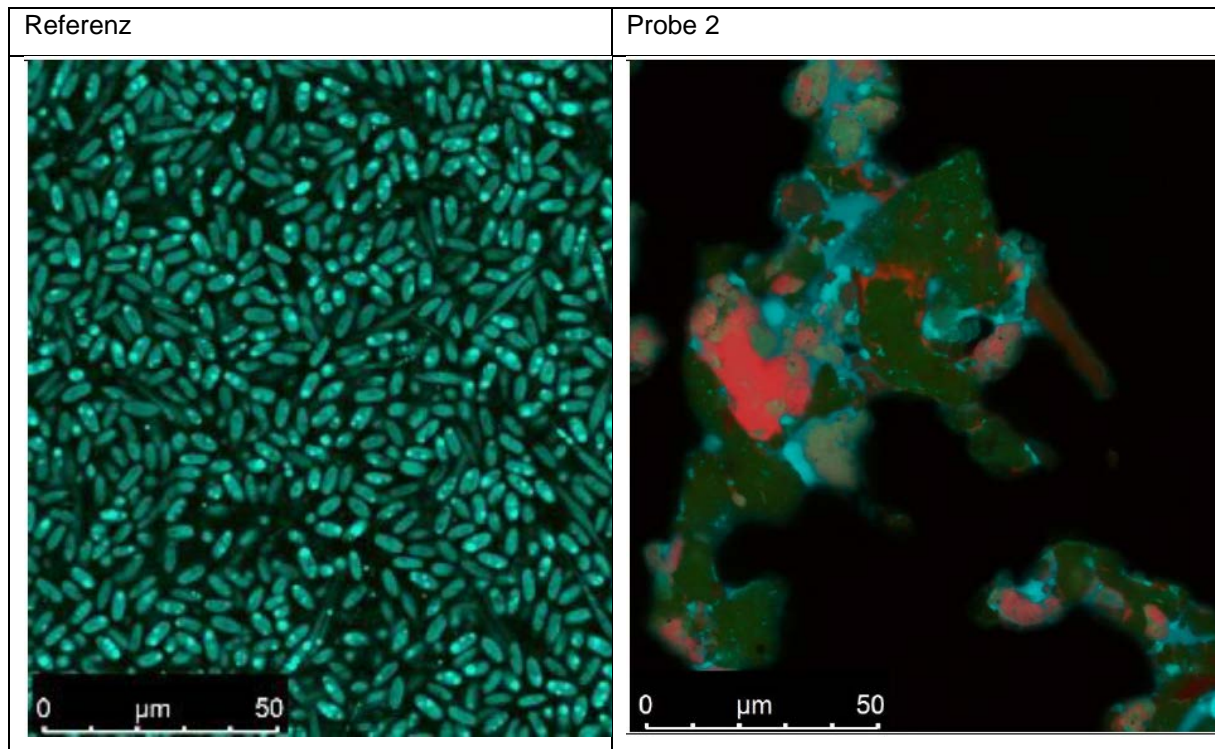
Die in *Tabelle 10* dargestellten CLSM Aufnahmen zeigen, dass die Zellen des *Phaeodactylum*-Slurries mit dem sog. Hydrogrind-Verfahren wahrscheinlich nicht aufgeschlossen werden können. Visuell können keine Änderungen der Algenzelle bzw. Zellwand detektiert werden. Selbst nach 25 Minuten Vermahlung/ Scherung sind die Zellen anscheinend unbeschädigt. Über eine eventuelle Schwächung bzw. Perforierung der Zellwand kann die CLSM-Methode allerdings bislang noch keine Auskunft geben.

Aufschlussversuche von *Phaeodactylum tricornutum* mittels Extrusions-Verfahren

Die Aufschlussversuche von *Phaeodactylum tricornutum* mittels Extrusions-Verfahren, wurden wie bei den orientierenden Versuchen, mit einem gleichsinnig drehenden Doppelwellen-Heißextruder der Firma Bühler durchgeführt (Typ DNDL-44, s. *Abbildung 20*). Ebenfalls wurde die gleiche Schneckenkonfiguration (vgl. *Tabelle 8*) verwendet.

Der *Phaeodactylum*-Slurry wurde mittels Schlauchpumpe in den Extrusionsprozess eingebracht. Als Premix wurde eine Mischung aus 50% Fischmehl und 50% Weizenmehl verwendet. Der Massenstrom des Premixes und der Massenstrom der Schlauchpumpe, wurden so aufeinander abgestimmt, dass 10% *Phaeodactylum*-Slurry in den Prozess eingetragen wurden (Massenstrom Premix = 35kg/h, Massenstrom Algenlurry = 3,5kg/h).

Tabelle 11: CLSM-Aufnahme des unbehandelten *Phaeodactylum*-Slurries bzw. Referenz (Vergrößerung 63x) und eine CLSM-Aufnahme des vermahlenden Extrudats „Probe 2“ (Vergrößerung 63x).



In *Tabelle 11* wurde stellvertretend für mehrere Extrudate bzw. Verfahrensparameter nur die Aufnahme der „Probe 2“ dargestellt. Da bei „Probe 2“ die höchste Drehzahl und resultierend der höchste Druck während der Extrusion herrschten. Werden die Aufnahme der Referenz und die Aufnahme des vermahlenden Extrudats „Probe 2“ miteinander verglichen, kann keine *Phaeodactylum*-Zelle im Extrudat „Probe 2“ identifiziert werden. Dies kann für einen geglückten Aufschluss sprechen.

Tabelle 12: Verwendete Verfahrensparameter bei den Aufschlussversuche mittels Extrusion

Proben Nr.	Probe1	Probe2	Probe3
Drehmoment [%]	26	23	44
Drehzahl [%]	45	70	24
Messergeschw. [%]	32	32	32
H ₂ O-Zugabe [kg/h]	2,8	2,2	2,2
Prod.-Dosierung [kg/h]	35	35	35
Druck [bar]	30	35	32
Temp. Modul 2 [°C]	100	100	100
Temp. Modul 3 [°C]	110	110	110
Temp. Modul 4 [°C]	120	120	120
Temp. Modul 5 [°C]	130	130	130

Hochdruckanlage „SITEC 101-4000-S(HK-PLC-Y)“

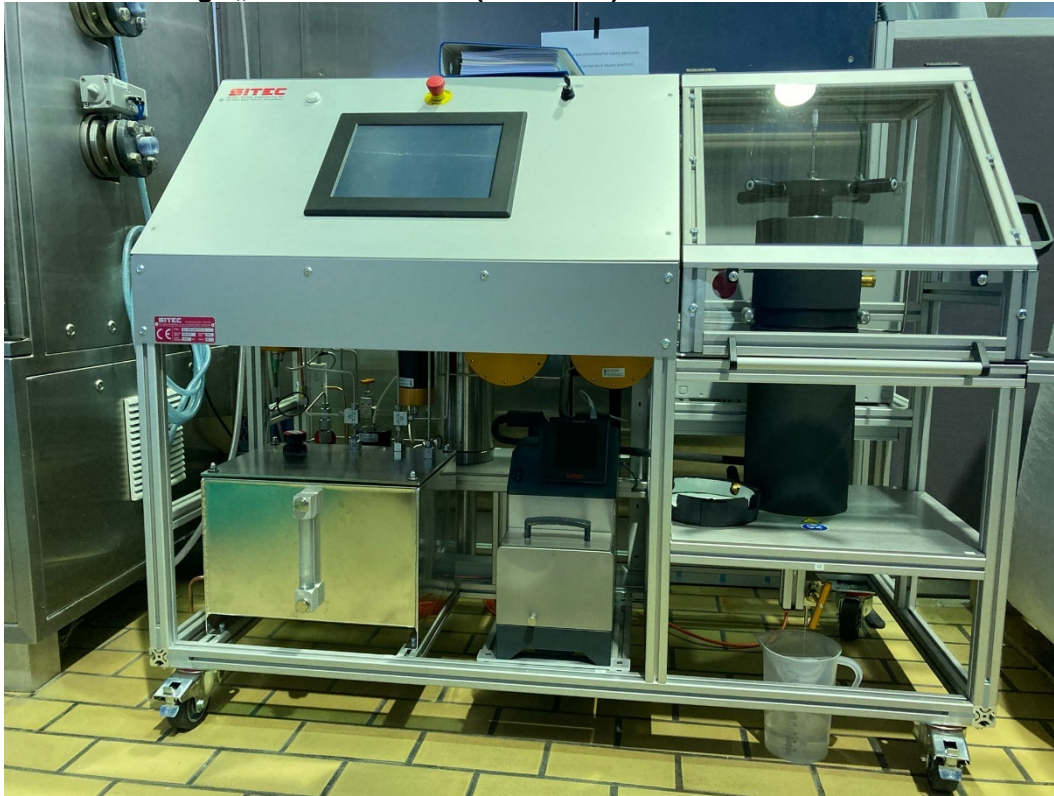


Abbildung 27: Hochdruckanlage „SITEC 101-4000-S(HK-PLC-Y)“ im Technikum des ttz-Bremerhaven

Die Aufschlussversuche wurden mit einer SITEC Hochdruckanlage durchgeführt (vgl. *Abbildung 27* und *Abbildung 28*)

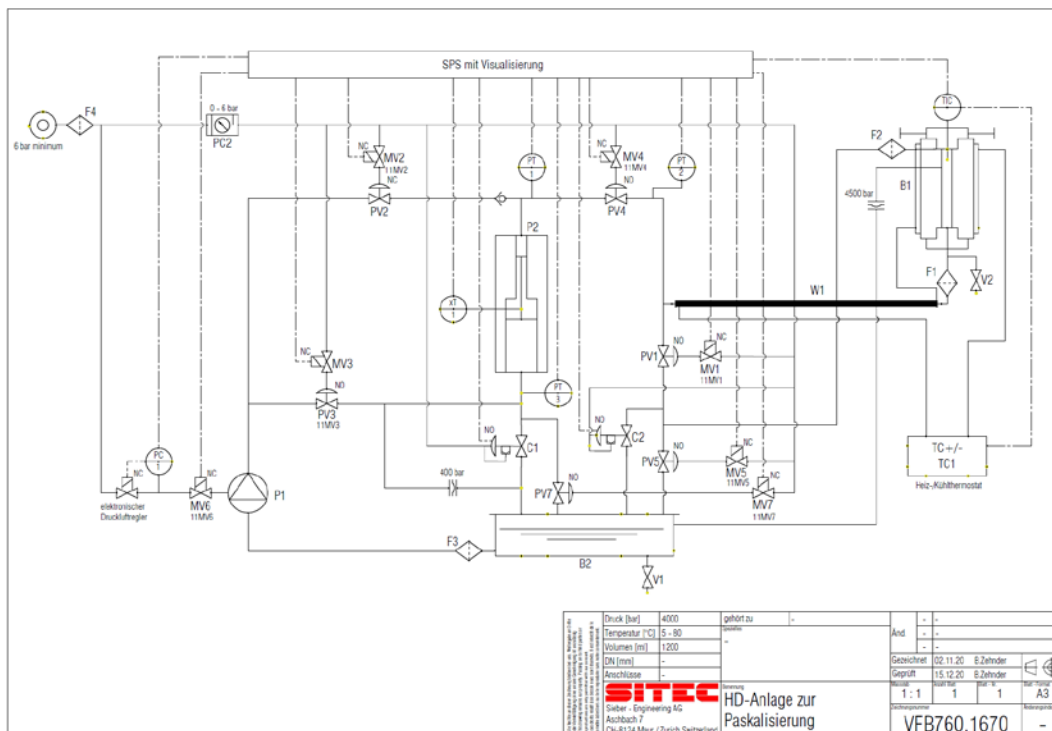


Abbildung 28: Verfahrensfließbild der Hochdruckanlage „SITEC 101-4000-S(HK-PLC-Y)“

- Druckbehälter für Anwendungen im Bereich von 0 bar bis 4000 bar.
- Druckbehälter für Feststoffe oder Flüssigkeiten mit einem Mindestinnenvolumen von 800 ml
- Druckübertragungsmedium: Wasser

- Temperierbare Druckkammer
 - o Einfach zu öffnen und zu reinigen
 - o Temperierung der Sterilisationszelle mittels Heiz-/Kühlelement
 - o Sterilisationstemperaturen: 5-80 °C
- Temperierung des Druckübertragungsmediums mittels Wärmetauscher
 - o Arbeitstemperaturbereich: -10°C - + 80°C
- Hochdruck-Apparatur: fahrbar

Aufschlussversuche mit Hochdruck-Anlage „SITEC 101-4000-S(HK-PLC-Y)“

Da die *Haematococcus*-Zellen während der Extrusion nicht ausreichend beschädigt wurden, bzw. vom Zielorganismus das enthaltene Astaxanthin nicht ausreichend verstoffwechselt werden konnte, wurden Aufschlussversuche in einer Hochdruckanlage durchgeführt.

Hierbei wurden zwei unterschiedliche Profile angewendet.

Profil 1: 20 °C, 4000 bar, 60 Minuten

Profil 2: 80°C, 4000 bar, 60 Minuten

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Hochdruck-Behandlung bzw. der mikroskopischen Untersuchung als Abbildungen dargestellt.

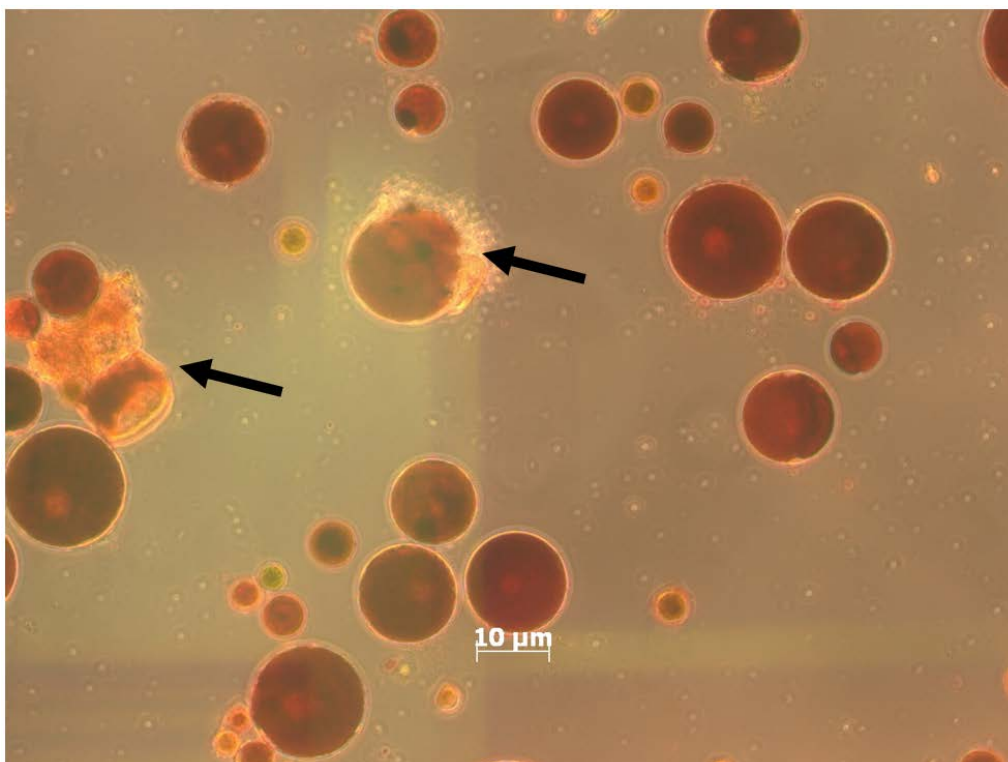


Abbildung 29: Haematococcus-Biomasse nach der Druck-Behandlung bei 20°C und 4000 bar, Pfeile kennzeichnen deutlich beschädigte Zellen (Aufnahme erstellt durch Fraunhofer).

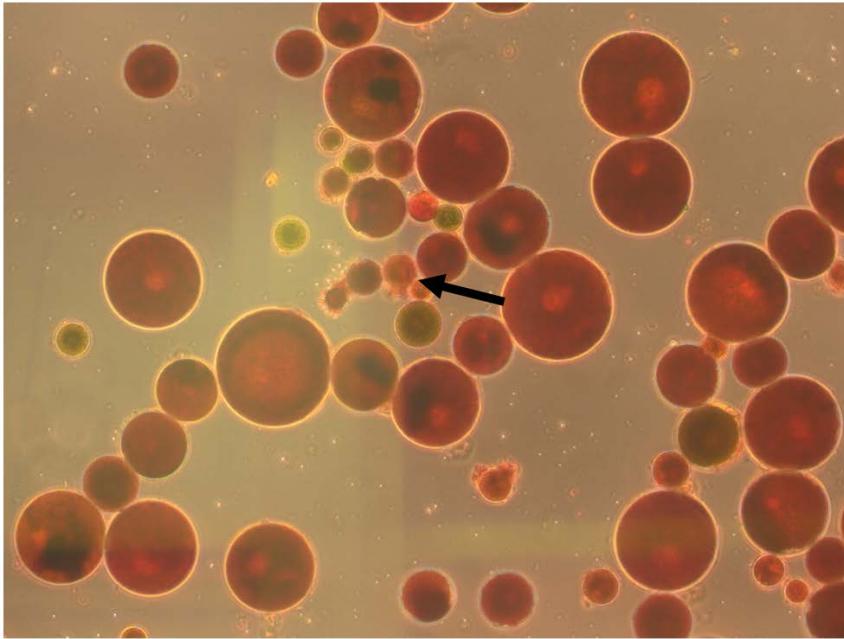


Abbildung 30: Haematococcus-Biomasse nach der Druck-Behandlung bei 20°C und 4000 bar, resuspendiert, Pfeile kennzeichnen deutlich beschädigte Zellen (Aufnahme erstellt durch Fraunhofer).

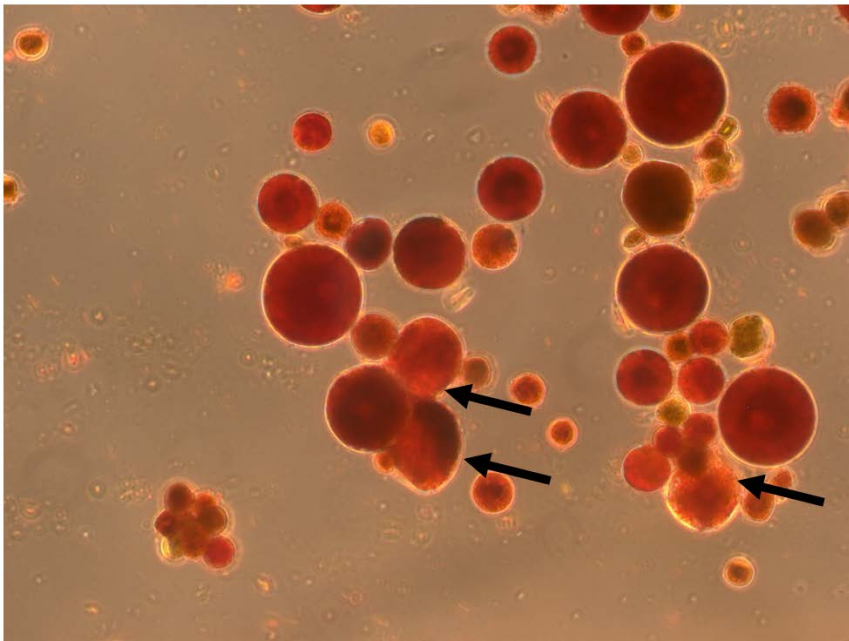


Abbildung 31: Haematococcus-Biomasse nach der Druck-Behandlung bei 80°C und 4000 bar, Pfeile kennzeichnen deutlich beschädigte Zellen (Aufnahme erstellt durch Fraunhofer).

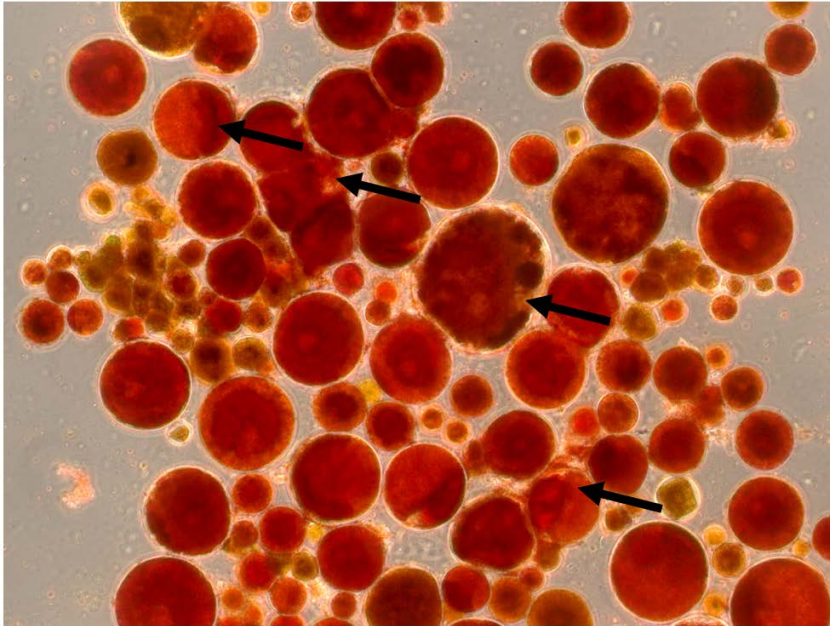


Abbildung 32: Haematococcus-Biomasse nach der Druck-Behandlung bei 80°C und 4000 bar, resuspendiert, Pfeile kennzeichnen deutlich beschädigte Zellen (Aufnahme erstellt durch Fraunhofer).

Der Vergleich von *Abbildung 29 bis Abbildung 32* zeigt, dass die durchgeführten Hochdruck-Behandlungen großes Potential im Bereich des Zell-Aufschlusses aufweisen. Hierbei scheint eine Druckbehandlung bei 80°C zu deutlich mehr beschädigten Haematococcus-Zellen zu führen als bei 20°C. Jedoch ist eine derartige Behandlung aus kommerzieller Sicht zu teuer und es wurde am Fraunhofer Institut ein Aufschluss mittels Hochdruckhomogenisation durchgeführt.

AP 3.2: Pelletierung im Extruder

3.2.1 Verwendetes Pelletierungsequipment

Nachfolgend wird das eingesetzte Aufschluss-Equipment kurz erläutert.

Extruder „DNDL44“

Die Extrusionsversuche wurden mit einem gleichsinnig drehenden Doppelwellen-Heißextruder der Firma Bühler durchgeführt (Typ DNDL-44, *Abbildung 33*).



Abbildung 33: Bühler DNDL-44 im Technikum des ttz Bremerhaven

- Gehäuseanzahl: 5 (à 4 D = 0,176 m)
- Gehäuse einzeln oder zusammenhängend temperierbar
- Heizmedium: Dampf
- Kühlmedium: Wasser
- Verfahrenslänge: 20 D (1 D = 0,044 m)
- Doppelschnecke
- Schneckenwellen gleichsinnig drehend
- Vielkeilwellen auf denen Förder-, Knet- und Scherelemente aufgesteckt sind
- Angepasst an die jeweilige Verfahrensaufgabe
- Schneckendurchmesser: 44 mm
- Schneckenlänge (ohne Kupplungsansatz): 0,88 m (entspr. 20 D)

AP3.2.2 Herstellung eines Forellenfutters mit *Haematococcus*

Die Versuche wurden auch durchgeführt um zu überprüfen, ob die Zellwände einer *Haematococcus*-Algenbiomasse (3% Astaxanthingehalt) während eines herkömmlichen Heiß-Extrusionsverfahrens bzw. einer Futterherstellung zerstört bzw. beschädigt werden können. Dem Zielorganismus würde somit das natürliche Astaxanthin aus der *Haematococcus*-Zelle verfügbar gemacht werden. Grundlage der Versuche war eine *Haematococcus*-Biomasse mit 3% Astaxanthingehalt.



Abbildung 34: Am ttz-Bremerhaven hergestelltes Versuchsfutter, sinkend, 3mm Durchmesser. Links: Kontrollfutter ohne Astaxanthin; Mitte: *Haematococcus*-Futter; Rechts: Kontrollfutter mit Astaxanthin.

In *Abbildung 34* sind die unterschiedlichen Futter dargestellt, welche am ttz Bremerhaven hergestellt wurden. Hierbei wurde die Empfehlung der Aller Aqua Research GmbH berücksichtigt und drei Varianten eines Futters produziert. Die unterschiedlichen Zusammensetzungen bzw. Formulierungen sind in *Tabelle 13* dargestellt.

Tabelle 13: Verwendete Formulierungen

Rohstoffe %	Kontrolle ohne Astaxanthin	Kontrolle mit Astaxanthin	Haematococcus-Futter
Fischmehl	30	30	30
Lachs-Öl	15	15	15
Weizenmehl	54,6	54,5	54,47
Vitamine, Mineralien, Antioxidantien	0,4	0,4	0,4
Astaxanthin "kommerziell"		0,1	
Haematococcus 3%			0,13

Gängige Praxis ist ein Astaxanthingehalt von 40ppm im Futter. Aus diesem Grund wurden 0,13% *Haematococcus*-Biomasse, mit einem Astaxanthingehalt von 3%, in dem Futter eingesetzt. So konnte ein Astaxanthingehalt von 40ppm erzielt werden.

Die Verfahrensparameter unter denen die in Rede stehenden Futtervarianten extrudiert wurden, sind in *Tabelle 14* dargestellt. Bei dem *Haematococcus*-Futter wurde während der Extrusion die H₂O-Zugabe reduziert, um hohe Scherung und Druck zu erzeugen. Dies sollte dazu führen, dass die Zellwände der *Haematococcus*-Alge beschädigt werden.

Tabelle 14: Verwendete Verfahrensparameter

Proben Nr.	Haematococcus-Futter	Kontrolle mit Astaxanthin	Kontrolle ohne Astaxanthin
Drehmoment [%]	43	38	38
Drehzahl [%]	44	44	44
Messergeschw. [%]	31	31	31
H ₂ O-Zugabe [kg/h]	4,1	5,6	5,6
Prod.-Dosierung [kg/h]	41	41	41
Druck [bar]	51	37	38
Temp. Modul 2 [°C]	100	100	100
Temp. Modul 3 [°C]	110	110	110
Temp. Modul 4 [°C]	120	120	120
Temp. Modul 5 [°C]	130	130	130

Das bei den Extrusionsversuchen verwendete Schneckenprofil ist in *Tabelle 15* dargestellt.

Tabelle 15: Verwendetes Schneckenprofil

	Einzug		Mischen	Fördern	Druck	Temp.	Scherzone			
Anzahl / Richtung	///	/	\\	/	/// ///	///	\	/	\	///
Steigung [Grad]	66	44	Poly	66	44	33	44	44	44	33
Länge [mm]	66	44	20	66	44	33	15	15	15	33
Versetzt [Grad]	-	-	-	-	0	0	90	90	90	90



Abbildung 35: Foto der verwendeten Schneckenkonfiguration

Im Anschluss an die Extrusion wurden die Pellets auf eine Restfeuchte von 4% getrocknet.

Für die Trocknung der Futterpellets wurde ein Wirbelschicht-Trockner (Typ: OTW-25/50) der Firma Bühler verwendet. Um eine Mindesthaltbarkeit der Futterpellets zu gewährleisten, welche mindestens den angestrebten Zeitraum der Fütterungsversuche anhält, wurde auf eine Restfeuchte von etwa 4% getrocknet. Dafür wurde 15 Minuten bei 140°C und stark fluidisiertem Trocknungsgut getrocknet (*Abbildung 36*).



Abbildung 36: Nahaufnahme der fluidisierten Futterpellets während der Trocknung.

AP3.2.3: Herstellung von Pellets zur Ermittlung des Einflusses eines Extrusions- und Trocknungsprozesses auf aufgeschlossene Haematococcus-Zellen.

Aufschlussversuche von *Haematococcus*-Zellen am ttz Bremerhaven, mittels Extrusion, Nassvermahlung und Hochdruckbehandlung haben gezeigt, dass mittels der im Antrag favorisierten Verfahren kein oder nur ein unzureichender Aufschluss erreicht werden konnte. Deshalb wurde am Fraunhofer IGB, mittels eines speziellen Hochdruck-Homogenisierungsverfahrens *Haematococcus*-Biomasse aufgeschlossen.

Für eine spätere kommerzielle Anwendung der aufgeschlossenen Biomasse, ist es essentiell zu wissen, wie sich ein Extrusions- und Trocknungsprozess auf die aufgeschlossenen *Haematococcus*-Zellen bzw. im speziellen das in der Zelle enthaltene Astaxanthin, auswirkt.

Dem ttz Bremerhaven wurde hierfür eine aufgeschlossene *Haematococcus*-Biomasse, mit einer Trockenmasse von 93% und einem Astaxanthingehalt von 6,4 % zur Verfügung gestellt.

Um die wirkenden Kräfte (Druck, Scherung, Temperatur und Reibung) auf das Astaxanthin möglichst repräsentativ abbilden zu können, wurde die getrocknete Algen-Biomasse in eine Trockenmischung, bestehend aus Fischmehl, Weizenmehl und Fisch-Öl eingemischt, welche in der Regel die Hauptkomponenten eines Fischfutters darstellen (s. *Tabelle 16*). Auf weitere Zutaten wie bspw. Soja, Vitamine, Mineralien und Proteinkonzentrate, wurde aus Gründen der Ressourcenschonung verzichtet, da diese nur in geringen Mengen im Fischfutter eingesetzt werden und keinen signifikanten Einfluss auf die oben genannten Extrusionskräfte haben.

Herkömmliches, kommerziell erworbenes Astaxanthin, ist in der Regel mit einem speziellen Überzug aus bspw. Fett oder anderen schützenden Substanzen überzogen. Hierdurch soll sichergestellt werden, dass weder die im Herstellungsprozess wirkenden Kräfte noch Oxidation das empfindliche Astaxanthin zerstören. Das verwendete Astaxanthin bzw. die verwendete Algen-Biomasse lag pur, ohne schützendes Coating oder ähnliches vor. Ebenfalls wurde auf Antioxidationszusätze im Fischfutter bzw. der Trockenmischung verzichtet. Nur so kann der Einfluss eines Fischfutter-Herstellungsprozesses unverfälscht evaluiert werden.

Die Astaxathingehalte in kommerziellen Salmonidenfutter, variieren je nach Hersteller und gegebenen Anwendungsbedingungen. Als grober, repräsentativer Richtwert, wurden in Rücksprache mit der Aller Aqua Research GmbH 40 ppm Astaxathingehalt identifiziert.

Für die Versuche wurde Futter mit einem Astaxanthingehalt von jeweils 40 ppm, 80 ppm und 120 ppm hergestellt (s. [Tabelle 16](#)). Die Motivation hierbei war, bei einem möglichen Einfluss des Fischfutter-Herstellungsverfahrens, auf die chemische Beschaffenheit des Astaxanthins, quantitative Abhängigkeiten identifizieren und verstehen zu können.



Abbildung 37: Am ttz-Bremerhaven hergestelltes „Versuchsfutter“, sinkend, 3mm Durchmesser. Links: Futter und Trockenmischung mit 40 ppm Astaxanthin; Mitte: Futter und Trockenmischung mit 80 ppm Astaxanthin; Rechts: Futter und Trockenmischung mit 120 ppm Astaxanthin.

In [Abbildung 37](#) sind die unterschiedlichen Futter dargestellt, welche am ttz Bremerhaven hergestellt wurden. Die unterschiedlichen Zusammensetzungen bzw. Formulierungen sind in [Tabelle 16](#) dargestellt.



Abbildung 38: Futter mit 0,067% Haematococcus-Biomasse bzw. 40 ppm Astaxanthin.



Abbildung 39: Futter mit 0,135% Haematococcus-Biomasse bzw. 80 ppm Astaxanthin.



Abbildung 40: Futter mit 0,203% Haematococcus-Biomasse bzw. 120 ppm Astaxanthin.

Optisch unterscheiden sich die produzierten Pellets und die Trockenmischungen in Bezug auf die Färbung (vgl. *Abbildung 38, Abbildung 39 und Abbildung 40*). Mit zunehmendem *Haematococcus*-Anteil erhalten die Pellets eine kräftigere, rötliche Färbung. In Bezug auf Schüttdichte, Extrusionsverhalten (s. *Tabelle 14*) und Trocknungsverhalten konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Tabelle 16: Verwendete Formulierungen

Rohstoffe %	40 ppm Astaxanthin	80 ppm Astaxanthin	120 ppm Astaxanthin
Fischmehl	49,72	49,68	49,64
Weizenmehl	49,72	49,68	49,64
Fisch-Öl	0,5	0,5	0,5
<i>Haematococcus</i> "6,4% Astaxanthin"	0,067	0,135	0,203

Dem ttz Bremerhaven stand *Haematococcus*-Biomasse, mit einer Trockenmasse von 93 % und einem Astaxanthingehalt von 6,4 % zur Verfügung.

Aus diesem Grund wurden 0,067 %; 0,135 % und 0,203 % *Haematococcus*-Biomasse, in dem Futter eingesetzt. So konnte ein Astaxanthingehalt von 40 ppm, 80 ppm und 120 ppm erzielt werden.

Die Verfahrensparameter unter denen die in Rede stehenden Futtervarianten extrudiert wurden, sind in *Tabelle 17* dargestellt. Bei der Betrachtung fällt auf, dass die *Haematococcus*-Biomasse in den eingesetzten Mengen (vgl. *Tabelle 16*) keinen Einfluss auf die resultierenden Prozessparameter hat.

Tabelle 17: Verwendete Verfahrensparameter

Proben Nr.	40 ppm Astaxanthin	80 ppm Astaxanthin	120 ppm Astaxanthin
Drehmoment [%]	30	30	30
Drehzahl [%]	45	45	45
Messergeschw. [%]	24	24	24
H ₂ O-Zugabe [kg/h]	8	8	8
Prod.-Dosierung [kg/h]	43	43	43
Druck [bar]	31	31	31
Temp. Modul 2 [°C]	100	100	100
Temp. Modul 3 [°C]	110	110	110
Temp. Modul 4 [°C]	120	120	120
Temp. Modul 5 [°C]	130	130	130

Das bei den Extrusionsversuchen verwendete Schneckenprofil ist in *Tabelle 18* dargestellt.

Tabelle 18: Verwendetes Schneckenprofil

	Einzug		Mischen	Fördern	Druck	Temp.	Scherzone			
Anzahl / Richtung	///	/	\\	/	/// ///	///	\	/	\	///
Steigung [Grad]	66	44	Poly	66	44	33	44	44	44	33
Länge [mm]	66	44	20	66	44	33	15	15	15	33
Versetzt [Grad]	-	-	-	-	0	0	90	90	90	90



Abbildung 41: Foto der verwendeten Schneckenkonfiguration

Im Anschluss an die Extrusion wurden die Pellets auf eine Restfeuchte von 4 % getrocknet.

Für die Trocknung der Futterpellets (Abbildung 41) wurde ein Wirbelschicht-Trockner (Typ: OTW-25/50) der Firma Bühler verwendet (s. [Abbildung 33](#)). Es wurde 15 Minuten bei 140°C und stark fluidisiertem Trocknungsgut getrocknet ([Abbildung 42](#)).



Abbildung 42: Nahaufnahme der fluidisierten Futterpellets während der Trocknung.

AP3.3 Analytischer Nachweis der Bioverfügbarkeit von Futterpellets mit Astaxanthin-haltiger Haematococcus-Biomasse

Etablierung der Analysenmethode

Für den Nachweis der Bioverfügbarkeit wurde als Methode der Vergleich der Extraktion von Astaxanthin aus *Haematococcus*-Biomasse mit Aceton und DMSO gewählt. In einem früheren Projekt konnte mit Aceton als Lösemittel eine nahezu 100%ige Extraktion von Astaxanthin in aufgeschlossener Biomasse erzielt werden. Mit unaufgeschlossener, getrockneter *Haematococcus*-Biomasse konnte mit Aceton kein Astaxanthin extrahiert werden. Es ist bekannt, dass mit steigendem Astaxanthingehalt die Dicke und Stabilität der Zellwand von *Haematococcus* zunimmt.

Im Vergleich dazu wird mit DMSO als Extraktionsmittel, das in *Haematococcus*-Zellen eindringen kann und Astaxanthin solubilisiert der gesamt-Astaxanthingehalt einer Probe bestimmt. Dies dient als Standardnachweis für den Astaxanthingehalt von *Haematococcus*-Biomasse. Damit steht ein System zur Verfügung mit welchem zwischen Gesamt-Astaxanthingehalt und bioverfügbarem Astaxanthingehalt differenziert werden kann.

Dieses Nachweissystem wurde erneut überprüft mit bereits aufgeschlossener *Haematococcus*-Biomasse, die der Partner Subitec von der Firma Algamo aus Tschechien bezogen und den Projektpartnern zur Verfügung gestellt hat. Der Aufschlussgrad der Biomasseprobe wurde erneut überprüft, indem die Biomasse in einem Hochdruckhomogenisator bei 1500 bar in 10 Durchlaufzyklen homogenisiert wurde (siehe [Abbildung 43 A und B](#)). Proben vor, während und nach dem erneuten Aufschluss mit dem Hochdruck-Homogenisator wurden mit Aceton extrahiert und der Astaxanthingehalt mit der DMSO-Extraktprobe verglichen (siehe [Abbildung 43 C und D](#)). Nur in der einmal mit Aceton extrahierten Probe war Astaxanthin enthalten, die zweite Extraktion enthielt kein Astaxanthin mehr. Während mit DMSO zwei Extraktionen nötig war um alles Astaxanthin zu extrahieren.

Der Astaxanthingehalt der Probe wurde nach der enzymatischen Abspaltung der Fettsäuren mit Lipase am Molekül mittels HPLC bestimmt. Leider zeigte sich hier, dass die Lipase durch Aceton gehemmt wird und nur ca. 50% des in der Probe vorhandenen Astaxanthins bestimmt werden konnte. Deshalb wurde für die weiteren Versuche die Acetonextrakte photometrisch vermessen analog den DMSO-Extrakten. Dazu wurde eine entsprechende Kalibrierung mit Astaxanthin-Standard durchgeführt.

Die Methode den Astaxanthingehalt von Aceton- und DMSO-Extrakte photometrisch zu bestimmen wurde erneut in Proben der Ausgangsbiomasse von Algamo überprüft (siehe [Tabelle 19](#)). Es konnte ein vergleichbarer Astaxanthingehalt in den DMSO- und Aceton-Extrakten bestimmt werden. Für wässrige

Suspensionen ist Aceton das bessere Lösemittel, da es polarer ist und sich mit Wasser gut mischt.

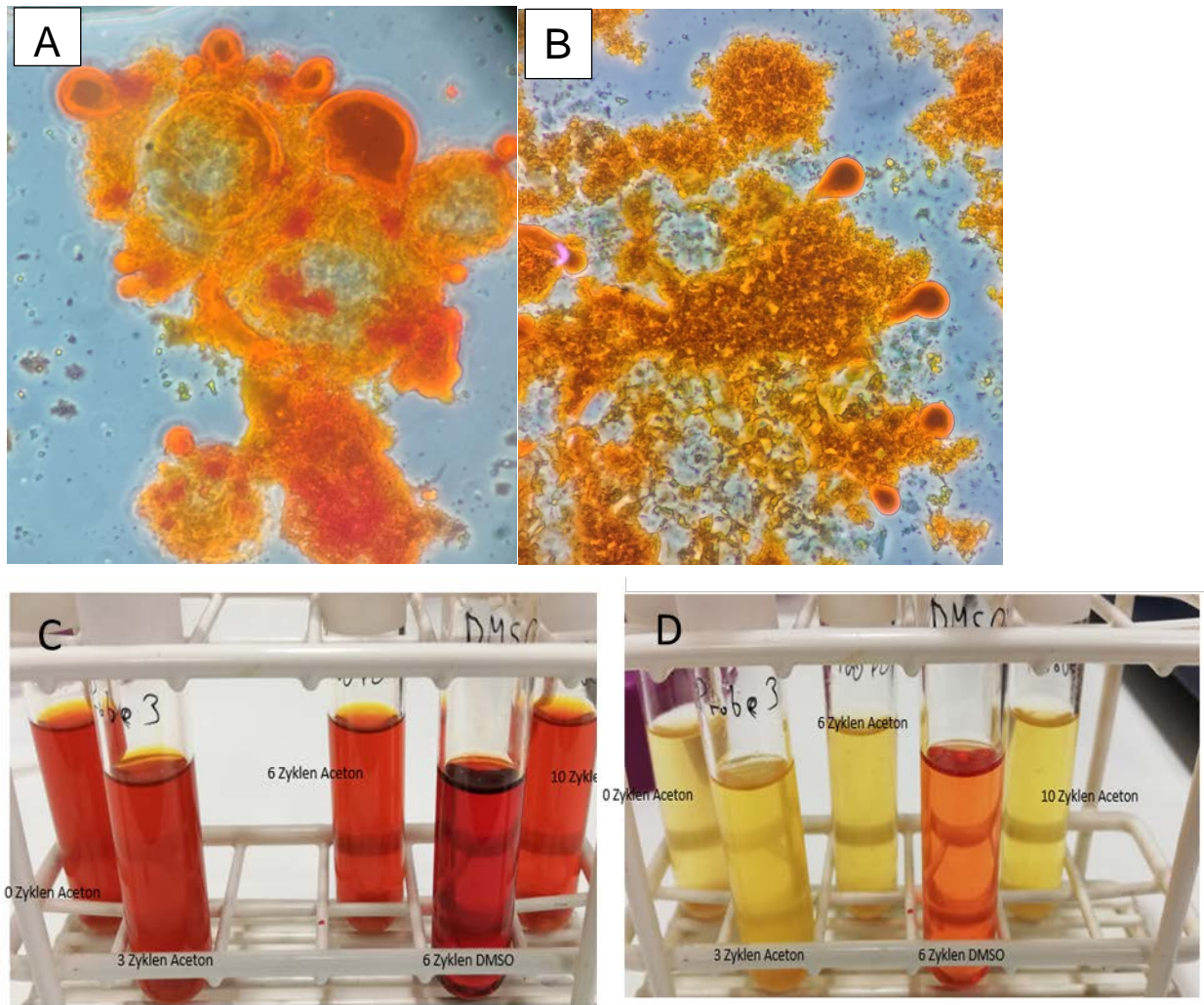


Abbildung 43: Überprüfung des Zellaufschlusses der von Algamo gelieferten Haematococcus-Biomasse. (A) Ausgangsbiomasse, (B) Biomasse nach 10 Zyklen im Hochdruckhomogenisator bei 1500 bar. (C) Extraktion von Astaxanthin aus aufgeschlossener Haematococcus-Biomasse (0 bis 10 Zyklen im Hochdruckhomogenisator) mit Aceton und DMSO (5 ml Aceton bzw. DMSO/g TS). (D) zweite Extraktion mit Aceton oder DMSO.

Tabelle 19: Überprüfung der Extraktionsmethode mit Aceton und DMSO und der photometrischen Bestimmung des Astaxanthingehaltes im Extrakt von Ausgangsbiomasse und einer 5%-igen wässrigen Suspension.

Probe	Lösungsmittel	photometrisch (% w/w)
Hp-TBM gemörsert, zerkleinert	DMSO	6,28
Hp-TBM gemörsert, zerkleinert	Aceton	6,65
5% wässrige Hp-Suspension, Ausgangsbiomasse	DMSO	5,12
5% wässrige Hp-Suspension, Ausgangsbiomasse	Aceton	6,43

Danach wurde überprüft wieviel Astaxanthin durch Aceton aus unbehandelter Haematococcus-Biomasse mit intakten Zellen extrahiert werden kann. Im Vergleich dazu wurde der Gesamt-Astaxanthingehalt durch Extraktion mit DMSO bestimmt. Die Ergebnisse in [Tabelle 20](#) zeigen, dass Aceton nicht in intakte Zellen eindringt und Astaxanthin extrahiert werden kann. Damit steht eine

Testmethode für die Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Astaxanthin in Futtermittelproben zur Verfügung. Diese Versuche zeigten aber auch, dass durch eine zweimalige Extraktion mit Aceton bei 70°C und 15 min kein Abbau von Astaxanthin stattfindet.

Tabelle 20: Test der Bioverfügbarkeit von Astaxanthin durch Extraktion von Astaxanthin aus unbehandelter Haematococcus-Biomasse mit Aceton und DMSO. Jeweils 50 mg intakte Biomasse wurde je zweimal mit Aceton oder DMSO extrahiert und der Astaxanthingehalt photometrisch bei 478 nm bestimmt.

Probe	Lösungsmittel	photometrisch (% w/w)	Mittelwert (% w/w)
unbehandelte Haematococcus-Biomasse	DMSO	4,595	4,58
unbehandelte Haematococcus-Biomasse	DMSO	4,567	
unbehandelte Haematococcus-Biomasse	Aceton	0,035	0,04
unbehandelte Haematococcus-Biomasse	Aceton	0,036	

Bestimmung des bioverfügbaren Astaxanthins in Futtermittelpellets

Durch den Projektpartner ttz Bremerhaven wurden mit der *Haematococcus*-Biomasse der Firma Algamo mit 6,4 % Astaxanthingehalt Futtermittelpellets mit 40, 80 und 120 ppm Astaxanthin hergestellt (siehe [Abbildung 44](#)). Rein optisch ist der höhere Astaxanthingehalt an der Färbung zu erkennen ([Abbildung 44 A](#) und [C](#)). Es war eine ungleichmäßige Verteilung der *Haematococcus*-Biomasse in der Ausgangsbiomasse erkennbar (siehe [Abbildung 44 B](#)), wodurch es schwierig war für die Bestimmung des Astaxanthingehaltes eine repräsentative Probe zu nehmen. Durch die Extrusion fand aber eine erneute Durchmischung statt, so dass die Futtermittelpellets eine gleichmäßige Färbung hatten (siehe [Abbildung 44 C](#)). Deshalb wurden nur die Pellets mit Aceton extrahiert um die Bioverfügbarkeit zu bestimmen.

Für die zweimalige Extraktion mit Aceton wurden ca. 10 g Pellets zerkleinert und davon zwei Proben mit Aceton extrahiert. Die zu extrahierende Probenmenge wurde entsprechend dem möglichen Gehalt angepasst. Eine Extraktion mit DMSO wurde durchgeführt, die Extrakte waren aber photometrisch nicht vermessbar, da der Extrakt stark gefärbt und trübe war. Eine Erklärung hierfür wäre, dass mit DMSO alle lipophilen Bestandteile wie Fettsäuren aus dem Pellet extrahiert werden. Die Extraktion der Futtermittelpellets mit Aceton ist sehr viel selektiver und eine einmalige Extraktion wäre auch ausreichend gewesen wie [Abbildung 45](#) zeigt.

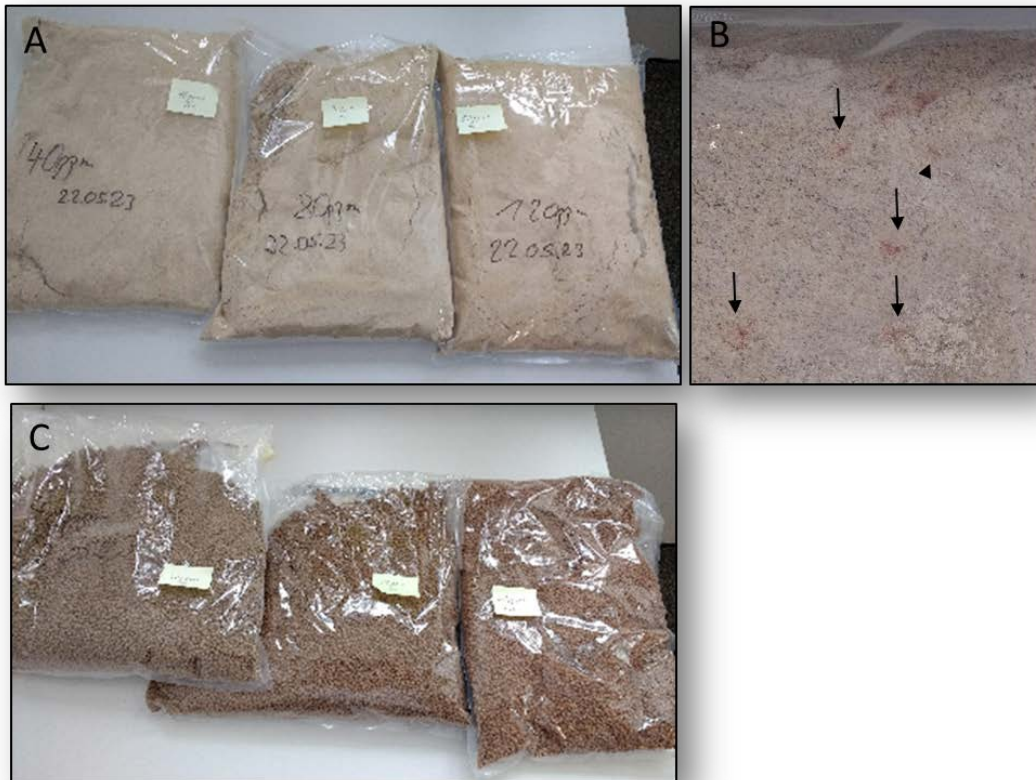


Abbildung 44: Vom Projektpartner ttz bremerhaven hergestellte Futtermittelpellets mit 40, 80 und 120 ppm Astaxanthin-gehalt. (A) Ausgangsbiomasse vor der Extrusion, (B) ungleichmäßige Verteilung der Haematococcus-Biomasse in der Ausgangsbiomasse mit 40 ppm Astaxanthingehalt, (C) und daraus durch Extrusion hergestellte Futtermittelpellets. Rein optisch ist der höhere Astaxanthingehalt an der Färbung zu erkennen (A und C).

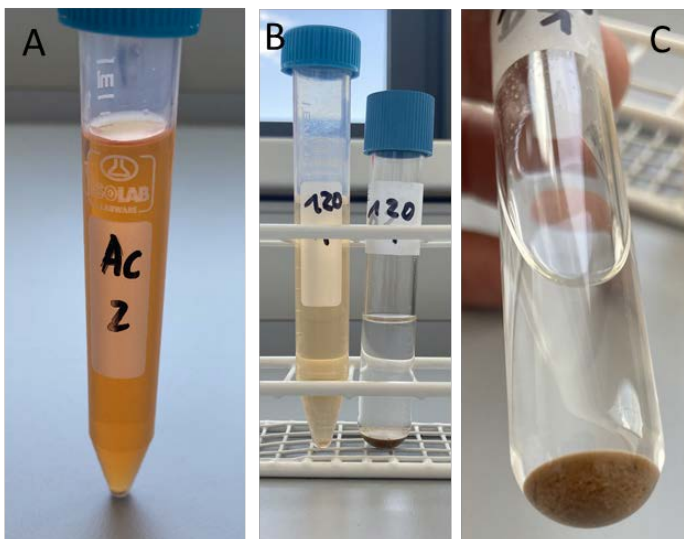


Abbildung 45: Extraktion der Futtermittelpellets: (A) Aceton-Extrakt von 2 g Pellets mit 120 ppm Astaxanthin, (B) Aceton-Extrakt von 0,5 g Pellets mit 120 ppm Astaxanthin und (C) entfärbtes Pellet und Extrakt nach der 2. Extraktion mit Aceton von 0,2 g Pellets mit 120 ppm Astaxanthin.

In *Tabelle 21* sind die Ergebnisse mit Aceton aufgeführt. Danach waren in allen drei Chargen ca. 70% der theoretisch eingesetzten Menge mit Aceton extrahierbar. Somit sind 70% des Astaxanthins im Futtermittel bioverfügbar. Da die mit Aceton extrahierbare Astaxanthinmenge anteilmäßig in allen drei Chargen annähernd gleich war, ist davon auszugehen, dass das Astaxanthin durch den

Extrusionsprozess gleichmäßig in den Pellets vorkommt, und dass Astaxanthin durch die Extrusion bzw. Extraktion nicht zerstört wird.

Tabelle 21: Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Astaxanthin in Futtermittelpellets denen 40, 80 oder 120 ppm Astaxanthin in Form von Haematococcus-Biomasse zugefügt wurde. Die Extraktion erfolgte je zweimal mit Aceton. Die eingesetzte Menge wurde je nach Astaxanthingehalt angepasst.

Probe	Eingesetzte Probenmenge in (mg TS)	Astaxanthingehalt in Futtermittelpellets (ppm)	extrahierbare Astaxanthinmenge in %
40 ppm Astaxanthin in Pellets	800	28,2	70,5
40 ppm Astaxanthin in Pellets	800	26,0	65,0
80 ppm Astaxanthin in Pellets	400	58,8	73,5
80 ppm Astaxanthin in Pellets	400	40,6	50,1
120 ppm Astaxanthin in Pellets	200	85,0	70,8
120 ppm Astaxanthin in Pellets	200	84,3	70,3
120 ppm Astaxanthin in Pellets	2000	85,0	70,8

Bewertung der Versuche:

- Die Selektivität der Extraktion von Astaxanthin in Proben mit Aceton kann ausgenutzt werden um intrazelluläres Astaxanthin von durch Zellaufschluss freigesetztes Astaxanthin zu differenzieren. Damit steht eine Methode zur Verfügung, die auf die Verfügbarkeit von freiem Astaxanthin in Proben zurückschließen lässt.
- Die Verwendung von Haematococcus-Biomasse mit einem hohen Astaxanthingehalt benötigt einen Zellaufschluss um die Verfügbarkeit in z.B. Futtermitteln zu garantieren. Ohne Zellaufschluss wird kein Astaxanthin durch den Extrusionsprozess freigesetzt und damit wäre Astaxanthin für die Fische nicht verfügbar.
- Der notwendige Energiebedarf für den Zellaufschluss über Hochdruckhomogenisator oder Rührwerkskugelmühle beträgt 3-6 kWh/kg Biomasse^{3,4}. Das entspricht bei Zugrundelegung von Eigenstromkosten von 0,07 bis 0,13 €/kWh zusätzliche Kosten von 0,21 bis 0,78 €/kg Biomasse. Diese Kosten sind niedriger im Vergleich zu den Kosten für die Biomasseproduktion mit künstlicher Beleuchtung, die je nach Eigenstromkosten von 0,07 bis 0,25 € bei 67 bis 193 €/kg Biomasse liegt (siehe AP2.4 Durchführbarkeitsstudie Seite 30ff).

³ H. Haußmann, 2019; Dissertation Universität Stuttgart: Untersuchung des Zellaufchlusses und der Gewinnung von Proteinen mit funktionellen Eigenschaften am Beispiel der Mikroalgen *Chlorella sorokiniana*, *Phaeodactylum tricornutum* und *Chlamydomonas reinhardtii*.

⁴ AL Vasquez Fraunhofer IGB, Vortrag EIT Food Algal Biotechnology Course 2019.

AP3.4: Produktcharakterisierung

Fütterungsversuche bzw. „Pigmentierungsversuche“ bei Aller Aqua



Rainbow trout – Pigmentation

Der Nachweis des Aufschlusses bzw. der Verfügbarkeit des Astaxanthins sollte direkt am Zielorganismus durchgeführt werden. Die zugrundeliegende Theorie für dieses Vorgehen war, dass eine etwaige Beschädigung der Haematococcus-Zellwand, durch den Extrusionsprozess ausreichend ist, damit der Zielorganismus „Regenbogenforelle“ das Astaxanthin aus der Zelle resorbieren und verstoffwechseln kann.

Die Fütterungs-Versuche wurden kostenneutral von der Firma Aller Aqua durchgeführt. An dieser Stelle möchten wir uns ausdrücklich, für die tatkräftige Unterstützung bedanken! Als Zielorganismus wurden Regenbogen Forellen definiert.

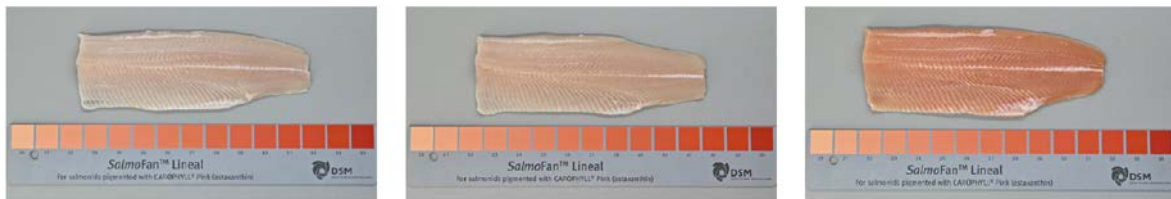


Abbildung 46: Filet-Färbung nach 20 Tagen Fütterung. Links: Kontrolle ohne Astaxanthin; Mitte: Haematococcus-Futter; Rechts: Kontrollfutter mit Astaxanthin

Bei der Betrachtung von [Abbildung 46](#) fällt auf, dass die Forellen-Filets, welche 20 Tage mit „kommerziellem Astaxanthin“ gefüttert wurden, deutlich stärker rot gefärbt sind, als die Filets welche mit Haematococcus-Futter gefüttert wurden. Jedoch sind die Filets der Forellen welche 20 Tage das Haematococcus-Futter erhalten haben auch nur sehr schwach gefärbt. Die Filets der Kontrollgruppe welche mit Futter ohne Astaxanthin oder Haematococcus gefüttert wurde, sind gänzlich ungefärbt.



Abbildung 47: Filet-Färbung nach 41 Tagen Fütterung. Links: Kontrolle ohne Astaxanthin; Mitte: Haematococcus-Futter; Rechts: Kontrollfutter mit Astaxanthin

Die Filetfärbung der Forellen nach 41 Tagen Fütterung, mit den jeweiligen Futtern, kann [Abbildung 47](#) entnommen werden. Der Trend welcher nach 20 Tagen Fütterung absehbar war, setzt sich fort (vgl. [Abbildung 48](#)). Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Astaxanthin, weist das Filet der „Haematococcus-Gruppe“ eine leichte Rotfärbung auf, während das Filet der „Astaxanthin-Gruppe“ kräftig rot gefärbt ist.

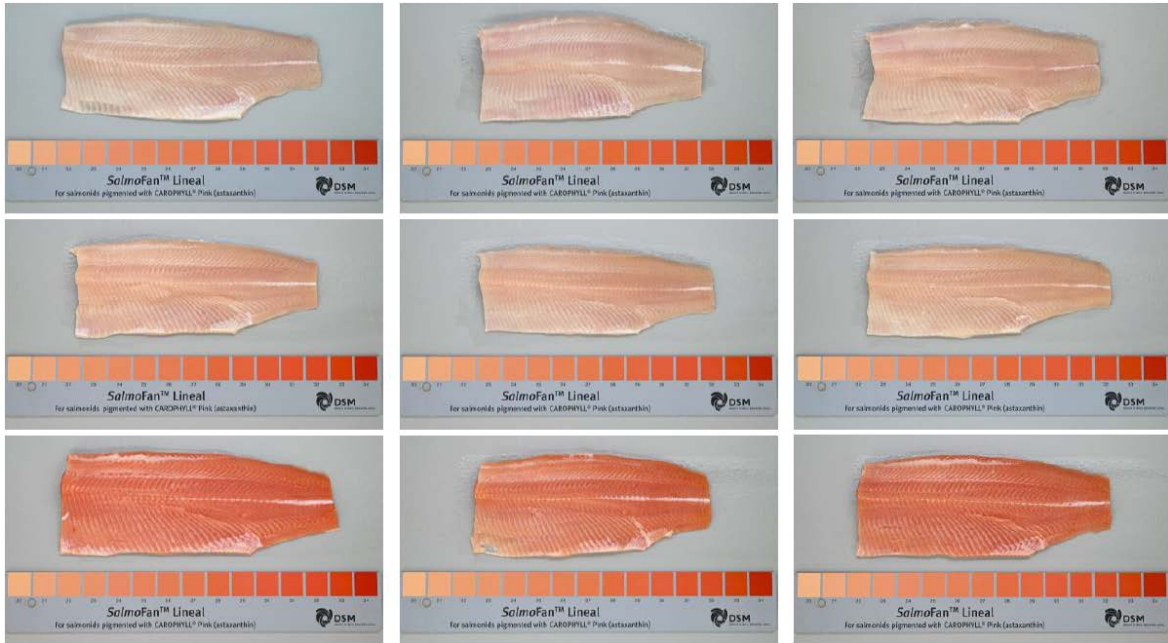


Abbildung 48: Filet-Färbung nach 51 Tagen Fütterung. Oben: Kontrolle ohne Astaxanthin; Mitte: Haematococcus-Futter; Unten: Kontrollfutter mit Astaxanthin

Der Fütterungsversuch war nach 51 Tagen beendet. Die Ergebnisse in Bezug auf die Filetfärbung sind in [Abbildung 48](#) dargestellt. Da die Versuche nach 51 Tagen beendet waren, standen für die Auswertung mehr Filets zur Verfügung. Aus diesem Grund sind abschließend die Ergebnisse in einer Dreifachbestimmung dargestellt. Die „Haematococcus-Gruppe“ weist eine leichte „Orangefärbung“ auf.



Abbildung 49: Nahaufnahme der Filet-Färbung nach 51 Tagen Fütterung. Links: Kontrolle ohne Astaxanthin; Mitte: Haematococcus-Futter; Rechts: Kontrollfutter mit Astaxanthin

Um die Unterschiede in der Filetfärbung deutlicher darstellen zu können, sind die Ergebnisse in Bezug auf die Filetfärbung nach 51 Tagen Fütterung, nochmals als Nahaufnahme in [Abbildung 49](#) dargestellt. Bei der Betrachtung von [Abbildung 49](#) kann abschließend gefolgert werden, dass ein Haematococcus-Futter, zwar zu einer leichten Färbung führt, das kommerzielle Produkt jedoch deutlich bessere Farbeigenschaften aufweist.

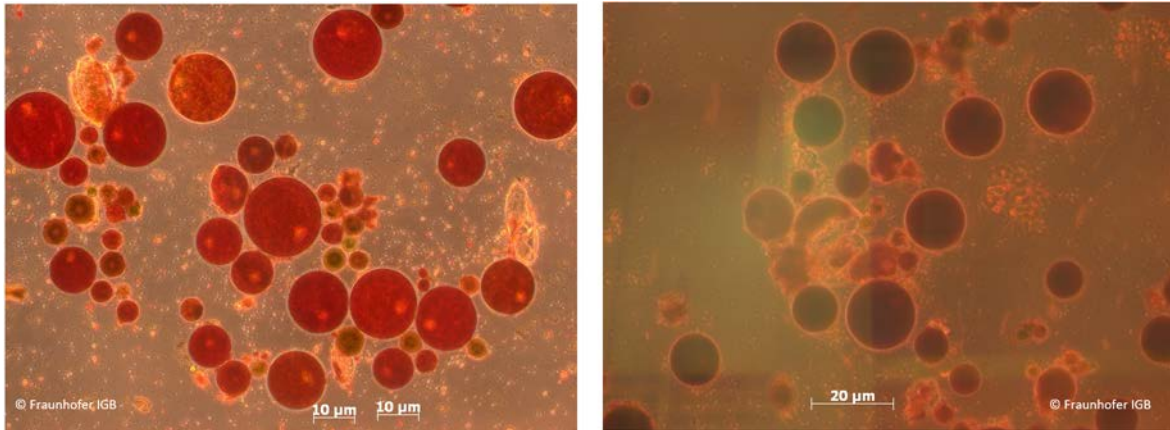


Abbildung 50: Mikroskop-Aufnahme von Haematococcus-Zellen. Links: native, unverarbeitete Zellen; Rechts: Extrudierte und zu Futter verarbeitete Haematococcus-Zellen.

Im Anschluss an die Fütterungsversuche wurde das Futter bzw. die enthaltenen *Haematococcus*-Zellen, mikroskopisch in Bezug auf den Aufschluss untersucht. *Abbildung 50* kann entnommen werden, dass nur ein kleiner Teil der *Haematococcus*-Zellen im Futter durch die Extrusion zerstört wurde (rechtes Bild).

Werden nun die Ergebnisse der Fütterungsversuche mit den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchungen in Bezug auf den Aufschluss ins Verhältnis gesetzt, so ist das Ergebnis als durchaus positiv zu werten. Denn obwohl nur ein kleiner Teil der *Haematococcus*-Zellen durch die Extrusion zerstört wurde, hat das „*Haematococcus*-Futter“ im Vergleich zu dem Futter ohne Astaxanthin zu einer Rotfärbung im Filet geführt. Gelingt es nun die Zellen vollständig zu zerstören bzw. besser zu beschädigen, so wird sehr wahrscheinlich auch die Filet-Färbung deutlich intensiver.

AP 4: Projektkoordination

Ab Mai 2021 ging die Projektkoordination von der Subitec GmbH auf das Fraunhofer IGB über.

Es wurden Projektbesprechungen zwischen allen Teilnehmern abgehalten. Nach Bedarf wurden die Absprache zwischen Projektpartnern bezüglich Lieferung von Biomassen und Produktmustern koordiniert.

2. Verwertung

a) Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen

Während der Projektlaufzeit wurden keine Schutzrechtsanmeldungen durchgeführt.

b) Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Der Einsatz von LED-Beleuchtung ist die Basis für eine 24/7 Betrieb der Anlagentechnologie und gilt somit als Basis für die Wahrnehmung der Industrie von Kultivierungstechnologien als ernstzunehmende Produktionsmöglichkeit. Der Einsatz von LEDs hat aber sowohl für CAPEX als auch OPEX weitreichende Auswirkungen und jede Alge benötigt unterschiedliche Lichtspektren, um optimal zu wachsen bzw. die natürlichen Rahmenbedingungen nachzuahmen. Die Umstellung auf Indoor-Produktion durch den Einsatz von LEDs ermöglicht die Umstellung auf kompakte Photobioreaktoranlagen die nicht nur eine Ganzjahresproduktion in Deutschland ermöglichen, sondern reduziert auch drastisch den Platzbedarf und den Wasserbedarf für die Produktion von Algenprodukten wie Pigmente und Omega-3-Fettsäuren.

Eine mögliche Anbindung der Algenzucht an Biogasanlagen im ländlichen Raum kann durch die Nutzung von Flüssiggärrest als Nährstoffquelle zur Kostenreduktion beitragen. Größer ist aber der Effekt in Richtung Nachhaltigkeit/Umweltschutz, da weniger Nährstoffe auf Ackerflächen ausgebracht werden müssen, die damit die Nitratbelastung der Böden und des Grundwassers reduzieren. Nährstoffe aus Flüssiggärrest für die Produktion von Futtermitteln ist rechtlich möglich, wenn wie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen Pflanzenbiomasse und Gülle (Wirtschaftsdünger) vergoren werden.

Der Einsatz von natürlichen Pigmenten oder nicht-fischbasierten Omega-3-Fettsäuren in Lebensmitteln, ist insbesondere für den wachsenden Markt an veganen und fleischsubstituierten Produkten interessant. Der Ersatz von chemisch synthetisierten Farbstoffen durch natürliche Farbstoffe oder Fischöl durch Algenbiomasse zu ersetzen ist ein ansteigender Trend wo auch höhere Preise mit Naturprodukten oder nicht-fischbasierten Produkten erzielt werden können.

Bei der Suitec GmbH kommen die für die Haematococcus-Produktion ausgewählten und getesteten LED-Panale in den Standardprodukten, insbesondere das industrielle Kernprodukt Cultivation Module CM180 zu Einsatz.

Die Herstellung von Aquafuttermitteln mittels Extrusion ist eine geeignete Methode um die Aquakultur mit hochwertiger Algenbiomasse und insbesondere ihrer hochwertigen Inhaltstoffe zu versorgen. Bei Astaxanthin-haltiger Algenbiomasse ist zwar ein mechanischer Zellaufschluss nötig um Astaxanthin für die Fische bioverfügbar zu machen, der Energieaufwand ist aber gering im Vergleich zum Energiebedarf für die LED-basierte Herstellung der Biomasse. Somit steht eine Methode zur Verfügung um hochwertige natürliche Inhaltsstoffe der Futtermittelindustrie zur Verfügung zu stellen.

c) Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Im Bereich der wissenschaftlichen Erfolgsaussichten sehen wir einen nachhaltigen Erkenntnisgewinn zum Einfluss der spezifischen Lichtverfügbarkeit (Verhältnis Lichtintensität auf der Reaktoroberfläche zur Biomassemenge im Reaktorvolumen) insbesondere bei der zweiseitigen Beleuchtung von Photobioreaktoren, wie sie in kompakten (Stack-) Photobioreaktoren eingesetzt werden soll. Die gewonnenen Erkenntnisse können auf andere Projekte (öffentlich oder industriell) mit anderen Zielprodukten, wie das Carotinoid Fucoxanthin, Beta-Glucane oder Fettsäuren aus Mikroalgen übertragen werden.

Das Fraunhofer IGB ist derzeit sehr aktiv im Bereich Bioökonomie und neue Wertschöpfungsketten in Baden-Württemberg (Ausschreibung BioAb-Cycling: das Projekt RoKKA zu Bioraffineriekonzepten auf Kläranlagen und das Projekt SmartBioH2 zur Nutzung von CO₂ aus der heterotrophen

Wasserstoffproduktion), sowie in EIT Food als Mitveranstalter von Algenkursen (Algal Biotechnology – Techniques and Opportunities For The Sustainable Bioeconomy; Innovative Education and Training Module for the Algal Sector). Das sind Plattformen wo die zu erwartenden Ergebnisse einfließen und in Publikationen oder Präsentationen bereits jetzt der Algensektor erreicht werden kann. Dies erhöht die Sichtbarkeit des Fraunhofer IGB.

Zudem werden die Erkenntnisse des ttz Bremerhaven sehr spannend für die Einsetzbarkeit im Bereich Futtermittelindustrie sein, insbesondere im Bereich Aquakultur, einen Markt der nachhaltig auf der Suche nach Futtermittelalternativen ist.

d) Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Die Ergebnisse aus diesem Projekt, zusammen mit den Ergebnissen aus dem FuTuRes-Projekt (FKZ 22017218), ermöglichen dem Fraunhofer IGB das Prinzip künstliche zweiseitige Beleuchtung von kompakten Photobioreaktoren nicht nur für neue Projektansätze im Bereich hochwertige Algeninhaltsstoffe, sondern auch für Massenprodukte wie Fettsäuren für Biopolymere oder Biostimulanzien (für Pflanzen und Tiere) zu verstetigen und industrielle Interessenten zu gewinnen.

Bei der Subitec GmbH ist die wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit gegeben. Bei Konzentration auf maximale Astaxanthinproduktion macht die Extraktion des Astaxanthins Sinn. Die Extraktion erfolgt über Verfahren, deren Wirkungsgrad mit steigender Extraktion stark abnimmt. Daher kann es wirtschaftlich sinnvoll sein, zu spezifizierende Restmengen Astaxanthin bewusst in der Biomasse zu belassen und diese Biomasse stark wertschöpfend an die Futtermittelindustrie für die Aquakultur zu verkaufen. Hier bestehen aufgrund zu erwartender Änderungen bei der Reglementierung von syntetischem Astaxanthin sprunghaft ansteigende Bedarfe. Wie im Projekt gezeigt werden konnte kann Futtermittel, das über Extrusion hergestellt wurde Inhaltsstoffe mit entsprechender Bioverfügbarkeit bereit stellen.

3. Erkenntnisse von Dritten

Während der Laufzeit des Projektes sind keine weiteren Erkenntnisse von Dritten im Themenkomplex LED-Beleuchtung und Futtermittelherstellung über Extrusion sowie Bioverfügbarkeit von Bestandteilen in Futtermitteln bekannt geworden.

4. Veröffentlichungen

Erste Ergebnisse zum Vergleich der einseitigen mit der zweiseitigen Beleuchtung von FPA-Reaktoren wird als Poster auf der AlgaEurope-Konferenz im Dezember 2023 in Prag vorgestellt. Danach sollen diese Ergebnisse in einer speziellen Ausgabe zur AlgaEurope in Applied Phycology publiziert werden.

ANHANG

Teilvorhaben 1: Subitec GmbH

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

- Produktion von ausreichenden Mengen Biomasse für die Projektpartner.
- Identifikation der optimalen bzw. wirtschaftlichsten Lichtquelle zur Astaxanthinproduktion
- Wirtschaftlichkeitsbetrachtung des Gesamtprozesses

2. Bearbeitete Arbeitspakete

Arbeitspaket AP1: Prozessentwicklung: Entwicklung künstlicher Beleuchtungskonzepte

Mit dem Stamm *Haematococcus pluvialis* wurde eine Prozessoptimierung hinsichtlich des Einflusses der unterschiedlichen Lichtwellenlängen und Astaxanthinkonzentrationen bei zweiseitiger Beleuchtung durchgeführt.

Die Subitec hat für die Skalierung der Prozesse (AP2.2 und AP2.4) die Anforderungen an die LED-Panels spezifiziert, Prototypen wurden gefertigt und ausgewählte Panels wurden charakterisiert und auf die Anforderungen im industriellen Einsatz abgestimmt.

Arbeitspaket AP2:2 Skalierung - Produktion relevanter Biomassemengen für Pelletierung

Für die Bereitstellung ausreichender Mengen Biomasse für die Pelletierung im Extruder wurden in diesem Arbeitspaket kontinuierlich Hp Biomasse produziert. Hierzu wurden in 28 L FPA Reaktoren in den definierten Wachstumsbedingungen indoor und unter Einsatz der LED Lampen zweiphasig Biomasse produziert.

Insgesamt wurde im gegenständlichen Zeitraum auf den 28L FPAs 1 kg Trockengewicht an verwertbarer Hp Biomasse produziert

Arbeitspaket AP2.4: Skalierung - Durchführbarkeitsstudie

Betrachtung der gesamten Wertschöpfungskette in Bezug auf die Frage diskontinuierlicher Produktion sowie des wirtschaftlichen Einsatzes des Produktionsfaktors Strom.

Ausführliche wirtschaftliche Bewertung des Ansatzes der Produktion niedriger Astaxanthinkonzentrationen und der damit verbundenen Wirtschaftlichkeit (OPEX), Gegenüberstellung mit hohen Astaxanthinkonzentrationen und Bewertung der damit verbundenen Kostenseitigen Anforderungen an das Downstreaming.

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

AP1:

Nach Festlegung des zu untersuchenden Stammes wurden verschiedene Lichtquellen auf Basis LED-Licht für die Versuche ausgewählt. Die Lichtquellen unterscheiden sich insbesondere im Bereich der roten und blauen Farbspektren, die ganz unterschiedliche Einflüsse auf die Photosynthese des Zielstammes liefern.

Der Zielstamm *Haematococcus pluvialis* ist zudem durch ein zweiphasiges Wachstum besonderen Bedingungen unterlegen, in der ersten Wachstumsphase geht es um Biomassewachstum durch Zellteilung, in der zweiten Wachstumsphase generiert die Mikroalge keine neuen Zellen, sondern den

erwünschten Zielstoff Astaxanthin als Abwehrreaktion auf eine Stresssituation (belastendes Licht und erhöhter Salzgehalt). Um diese Parameter im gesetzten Zeitraum zielführend zu untersuchen und die gewünschten Schlüsse zu ziehen, sind Tests auf Basis fundierter Rahmenbedingungen notwendig. Diese wurden vorbestimmt, getestet und evaluiert für die weiteren Arbeitspakete.

AP2:

Mit wechselnder Beleuchtung konnte bei gleichem Energiebedarf die Astaxanthinproduktivität signifikant erhöht werden, insbesondere bei höheren Anteilen an blauem Licht. Daraus ergibt sich ein optimales Prozessfenster für den Stamm *Haematococcus pluvialis* bei zweiseitiger Beleuchtung. Die Lichtausbeute ist ein wichtiger Kostenfaktor, der berücksichtigt werden muss, da er den Strombedarf beeinflusst.

Durch zahlreiche Versuche unter vergleichbaren Wachstumsbedingungen wurde die optimale Lichtwellenlänge identifiziert und in weiteren Tests wurde die Dauer der Lichtbeaufschlagung und die damit verbundene Astaxanthinproduktion untersucht, mit dem Ergebnis, dass die Produktion des gewünschten Zielstoffes Astaxanthin durch die Lichtbelastung sehr gut steuerbar beeinflusst werden kann. Im Ergebnis waren Astaxanthingehalte von 6% erreichbar. Für die Fütterungsversuche wurden geringere Astaxanthingehalte produziert (zwischen 2% und 3%).

Die Produktion von mehr oder weniger Astaxanthinhaltiger Biomasse erfordert aber im Downstreaming ganz unterschiedliche prozessuale Aufwände. Je mehr Astaxanthin in einer Zelle gebunden wird, um so härter wird die Zellwand und um so aufwändiger ist die Extraktion des Zielstoffes Astaxanthin.

Die Arbeitshypothese war, dass bei geringen Astaxanthingehalten der Biomasse, das in den Zellen gebundene Astaxanthin von Fischen im Rahmen der Verdauung aus der Zelle erreicht werden kann, da die Zellwand weitaus dünner ist.

In der Realität konnten aber Astaxanthingehalte von 2% oder 3% vom Fisch nicht unaufgeschlossen erreicht werden. Das im Fischfutter enthaltene Astaxanthin war also nicht bioverfügbar. Somit muss auch Biomasse mit geringerem Astaxanthingehalt über einen Zellaufschluss für den Einsatz als Fischfutter vorbereitet werden. Dies erfordert aber Downstreamingaufwände, die – zwar geringer als bei Astaxanthin-hochprozentigen Biomassen – ebenfalls Kosten verursacht.

Bei alleiniger Betrachtung der Mikroalgenkultivierung ist der OPEX-Kostenvorteil von hohen Astaxanthinkonzentrationen durch Kultivierung so überragend, dass die Kosteneinsparung im Downstreaming in Abhängigkeit von den standortindividuellen Energiekosten mindestens die Hälfte der Kultivierungskosten dieser Biomasse betragen muss, um einen Kostenvorteil zu generieren.

Teilvorhaben 2 und 3: Fraunhofer IGB

Die Teilvorhaben 2 und 3 wurden zusammengelegt und die Fortführung der Arbeiten des Fraunhofer CBP erfolgten am Fraunhofer IGB.

1. Ziel und Gegenstand der Teilvorhaben

- Optimierung von Omega-3-Fettsäure-reicher Algenbiomasse für Futterergänzungsmittel
Dazu wurde das optimale Prozessfenster hinsichtlich Biomasseproduktivität und Lichtausbeute bei einseitiger und zweiseitiger Beleuchtung in Flachplatten-Airlift-Photobioreaktoren bestimmt.
- Erstellung eines Automatisierungskonzeptes und Übertragung auf den Demonstrator.
- Skalierung von Automatisierungskonzepten in den Pilotmaßstab zur Produktion von Omega-3-Fettsäure-reicher Algenbiomasse

2. Bearbeitete Arbeitspakete

Arbeitspaket 1: Prozessentwicklung, neue Beleuchtungs- und Automatisierungskonzepte

Mit dem Stamm *Phaeodactylum* wurde eine Prozessoptimierung hinsichtlich des Einflusses der Photonenflussdichte auf die Reaktoroberfläche bei ein- und zweiseitiger Beleuchtung durchgeführt.

Das Fraunhofer IGB hat für die Skalierung der Prozesse (AP2.1 und AP2.2) die Anforderungen an die LED-Panele spezifiziert, Prototypen wurden gefertigt und ausgewählte Panele wurden physiologisch charakterisiert.

Ein bereits entwickeltes Automatisierungskonzept wurde um mehrere Sensorkomponenten inklusive Abgasrückführung zur Reduktion des CO₂-Bedarfs erweitert und auf den Demonstrator übertragen.

Arbeitspaket 2: Skalierung – Übertragung und Charakterisierung des Wachstums in den Pilotmaßstab

Als Demonstrator wurde ein kompaktes FPA-Reaktormodul bestehend aus 5 FPA-Panelen mit je 30L Reaktorvolumen aufgebaut. Die Reaktormodule sind miteinander verbunden und bilden ein gemeinsames Reaktorvolumen. Zwischen den Reaktorpanelen ist die LED-Beleuchtung beidseitig der Reaktoren angeordnet

Ein Demolauf mit dem kompakten FPA-Reaktormodul ist durchgeführt worden um sowohl LED-Beleuchtung als auch Steuerungs- und Automatisierungskonzepte zu testen.

Arbeitspaket 3: Produktformulierung - Analytischer Nachweis der Bioverfügbarkeit

Für den analytischen Nachweis der Bioverfügbarkeit von Astaxanthin in Futtermittelpellets wurde eine Analyseverfahren entwickelt, die zwischen nicht-aufgeschlossener und aufgeschlossener Haematococcus-Biomasse differenziert. Die Methode wurde überprüft und auf Astaxanthin-haltige Futtermittelpellets übertragen zur Bestimmung des bioverfügbaren Astaxanthins.

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

AP1:

Mit zweiseitiger Beleuchtung konnte bei gleichem Energiebedarf die Biomasseproduktivität verdoppelt werden bei höherer Effizienz der Konversion der Lichtmenge in Biomasse (Lichtausbeute). Daraus ergibt sich ein **optimales Prozessfenster** für den Stamm *Phaeodactylum tricornutum* bei zweiseitiger Beleuchtung: die optimale Biomassekonzentration liegt im Bereich 4-7 g TS/l und mindestens $2 \times 2 \mu\text{mol Photonen g TS}^{-1}\text{s}^{-1}$. Daraus ergibt sich eine Biomasseproduktivität von bis zu $1,8 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bei einer Lichtausbeute von $>1 \text{ g TS/mol Photonen}$. Die Lichtausbeute ist ein wichtiger Kostenfaktor, der berücksichtigt werden muss, der den zu erwartenden Strombedarf widerspiegelt.

Das bereits im Fraunhofer IGB entwickelte Steuerungs- und Automatisierungskonzept wurde um eine

OD-Sonde erweitert, nach Kalibrierung kann daraus die Biomassekonzentration berechnet werden und die Lichtintensität auf der Reaktoroberfläche eingestellt werden, mit dem Ergebnis einer konstanten Lichtverfügbarkeit, die die Biomasseproduktivität und Lichtausbeute (g BTM/mol Photonen) bestimmt. Aber auch Fütterungszyklen und Erntevorgänge können über eine OD-Sonde automatisch ausgelöst werden.

Über die Etablierung einer Abgas-Rückführung konnte der CO₂-Bedarf, der ein Kostenfaktor ist, um >90% reduziert werden.

AP2:

Das Fraunhofer IGB hat für die Skalierung der Prozesse (AP2.1 und AP2.2) die Anforderungen an die LED-Panels spezifiziert, Prototypen wurden gefertigt und ausgewählte Panels wurden physiologisch charakterisiert. Insbesondere die Effizienz der neuen LEDs reduzierte den Strombedarf nochmals.

Ein bereits entwickeltes Automatisierungskonzept wurde um mehrere Sensorkomponenten erweitert und auf den Demonstrator übertragen.

Ein Demolauf mit dem kompakten FPA-Reaktormodul ist durchgeführt worden um sowohl LED-Beleuchtung als auch Steuerungs- und Automatisierungskonzepte zu testen.

Der Demonstrator wurde aufgebaut und im Demolauf überprüft und weitere Optimierungsschritte identifiziert.

Im Berichtszeitraum wurden ausreichend *Phaeodactylum*-Biomasse geliefert, so dass das ttz Bremerhaven die Vorversuche zur Produktformulierung durchführen konnte.

AP3.2:

Für den analytischen Nachweis der Bioverfügbarkeit von Astaxanthin in Futtermittelpellets wurde eine Analysenmethode entwickelt, die zwischen nicht-aufgeschlossener und aufgeschlossener *Haematococcus*-Biomasse differenziert. Es wurde sich die Eigenschaft von Aceton und DMSO als Extraktionsmittel zunutze gemacht. Aceton dringt nicht in intakte *Haematococcus*-Zellen ein, während DMSO auch in intakte Zellen eindringt. Somit kann im Vergleich ein Gesamt-Astaxanthingehalt einer Probe und deren Bioverfügbarkeit, also der Anteil der mit Aceton meßbar ist, bestimmt werden.

Es erfolgte die Übertragung auf Astaxanthin-haltige Futtermittelpellets und Bestimmung des bioverfügbaren Astaxanthins. 70% des in Futtermittelpellets zugegebenen Astaxanthins in Form von aufgeschlossener *Haematococcus*-Biomasse war bioverfügbar.

Teilvorhaben 4: TTZ Bremerhaven

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens : Produktformulierung und Anwendungstests

- Zerstörung der Zellwand von Algen
- Aufschluss der Zellen um die enthaltenen Nährstoffe bioverfügbar zu machen
- Pelletierung von Algen innerhalb einer repräsentativen Futter-Matrix
- Produktcharakterisierung

2. Bearbeitete Arbeitspakete

AP 3.1: Vorbehandlung Biomasse / Pre-Processing (TTZ)

Wesentliches Ziel der Vorbehandlung ist die Zerstörung der Zellwand der Mikroalgen. Die wertgebenden Inhaltsstoffe müssen erhalten bleiben, um dem späteren Zielorganismus zur Verfügung gestellt werden zu können. Idealerweise sind AP3.1 „Zellaufschluss / Pre-Processing“ und AP 3.2 „Pelletierung durch Extrusion“ kombinierbar. Denn während der Extrusion herrschen u.a. hohe Scherkräfte, Drücke und Temperaturen (s. AP3.2), die ausreichend sein könnten, um die Algenzellwände zu zerstören.

Sollte der Extrusionsprozess in Bezug auf den Aufschluss der Algen nicht ausreichend sein, so stehen dem ttz Bremerhaven eine Vielzahl von innovativen und bewährten Zerkleinerungsverfahren zur Verfügung. Insbesondere der sog. „Hydro-Grind“ der Firma AK Systems hat sich für den Aufschluss widerstandsfähiger Rohstoffe als äußerst effizient bewiesen.

AP 3.2: Pelletierung durch Extrusion (TTZ)

Die Eignung des Vorproduktes und der Komponenten für die Futtermittelherstellung zeigt sich letztendlich erst während und nach der Extrusion selbst. Das zu entwickelnde Pre-Processing-Verfahren (AP 3.1) ist entsprechend der erarbeiteten Produkt- und Verfahrensergebnisse sowie in Absprache der Projektpartner untereinander abzustimmen und ggf. anzupassen. Vor diesem Hintergrund ist der Extrusionsprozess (AP 3.2) spezifisch auszulegen und anzupassen und erfolgt parallel zu Phase 2.1.

Ein Extrusionsprozess zeichnet sich durch das Zusammenspiel und die gegenseitige Beeinflussung unterschiedliche Parameter aus. Dazu zählen insbesondere die Schneckenkonfiguration, der Wassergehalt der Masse, die Temperaturen entlang der Verfahreseinheit, sowie Druck, Drehzahl, Massendurchsatz, Drehmoment, Art und Ort der Dosierungen und Verweilzeiten. Art und Ort der Dosierung sind insbesondere bei Vorprodukten (Rezepturbestandteile) mit einem hohen Wassergehalt von entscheidender Bedeutung (Algen-Slurry).

Ein Doppelschneckenextruder kann variabel eingesetzt werden (Rohstoffzusammensetzung bis 27 % Fett), ermöglicht verschiedene Verfahrensbedingungen (Schneckenkonfigurationen, Temperaturen, Druck, Umdrehung, Drehzahl bzw. Durchsatz etc.) und erlaubt u.a. die Dosierung von Rohstoffen, die flüssige, pulvrige oder halbflüssige Aggregatzustände besitzen. Entscheidende Parameter sind vor allem die Partikelgröße und die geeignete Zustandsform (feucht, trocken). Durch Wassergehalte > 20 % in Extrusionsmassen wird die Möglichkeit spezifisch mechanische Energie einzuleiten verschlechtert und damit auch die Möglichkeiten der Extrusion minimiert (u.a. keine oder zu geringe Friktionswärme). Diesem Aspekt wird daher besondere Aufmerksamkeit zu widmen sein, so dass ein entsprechendes „Pre-Processing“ auch in diesem Kontext zu betrachten ist.

Für die Entwicklung eines qualitativ hochwertigen Futters/ Pellets, spielt neben der Art und dem Zustand eines Algenvorproduktes die Wahl weiterer Futtermittelkomponenten, wie strukturgebende, bindende und ggf. nutritiv sinnvolle Rohstoffe und deren Einsatzmenge eine entscheidende Rolle. Die Rohstoffwahl hat einen entscheidenden Einfluss auf die spätere Produktqualität. Durch die Wahl des Binders kann die Kohärenz der extrudierten Pellets realisiert, gezielt beeinflusst und der Extrusionsprozess selbst determiniert werden.

In Abhängigkeit von der Zustandsform des Algenvorproduktes muss die Art der Dosierung zum Extrusionsprozess ausgewählt werden (technisch und rezepturseitig). Aufgrund der prioritären Zielvorgabe, das Algenvorprodukt möglichst frisch separiert, aufgeschlossen und mit folglich hohem Wasseranteil einzusetzen, stellt die Zudosierung mit einer geeigneten Pumpe eine Möglichkeit dar. Für den Fall, dass abweichend von der prioritären Zielvorgabe vorgegangen werden muss, beispielsweise durch den Einsatz von getrocknetem Algenvorprodukt, stellt die Zugabe via Trockendosierung (Trocknen und Vermahlen notwendig) zum Extrusionsprozess einen möglichen Lösungsweg (Pulverdosierung z.B. mit Schneckendosierer) dar. Herausforderung besteht folglich darin, eine maximal mögliche Menge an Aktivmaterial unter Erhalt von Expansion, Entkeimung und Absenkung des

Um empfindliche, nutritiv wertvolle Inhaltsstoffe der Alge möglichst zu schützen, kann z.B. die Dosierung kurz vor Prozessende erfolgen, sodass eine ausreichende Entkeimung gewährleistet und ein optimaler Erhalt bestimmter Inhaltsstoffe realisiert werden kann. In diesem Sinne soll durch ein geregeltes Temperaturprofil die Produktqualität gesteigert werden. Nachdem die Auswahl, Identifikation und Charakterisierung geeigneter Vorprodukte, sowie weiterer Roh-Komponenten erfolgt ist, gilt es spezifische Rezepturen zu erarbeiten und zu charakterisieren.

In Abhängigkeit der Wasserverdampfung und des Wassergehalts der Pellets (Endprodukt) ist annehmbar, dass ein Nachtrocknungsprozess (z.B. Fließbett-Trockner) notwendig ist, um physikalisch, chemisch sowie mikrobiologisch stabile und haltbare Fertigprodukte zu erhalten. Im Einzelnen sollte das Trocken-Fertigprodukt einen Wassergehalt von 5-13 % Wasser aufweisen um die o.g. Eigenschaften zu erhalten.

AP 3.4: Produktcharakterisierung

Neben den Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit der Algeninhaltsstoffe in den Futtermittelpellets werden die Produkte weiter charakterisiert hinsichtlich Gehalt an Fettsäuren, Carotinoiden und Proteinen aber auch Farbe und Konsistenz (Fraunhofer IGB). Des Weiteren wird der Gehalt an Cadmium, Nitrit, Quecksilber, Flour, Blei und Arsen entsprechend den Vorgaben zum Gehalt laut Richtlinie 2002/32/EG über unerwünschte Stoffe in der Tierernährung bestimmt. Sofern CO₂ aus CO₂-haltigen Abgasströmen von Biogasanlagen eingesetzt wird, sollte zusätzlich auf Schwefel und Formaldehyd getestet werden. Um die Lagerstabilität zu überprüfen wird das produzierte Material auf Lipidoxidation (Standardtest) hin überprüft.

Ergänzt werden diese Untersuchungen über die konfokale Mikroskopie, die im ttz Bremerhaven zur Verfügung steht.

Die FNR war sehr daran interessiert, dass praxisnahe und umsetzbare Ergebnisse generiert werden. Aufgrund dessen, wurde ein Großteil der Kapazitäten des ttz Bremerhaven, aus dem AP 3.4 in Fütterungsversuche gemeinsam mit der Aller Aqua Research GmbH investiert.

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

- Aufschlussversuche von Haematococcus-Zellen am ttz Bremerhaven, mittels Extrusion, Nassvermahlung und Hochdruckbehandlung haben gezeigt, dass mittels der im Antrag favorisierten Verfahren kein oder nur ein unzureichender Aufschluss erreicht werden konnte. Deshalb wurde am Fraunhofer IGB, mittels eines speziellen Hochdruck-Homogenisierungsverfahrens Haematococcus-Biomasse aufgeschlossen.
- Um die wirkenden Kräfte (Druck, Scherung, Temperatur und Reibung) auf das Astaxanthin möglichst repräsentativ abbilden zu können, wurde die getrocknete Algen-Biomasse in eine Trockenmischung, bestehend aus Fischmehl, Weizenmehl und Fisch-Öl eingemischt, welche in der Regel die Hauptkomponenten eines Fischfutters darstellen. Auf weitere Zutaten wie bspw. Soja, Vitamine, Mineralien und Proteinkonzentrate, wurde aus Gründen der Ressourcenschonung verzichtet, da diese nur in geringen Mengen im Fischfutter eingesetzt werden und keinen signifikanten Einfluss auf die oben genannten Extrusionskräfte haben.
- Für die Versuche wurde u.a. Futter mit einem Astaxanthingehalt von jeweils 40 ppm, 80 ppm und 120 ppm hergestellt. Die Motivation hierbei war, bei einem möglichen Einfluss des Fischfutter-

Herstellungsverfahren, auf die chemische Beschaffenheit des Astaxanthins, quantitative Abhängigkeiten identifizieren und verstehen zu können.

- Der Nachweis des Aufschlusses bzw. der Verfügbarkeit des Astaxanthins sollte direkt am Zielorganismus durchgeführt werden. Die zugrundeliegende Theorie für dieses Vorgehen war, dass eine etwaige Beschädigung der Haematococcus-Zellwand, durch den Extrusionsprozess ausreichend ist, damit der Zielorganismus „Regenbogenforelle“ das Astaxanthin aus der Zelle resorbieren und verstoffwechseln kann.
- Die Fütterungs-Versuche wurden kostenneutral von der Firma Aller Aqua durchgeführt. An dieser Stelle möchten wir uns ausdrücklich, für die tatkräftige Unterstützung bedanken! Als Zielorganismus wurden Regenbogen Forellen definiert.
- Werden die Ergebnisse der Fütterungsversuche mit den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchungen in Bezug auf den Aufschluss ins Verhältnis gesetzt, so ist das Ergebnis als durchaus positiv zu werten. Denn obwohl nur ein kleiner Teil der Haematococcus-Zellen durch die Extrusion zerstört wurde, hat das „Haematococcus-Futter“ im Vergleich zu dem Futter ohne Astaxanthin zu einer Rotfärbung im Filet geführt.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart Abschlussbericht
3a. Titel des Berichts Futterergänzungsmittel auf Basis von Mikroalgen, wirtschaftliche Ganzjahresproduktion durch Kopplung an flexibilisierten Biomasse-Konversionsanlagen und Nutzung des Regelenergiemarktes – Power2Feed.	
3b. Titel der Publikation	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Gregor Weber Dr. Ulrike Schmid-Staiger und Gordon Brinitzer Tobias Fitzel	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.06.2023
	6. Veröffentlichungsdatum 18.07.2024
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n))	7. Form der Publikation Abschlussbericht pdf
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Subitec GmbH Küferstr. 11 73257 Köngen Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB Nobelstrasse 12 70569 Stuttgart ttz Bremerhaven Bremerhavener Institut für Lebensmitteltechnologie und Bioverfahrenstechnik (BILB) Am Lunedeich 12 27572 Bremerhaven	9. Ber.Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen *) 22017418,2219NR375, 2219NR377
	11a. Seitenzahl Bericht 65
	11b. Seitenzahl Publikation
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) Wilhelmstr. 54 10117 Berlin	12. Literaturangaben 3
	14. Tabellen 21
	15. Abbildungen 50
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe	
18. Kurzfassung Die Nutzung von Mikroalgen in der Herstellung von Futtermitteln insbesondere in der Aquakultur erfordert eine ressourceneffiziente und kosteneffiziente Produktionsweise. Im Projekt Power2Feed wurde eine Kostenreduktion der Algenproduktion durch die Implementierung mehrerer Maßnahmen erfolgreich umgesetzt. In geschlossenen Photobioreaktoren wurden die Kultivierungsparameter am Beispiel der in der Aquakultur interessanten Algenproduktion von <i>Haematococcus</i> - und <i>Phaeodactylum</i> -Biomasse, die zu einer deutlichen Steigerung der Produktivität und einer Reduktion der Kosten führen, optimiert. Hauptparameter ist die Beleuchtung mit energieeffizienten LEDs. Eine Optimierung der einzusetzenden LEDs hinsichtlich Energieeffizienz (Konversion von Strom in Licht) und Wirkung der Lichtintensität auf die Produktivität und vor allem auf die Lichtausbeute (Konversion von Licht in Biomasse/Produkt) wurde untersucht. Über den Einsatz entsprechender Sensortechnologie können nicht nur die Umweltbedingungen in Photobioreaktoren kontrolliert werden, sondern sind auch ein Schritt in Richtung kostenreduzierende Automatisierung. Die Fähigkeit das Reaktorkonzept entsprechend zu skalieren, ermöglicht erst eine kostengünstige Massenproduktion von Mikroalgen und ihren Inhaltsstoffen. Mit Hilfe der Automatisierung von Prozessen wie Nährstoffzufuhr, Ernte und Reinigung ermöglicht eine effiziente und arbeitsaufwandsarme Produktion von Mikroalgen und damit Kostenreduktion. Eine weitere Kostenreduktion wurde durch eine effiziente Aufarbeitung und Futtermittelproduktion mittels Extrusionsprozess erzielt, um Astaxanthin-haltige Algenbiomasse in Fischfutter mit hoher Bioverfügbarkeit der Aquakultur zur Verfügung zu stellen.	
19. Schlagwörter Mikroalgen, Astaxanthin, Omega-3-Fettsäuren, Photobioreaktoren, LED, Astaxanthin, Aquakultur, Futtermittel, Extrusion	
20. Verlag TIB Hannover	21. Preis

*) Auf das Förderkennzeichen des BMEL soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.