

# Abschlussbericht Aktenzeichen 13224-32

„Förderschwerpunkt-Biotechnologie: ChemBioTec: Integrierter Prozess zur Produktion von Omega-3-EPA mittels Mikroalgen im Photobioreaktor, Entwicklung von Aufschluss- und Extraktionsverfahren“

An die

Deutsche Bundesstiftung Umwelt  
Referat Umweltchemie

Postfach 17 05

**49007 Osnabrück**



**Projektpartner:**

Subitec GmbH, Stuttgart (Koordinator)  
KD Pharma Bexbach GmbH  
Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik,  
Universität Stuttgart

**Projektbearbeiter:**

Dr. Peter Ripplinger (Koordinator)  
Dipl. Ing. Peter Marek (Subitec GmbH)  
B.Eng. Christiane Fieting (Subitec GmbH)  
Dr. Rudolf Krumbholz (KD Pharma Bexbach GmbH)  
Msc Karin Krumbholz (KD Pharma Bexbach GmbH)  
Dr. Peter Lembke (KD Pharma Bexbach GmbH)  
Dipl. Ing. Andrea Seibert (Institut für Grenzflächen-  
verfahrenstechnik, Universität Stuttgart)  
Prof. Dr. Thomas Hirth (Institut für Grenzflächen-  
verfahrenstechnik, Universität Stuttgart; Fraunhofer IGB)  
Dr. Ulrike Schmid-Staiger (Fraunhofer IGB)

## Inhaltsverzeichnis

Kooperation innerhalb des Projektes.....	1
1. Zusammenfassung.....	2
2. Anlass und Zielsetzung .....	3
3. Ergebnisse der Arbeitspakete .....	6
3.1. AP 1 Auswahl und Test von EPA – Produzenten .....	6
3.2. AP 2 Entwicklung und Optimierung des Kultivierungsprozesses .....	7
3.2.1. AP 2.1 Optimierung der Prozessparameter Lichtintensität, CO <sub>2</sub> -Konzentration, Temperatur und Betriebsweise für <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	7
3.2.2. AP 2.2 Optimierung der Prozessparameter Lichtintensität, CO <sub>2</sub> -Konzentration, Temperatur und Betriebsweise für <i>Monodus subterraneus</i> und <i>Odontella aurita</i> .....	12
3.3. AP 3 Algenproduktion für die Versuchsmusterherstellung.....	17
3.3.1. AP 3.1 Umrüstung und Inbetriebnahme der Pilotanlagen.....	17
3.3.2. AP 3.2 Herstellung von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> –Chargen .....	18
3.3.3. AP 3.3 Herstellung von <i>Nannochloropsis oculata</i> – Chargen .....	22
3.3.4. AP 3.4 Herstellung von <i>Monodus subterraneus</i> –Chargen .....	24
3.4. AP 4 Trocknung von Algenbiomasse von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	26
3.5. AP 5 Entwicklung und Optimierung des Zellaufschlusses .....	30
3.6. AP 6 Entwicklung und Optimierung der Extraktion und Umesterung mit scCO <sub>2</sub> .....	31
3.6.1. AP 6.1 Optimierung der Extraktion der Galactolipide im Festbett mittels scCO <sub>2</sub> und Ethanol als Modifier für <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	32
3.6.2. AP 6.2 Optimierung des Enzymfestbettreaktors mit scCO <sub>2</sub> als Lösungsmittel in Abhängigkeit der EPA-Konzentration im scCO <sub>2</sub> -Extrakt aus AP6.1 (Prozessintegration).....	37
3.6.3. AP 6.3 Direkte Umesterung und Extraktion der Galactolipide zu EPA-Ethylestern mit Säure und Ethanol .....	39
3.7. AP 7 Entwicklung und Optimierung der Aufreinigung mit scCO <sub>2</sub> .....	46
3.8. AP 8 Bilanzierung des gesamten Aufarbeitungsprozess .....	49
4. Diskussion.....	55

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Zusammenarbeit der Projektpartner entlang der Wertschöpfungskette.....	4
Abbildung 2: Biomasseproduktivität von <i>Nannochloropsis oculata</i> in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	8
Abbildung 3: Produktivität in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration für <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	9
Abbildung 4: Wachstum von <i>Nannochloropsis oculata</i> auf Nitrat (Tag 0-6) und Harnstoff (Tag 6-12) als Stickstoffquelle .....	10
Abbildung 5: Wachstum von <i>Nannochloropsis oculata</i> in einem 30 Liter-Reaktor (Pfeile: Kultivierungsprobleme wahrscheinlich durch inhibierende Stoffe) .....	11
Abbildung 6: Biomasseproduktivität von <i>Monodus</i> in Abhängigkeit von pH-Wert .....	12
Abbildung 7: <i>Monodus subterraneus</i> - EPA – Gehalt in Abhängigkeit von der Lichtintensität und Biomassekonzentration (rel. Lichtintensität).....	13
Abbildung 8: <i>Nannochloropsis oculata</i> - EPA-Gehalt in Abhängigkeit von der Lichtintensität und Biomassekonzentration (rel. Lichtintensität).....	14
Abbildung 9: Wachstum von <i>Odontella aurita</i> auf zwei Medien.....	15
Abbildung 10: Wachstum von <i>Odontella aurita</i> in FPA-Reaktor bei 20°C.....	16
Abbildung 11: Wachstum von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> im Freiland im Jahr 2008.....	18
Abbildung 12: Durchschnittliche Biomasseproduktivität pro Monat bei der Kultivierung von <i>Phaeodactylum</i> im Jahr 2008 .....	19
Abbildung 13: Durchschnittliche Biomasseproduktivität pro Monat bei der Kultivierung von <i>Phaeodactylum</i> im Herbst 2009 .....	19
Abbildung 14: Erste Kultivierung von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> im Gewächshaus in Reutlingen (Abbrechen der Linie = Ernte bzw. Überimpfen auf weitere Reaktoren). Am 38. bzw. 42. Tag wurde die Kultur abgelassen.....	20
Abbildung 15: Zweite Kultivierung von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> im Gewächshaus in Reutlingen (Abbrechen der Linie = Ernte bzw. Überimpfen auf weitere Reaktoren) .....	21
Abbildung 16: Wachstum von <i>Nannochloropsis oculata</i> auf technischer Kohlensäure.....	22
Abbildung 17: Durchschnittliche monatliche Biomasseproduktivität 2009 von <i>Nannochloropsis oculata</i> im FPA 2 und FPA 3.....	23
Abbildung 18: Wachstum von <i>Monodus subterraneus</i> .....	24
Abbildung 19: Durchschnittliche Biomasseproduktivität pro Monat von <i>Monodus subterraneus</i> .....	25
Abbildung 20: Der Konvektionsbatchtrockner von schräg rechts vorne (linke Abb.) und des Beschickungsgestells mit unbefülltem, eingesetztem Sieb (rechte Abb.).....	26
Abbildung 21: Probensiebe für den Batchtrockner zur Trocknung von feuchter Algenbiomasse (Restfeuchte ca. 80–90 %). Porenweite Innenseite: 4 µm. Verstärkungsdrahtgeflecht auf Unterseite.....	27
Abbildung 22: Einfluss verschiedener Prozesstemperaturen bei der semi-kontinuierlichen, konvektiven Trocknung mit überhitztem Dampf verglichen mit gefriergetrockneten Proben .....	28
Abbildung 23: Protein- und Chlorophyllkonzentration im Überstand einer 5%igen (w/w) Suspension von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> a) in Abhängigkeit der Zeit mittels Rührwerkskugelmühle, b) in Abhängigkeit des Drucks mittels Hochdruckhomogenisator .....	30
Abbildung 24: Umsetzung von Monogalactosyldiglycerid mit der Omega-3-Fettsäure EPA an Position 1 zu EPA-Ethylestern mit Ethanol.....	31
Abbildung 25: Anlagenfließbild der sCCO <sub>2</sub> -Anlage zur Untersuchung der MGDG-Extraktion und der Umesterung mittels Enzymfestbett (links) mit der verwendeten Extraktorsäule (rechts).....	32
Abbildung 26: Ausbeute an EPA-MGDG bei der Extraktion mit sCCO <sub>2</sub> von getrockneter <i>Phaeodactylum tricornutum</i> Biomasse. Untersucht wurde der Einfluss a) der EtOH Qualität (99 %, 96 %) als Modifier und des	

Zellaufschlusses (Hochdruckhomogenisator, Rührwerkskugelmühle) b) des Drucks und der Temperatur bei der Extraktion von unbehandelten Zellen mit 96%igem EtOH als Modifier .....	33
Abbildung 27: Vergleich der Ausbeute und Konzentration an EPA-haltigem MGDG der Extraktion mit scCO <sub>2</sub> von trockener <i>Phaeodactylum tricornutum</i> Biomasse in Abhängigkeit der CO <sub>2</sub> -Menge. a) reines CO <sub>2</sub> b) scCO <sub>2</sub> mit EtOH 99 % c) scCO <sub>2</sub> mit EtOH 96 %.....	34
Abbildung 28: EPA-Ethylesterausbeute nach Umesterung in einem Enzym-Festbettreaktor mit Ethanolextrakt (96%igem EtOH) in scCO <sub>2</sub> in Abhängigkeit a) des Volumenstroms von scCO <sub>2</sub> mit 15 % (w/w) Ethanolextrakt, sowie der EPA-MGDG-Konzentration. b) Untersuchung des Einflusses von Druck und Temperatur bei 1 kg h <sup>-1</sup> CO <sub>2</sub> Volumenstrom und 0,4 g l <sup>-1</sup> EPA-MGDG-Konzentration im EtOH-Extrakt .....	38
Abbildung 29: EPA-Ethylesterausbeute durch Integration von Extraktion und enzymatischer Umesterung in scCO <sub>2</sub> von unbehandelter Biomasse und den Betriebsparametern 0,5 kg h <sup>-1</sup> CO <sub>2</sub> , 150 bar, 65 °C, in Abhängigkeit von der CO <sub>2</sub> Menge.....	38
Abbildung 30: Erste Messreihe zur Gewinnung von FFA; Durchführung in Wasser (Probe A-Vorversuch).....	40
Abbildung 31: Zweite Messreihe zur Gewinnung von FFA; Durchführung in Ethanol (Probe A-Vorversuch) ..	41
Abbildung 32: Vergleich der Fettsäuren (unbekannte Fettsäure aus Probe A - Vorversuch zu C20:4 aus Fischöl).....	42
Abbildung 33: Verteilung der Fettsäuregehalte in Prozent .....	46
Abbildung 34: Verteilung der Fettsäuregehalte in Masseangaben [g].....	47
Abbildung 35: Verteilung der Fettsäuregehalte in Prozent (Probe B2).....	47
Abbildung 36: Massenverteilung der Fettsäuren in Gramm (Probe B2).....	48
Abbildung 37: Verlaufsdigramm der Aufarbeitungsprozesse bei der enzymatischen (links) und sauren (rechts) Gewinnung von EPA-Ethylestern .....	50
Abbildung 38: Relative Verteilung an elektrischer und thermischer Energie der einzelnen Prozessschritte der enzymatischen Aufarbeitung (links) und der sauren Aufarbeitung (rechts) bei der Gewinnung von EPA-Ethylestern.....	51
Abbildung 39: Einzelstoffbetrachtung Inputseite (links) und Outputseite (rechts) bei der enzymatischen Gewinnung von EPA-Ethylestern .....	52
Abbildung 40: Einzelstoffbetrachtung Inputseite (links) und Outputseite (rechts) bei der sauren Gewinnung von EPA-Ethylestern .....	52
Abbildung 41: Umweltbewertungszahlen mit spezifischen Wichtungsfaktoren bei der enzymatischen (links) und sauren (rechts) Gewinnung von EPA-Ethylestern .....	53
Abbildung 42: Wirkungspotentiale der Wirkungskategorien Inputseite und Output-Seite bei der enzymatischen (links) und sauren (rechts) Gewinnung von EPA-Ethylestern .....	54
Abbildung 43: Ringversuch (KD-Pharma und Universität Stuttgart) zur Bestimmung des prozentualen EPA-Gehalts lyophilisierter Algenbiomasse in zwei unterschiedlichen Chargen ( <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ; Pilotanlage Juli 2008 und Pilotanlage September 2008) mit den jeweiligen Bestimmungsmethoden.....	63

## **Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle 1: Projektplan mit Meilensteinen</i> .....	4
<i>Tabelle 2: Eingesetzte Algenbiomasse (Probe A – Technikumsversuch)</i> .....	42
<i>Tabelle 3: Ausgeführte Umesterungen unterteilt in verschiedene Ansätze (Probe A - Technikumsversuch)</i> ..	43
<i>Tabelle 4: EPA-Ausbeuteberechnung für Probe C</i> .....	45
<i>Tabelle 5: Verwendete Substanzen kg/kg Biomasse im Prozess der enzymatischen Aufarbeitung und der sauren Aufarbeitung (Ethanol und CO<sub>2</sub> werden im Prozess im Kreis gefahren).</i> ....	51

## **Abkürzungsverzeichnis:**

AA	Arachidonsäure C20:4
DHA	Docosahexaensäure C22:6
EE	Ethylester
EPA	Eicosapentaensäure C20:5
EtOH	Ethanol
FFA	Freie Fettsäure
FPA-Reaktor	Flat Panel Airlift Reaktor
gTS	Gramm Trockensubstanz
IGB	Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik
MGDG	Monogalactosyldiglycerid
PT	Abteilung Prozesstechnik am Fraunhofer IGB
RT	Raumtemperatur
scCO <sub>2</sub>	Superkritisches Kohlenstoffdioxid
SFC	Supercritical Fluid Chromatographie
SFE	Supercritical Fluid Extraction
TS	Trockensubstanz in % (w/v)
Upm	Umdrehungen pro Minute

## **Kooperation innerhalb des Projektes**

Es wurden neun Projektmeetings und ein Statusseminar innerhalb des Projektes durchgeführt. Es nahmen jeweils Vertreter und Vertreterinnen der drei Projektpartner teil.

1. Projektmeeting	31.07.2008 Bexbach
2. Projektmeeting	07.11.2008 Stuttgart
3. Projektmeeting	04.03.2009 Stuttgart
4. Projektmeeting	19.06.2009 Bexbach
5. Projektmeeting	07.10.2009 Hannover
6. Projektmeeting	25.01.2010 Stuttgart
7. Projektmeeting	22.07.2010 Bexbach
8. Projektmeeting	13.10.2010 Stuttgart
9. Projektmeeting	15.02.2011 Stuttgart
Statusseminar:	21.10.2009 Zwingenberg

Aufgrund der örtlichen Nähe war es für die Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des IGVT der Universität Stuttgart und der Subitec GmbH möglich, besonders eng zusammen zu arbeiten. Die gute Zusammenarbeit mit KD-Pharma war durch einen konstanten telefonischen und schriftlichen Verkehr gewährleistet.

## 1. Zusammenfassung

Ausgehend von vier in Laborkultivierungsständen untersuchten EPA-haltigen Mikroalgenarten konnten die drei Spezies *Phaeodactylum tricornutum*, *Monodus subterraneus* sowie *Nannochloropsis oculata* in Pilotanlagen im Freiland kultiviert werden. Hierbei wurde in der Pilotanlage in Eutingen-Weitingen im Sommer 2009 zur Kultivierung auch Rauchgas als industrielle CO<sub>2</sub>-Quelle erfolgreich eingesetzt – eine wichtige Voraussetzung für eine wirtschaftliche Produktion im industriellen Maßstab. Die produzierte Biomasse wurde den Projektpartnern IGVT und KD Pharma für Aufschluss- und Extraktionsversuche zur Verfügung gestellt.

Die Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* zeigte bei dem Vergleich von Aufschluss- und Extraktionsversuchen die besten Ergebnisse, so dass die Untersuchungen ab Herbst 2009 ausschließlich mit dieser Spezies durchgeführt wurden. Ein Vorteil der Verwendung von *Phaeodactylum tricornutum* als EPA-Quelle besteht darin, dass ein Aufschluss der Algenbiomasse nicht zwingend erfolgen muss: So konnte bei einer Ethanolextraktion von feuchter Biomasse eine Ausbeute von bis zu 90 % erzielt werden. Die Extraktion von EPA-haltigen Galaktolipiden aus feuchter Biomasse stellt energetisch gesehen eine interessante Variante dar, jedoch ist ein großes Ethanol-zu-Biomasse-Verhältnis notwendig, und damit ist die Produktkonzentration, auch bei vollständiger Extraktion, niedrig. Daher entschied man sich, weitere Versuche zur direkten Umesterung aus zuvor getrockneter Biomasse durchzuführen, um die Produktkonzentration im Extrakt zu erhöhen.

Als robustes Verfahren zur Gewinnung des Algenöls hat sich dabei die saure Veresterung mit anschließender Neutralisation und CO<sub>2</sub>-Extraktion herausgestellt, die die besten Ergebnisse bei verschiedenen Rohstoffen lieferte. Die CO<sub>2</sub>-Extraktion der Galactolipide aus nicht aufgeschlossener, getrockneter *Phaeodactylum tricornutum*-Biomasse erwies sich – auch mit Ethanol als Modifier - als nicht wirtschaftlich. Mit Hilfe der Chromatografie mittels überkritischem CO<sub>2</sub> (SFC) war es möglich, nach saurer Veresterung und anschließender CO<sub>2</sub>-Extraktion (SFE) ein Öl mit über 90 % EPA-Gehalt zu erhalten.

Das Haupttrennproblem bei der Gewinnung von EPA aus Fischöl ist die Trennung von EPA und DHA. Öle aus Algen enthalten entweder EPA oder DHA als Hauptkomponente. Damit verlagert sich das Haupttrennproblem auf die Trennung von EPA oder DHA von anderen Begleitstoffen oder Fettsäuren, wie im Falle der *Phaeodactylum*-Öle die C20:3.

## 2. Anlass und Zielsetzung

Ziel des Projektes war die Entwicklung eines integrierten Prozesses zur Gewinnung von EPA-reichem Algenöl aus phototroph produzierten Algen. Das über Extraktion mit überkritischem CO<sub>2</sub> gewonnene Öl zeichnet sich durch einen hohen Anteil der essentiellen Omega-3-Fettsäure EPA (Eicosapentaensäure) aus. Durch die Produktion von EPA mit phototrophen Algen in neu entwickelten Photobioreaktoren steht eine kostengünstige und rein vegetarische Quelle für Omega-3-Fettsäuren zur Verfügung. Die gewonnenen Algenöle können als funktionelle Lebensmittel für eine gesunde menschliche Ernährung eingesetzt werden. Die Gewinnung der Algenöle sollte durch den Einsatz von überkritischem CO<sub>2</sub> (SFE – Supercritical Fluid Extraction) für die selektive Extraktion der Omega-3-Fettsäuren aus der zuvor aufgeschlossenen Algenmatrix erfolgen. Ziel war es hierbei, eine kosten- und umweltfreundliche Alternative zur klassischen Lösungsmittelextraktion mit n-Hexan zu finden. Dieses sehr teure, gefährliche und mehrstufige klassische Lösungsmittelextraktionsverfahren sollte möglichst durch nur einen CO<sub>2</sub>-Extraktionsschritt ersetzt werden. Dadurch steigt die Wirtschaftlichkeit wie auch die Umweltverträglichkeit eines solchen Verfahrens deutlich und grenzt sich gegenüber den klassischen Verfahren ab.

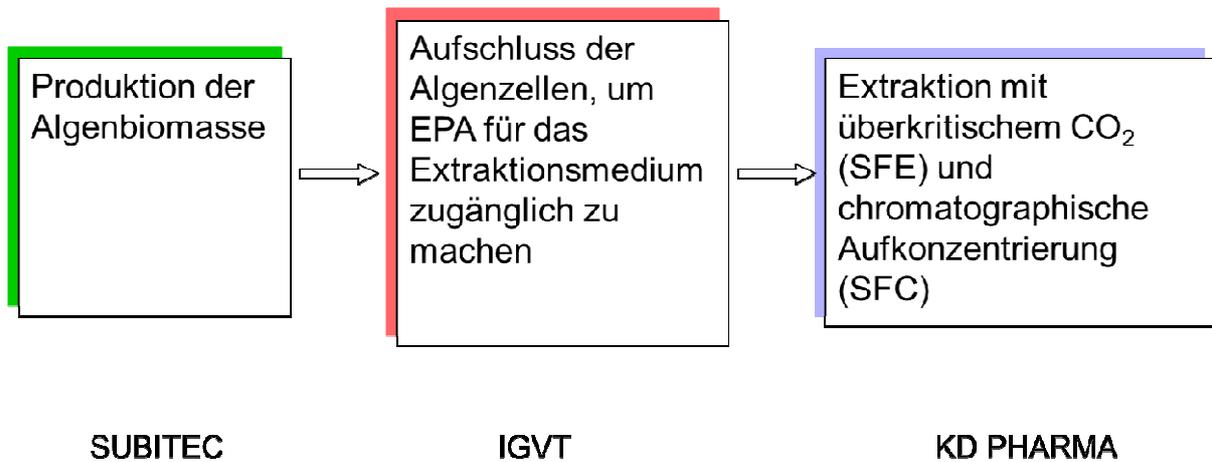
Eine Aufkonzentrierung der hochungesättigten Fettsäuren aus den mittels SFE gewonnenen Algenölen sollte anschließend mittels SFC (Supercritical Fluid Chromatography) durchgeführt werden. Auf diese Weise sollte ein weltweit einzigartiges hochkonzentriertes EPA-Algen-Öl hergestellt werden.

Das neuentwickelte biotechnologische Verfahren stellt darüber hinaus ein nachhaltiges, Ressourcen schonendes und umweltgerechtes Herstellungsverfahren dar. Die Omega-3-Fettsäure wird direkt aus den Mikroalgen gewonnen, den eigentlichen Primärproduzenten der langkettigen Omega-3-Fettsäuren, und nicht - wie bisher üblich - aus Fischöl. Qualitative Schwankungen der konventionellen Methode (Extraktion der Öle aus Kaltwasserfischen) werden verhindert und die Ressource Fisch geschont. Fischöle gelten als häufig stark belastet mit Umweltchemikalien wie PCBs oder Quecksilber. Deshalb stellen Omega-3-Fettsäuren aus Mikroalgen eine einzigartige Quelle dar, die besonders für Lebensmittel und Nahrungsergänzungsmittel geeignet sind.

Das EPA-reiche Algenöl ist aber nicht nur für die menschliche Ernährung wichtig, sondern aufgrund seiner entzündungshemmenden Wirkung auch ein sehr interessanter Wirkstoff für kosmetische Formulierungen und - nach einer entsprechenden Aufarbeitung - auch für zulassungspflichtige Arzneimittel und/oder OTC-Produkten von großem Interesse.

Weitere wichtige umweltrelevante Vorteile dieses neuen Verfahrens sind zum einen, dass bei der Algenproduktion - im Gegensatz zu fast allen anderen Fabrikationsverfahren - CO<sub>2</sub> verbraucht und O<sub>2</sub> gebildet wird. Die Extraktion (SFE) und Chromatographie (SFC) mit überkritischem CO<sub>2</sub> hat ein hohes Potential im Bereich des prozessintegrierten Umweltschutzes. Die Ökoeffizienz dieses neuartigen Verfahrens für die selektive Gewinnung von EPA-reichen pflanzlichen Ölen aus einer Algenmatrix soll im Rahmen des beantragten Projektes begutachtet und quantifiziert werden.

Die Zusammenarbeit der drei Projektpartner ist in der folgenden Abbildung dargestellt:



**Abbildung 1:** Zusammenarbeit der Projektpartner entlang der Wertschöpfungskette

Die Projektlaufzeit war von Juni 2008 bis Oktober 2010 (28 Monate) geplant und wurde kostenneutral bis Dezember 2010 verlängert (zur Darstellung der bei Antragsstellung geplanten und nach dem Statusseminar adjustierten Arbeitspakete siehe Anhang 1).

**Tabelle 1:** Projektplan mit Meilensteinen

Arbeitspaket	1. Jahr				2. Jahr			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1. Auswahl und Test von EPA-Produzenten	MS1							
2. Entwicklung Prozess-technik				MS2				
3. Algenproduktion im Pilotmaßstab				MS3			MS4	
4. Optimierung des Zellaufschlusses							MS5	
5. Optimierung der Extraktion mit scCO <sub>2</sub>							MS6	
6. Projektkoordination und –dokumentation								

**Meilensteine:**

**MS1:** Identifizierung der am besten geeigneten photoautotrophen EPA-Produzenten (4 Stämme)

**MS2:** Wichtigste Prozessparameter wie pH, CO<sub>2</sub>-Konz., Temperatur und Betriebsweise optimiert; Daten für Prozessauslegung (Betriebsweise) werden zur Verfügung gestellt

**MS3:** Biomassechargen für Aufschluss und Extraktion von 2 EPA-Produzenten stehen zur Verfügung

**MS4:** Biomassechargen für Aufschluss und Extraktion von 2 weiteren EPA-Produzenten stehen zur Verfügung

**MS5:** Aufschlussverfahren für 4 verschiedene Algen stehen zur Verfügung

**MS6:** Marktreifes EPA-Öl bzw. Produkt (-palette)

### 3. Ergebnisse der Arbeitspakete

#### 3.1. AP 1 Auswahl und Test von EPA – Produzenten

Bei der Auswahl der EPA–Produzenten wurden vor allem Kriterien wie Biomasseproduktivität und EPA–Gehalt berücksichtigt. Basierend auf eigenen Erkenntnissen [Fraunhofer IGB, Subitec GmbH], Literaturrecherchen und Absprachen der Projektpartner wurden für dieses Projekt folgende Algen ausgewählt:

- *Phaeodactylum tricornutum*
- *Nannochloropsis oculata*
- *Monodus subterraneus* (statt der ursprünglich vorgesehenen Spezies *Tetraselmus suecica*)
- *Odontella aurita*

Man hat sich während der Literaturrecherchen für *Monodus subterraneus* und gegen *Tetraselmus suecica* entschlossen, weil diese Alge ein höheres Temperaturoptimum (ca. 24°C) hat und schneller wächst. *Odontella aurita* wurde auf Wunsch der KD Pharma GmbH ausgewählt, weil diese Alge zu Zeit als einziger potentieller EPA – Produzent im Rahmen der Novel Food-Verordnung durch die EU zugelassen wurde. Die Kultivierung von *Phaeodactylum tricornutum* und *Nannochloropsis oculata* im Rahmen dieses Projektes stand dagegen von Anfang an fest. *Phaeodactylum tricornutum* gilt als eine sehr gut untersuchte Alge, die schnell wächst und bis zu 5 Prozent EPA (Anteil am Gesamtfettsäuregehalt) enthält. *Nannochloropsis oculata* ist ebenfalls eine gut untersuchte Alge, mit ebenfalls hohem EPA–Gehalt und etwas höherer Temperaturtoleranz als *Phaeodactylum tricornutum*.

## 3.2. AP 2 Entwicklung und Optimierung des Kultivierungsprozesses

Um die ausgewählten Algen im Freiland kultivieren zu können, wurden zahlreiche Prozessparameter wie die Abhängigkeit der Produktivität von der Lichtintensität, der CO<sub>2</sub>-Konzentration bei der Kultivierung, der Temperatur, der Betriebsweise sowie von verschiedenen Kultivierungsmedien untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche mit *Nannochloropsis oculata*, *Monodus subterraneus* und *Odontella aurita* beschrieben. *Phaeodactylum tricornutum* konnte direkt im Freiland kultiviert werden, da die notwendige Prozessoptimierung bereits vor Beginn des Projektes erfolgte (Meiser 2004).

Der EPA-Gehalt der Algenbiomasse (trocken) wurde mit der am Fraunhofer IGB entwickelten Standardmethode ermittelt. Die Vergleichbarkeit dieser Methode mit der Methode, die bei KD-Pharma zum Einsatz kommt, wurde zuvor durch einen Ringversuch bestätigt (siehe Anhang 2).

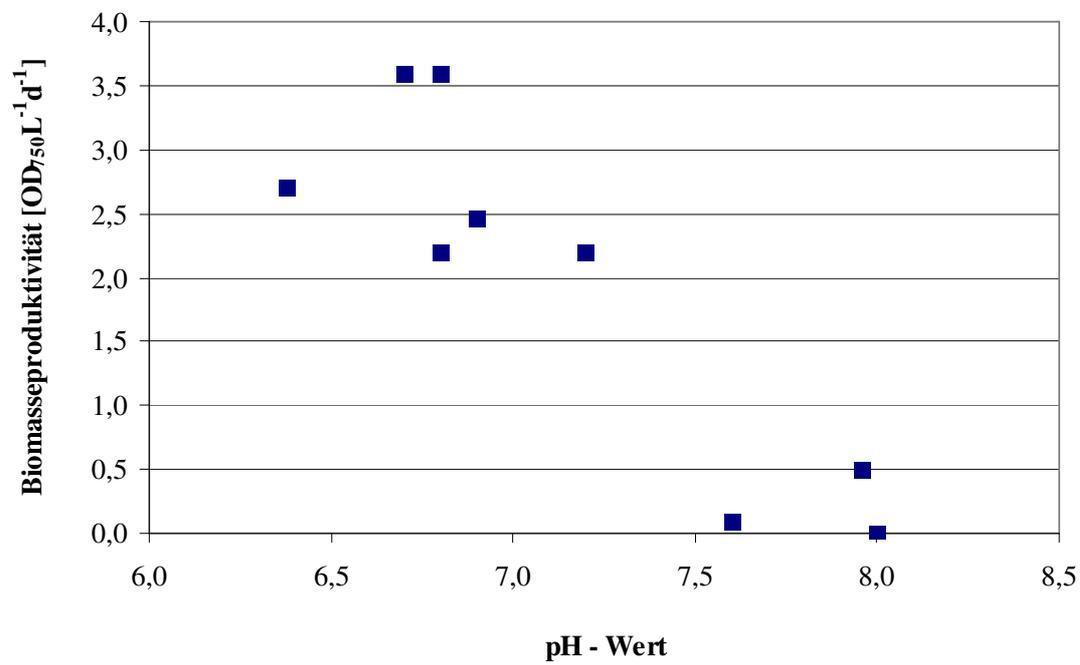
### 3.2.1. AP 2.1 Optimierung der Prozessparameter Lichtintensität, CO<sub>2</sub>-Konzentration, Temperatur und Betriebsweise für *Nannochloropsis oculata*

#### Temperatur

*Nannochloropsis oculata* sollte im Freiland in einem Temperaturbereich zwischen 20° und 25°C kultiviert werden, das Optimum liegt bei ca. 23°C. Bei 27°C wird kein Wachstum mehr festgestellt. In Laborversuchen bei 27°C und bei Dauerlicht nach ca. 3 Tagen war die Kultur abgestorben, die Biomassekonzentration nahm sofort nach der Umstellung auf eine Temperatur von 27°C ab.

#### pH-Wert

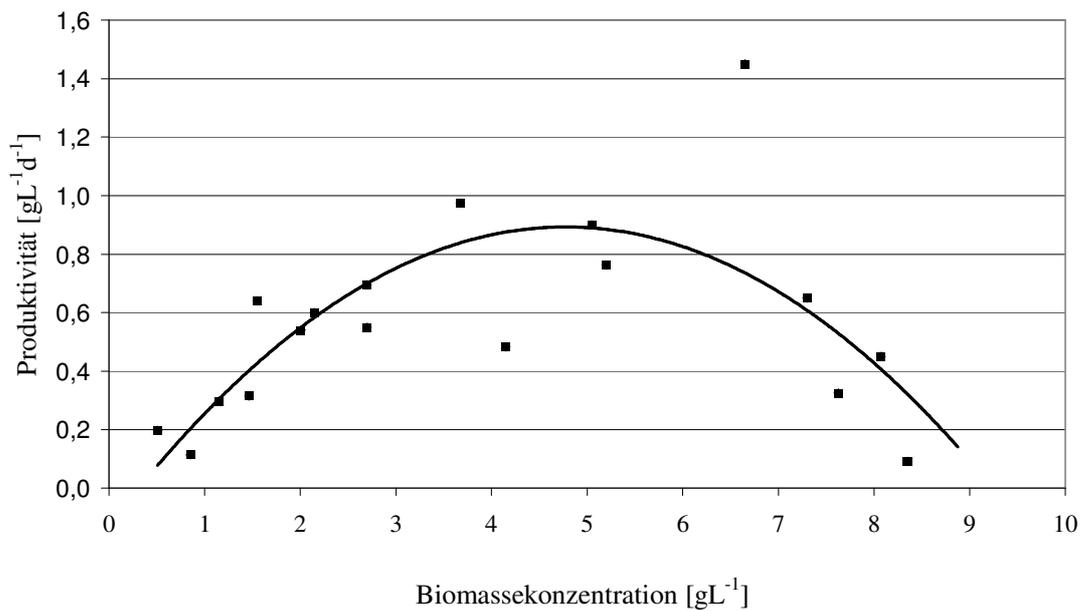
Das Optimum für den pH-Wert liegt für *Nannochloropsis oculata* bei einem pH-Wert von 6,7. Bei einem pH-Wert von mehr als 7,5 ist das Wachstum sehr stark limitiert. Der Zusammenhang zwischen Biomasseproduktivität und pH-Wert ist in Abbildung 2 dargestellt. Um den optimalen pH-Wert zu erreichen, wird eine relativ hohe CO<sub>2</sub>-Konzentration benötigt. Bei hoher Biomassekonzentration kann die CO<sub>2</sub>-Konzentration 5 bis 10 Prozent (v/v) betragen.



**Abbildung 2:** Biomasseproduktivität von *Nannochloropsis oculata* in Abhängigkeit vom pH-Wert

### Biomasseproduktivität in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration

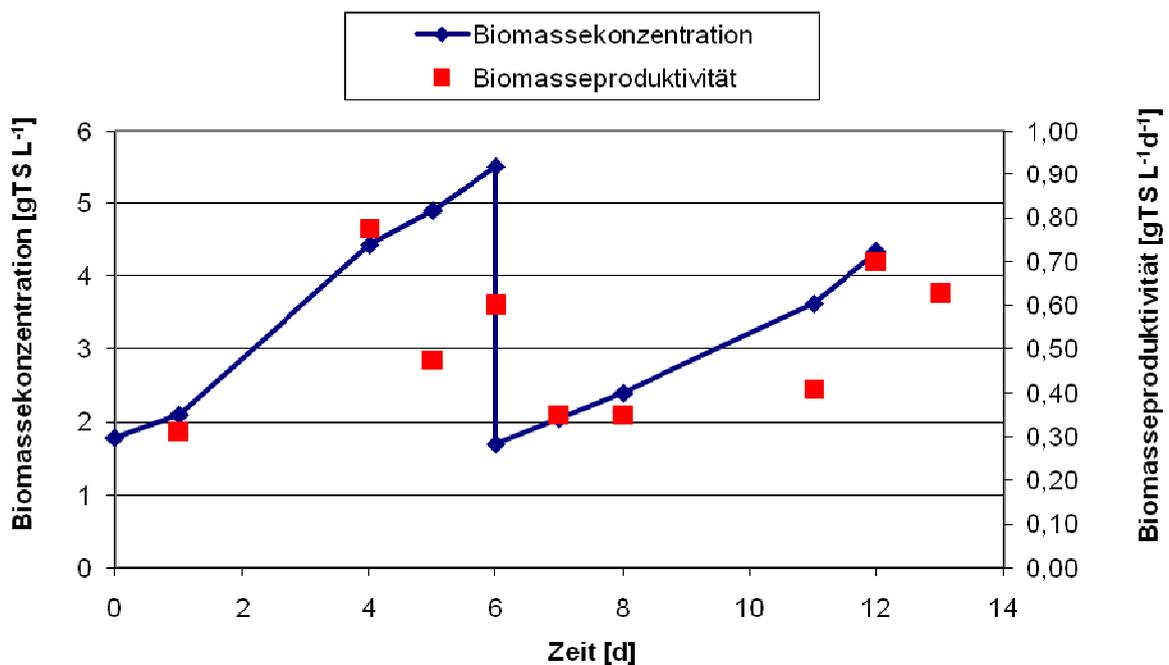
Die durchschnittliche Produktivität von *Nannochloropsis oculata* im FPA-Reaktor beträgt auf Nitrat als Stickstoffquelle ca.  $0,6 \text{ gTS l}^{-1}\text{d}^{-1}$ . Die Produktivität ist sowohl von der zugeführten Energie in Form von Licht als auch von der Biomassekonzentration abhängig. Der Zusammenhang zwischen Produktivität und Biomassekonzentration bei konstanter Lichtintensität ist in Abbildung 3 dargestellt. Die höchste durchschnittliche Produktivität wurde bei einer Biomassekonzentration zwischen  $2 \text{ gTS l}^{-1}$  und  $7 \text{ gTS l}^{-1}$  erreicht.



**Abbildung 3:** Produktivität in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration für *Nannochloropsis oculata*

## Stickstoffquelle

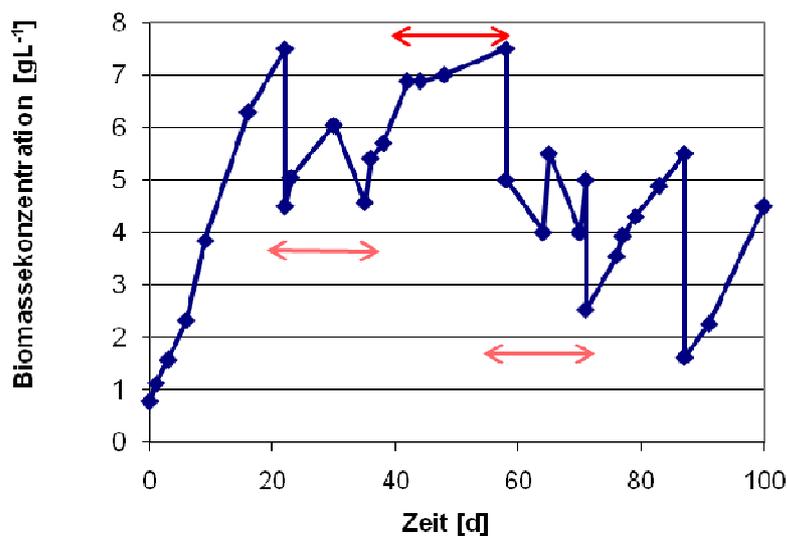
*Nannochloropsis oculata* wurde auf Nitrat und Harnstoff kultiviert (siehe Abbildung 4). Dabei konnten keine deutlichen Unterschiede in der Biomasseproduktivität festgestellt werden. Die Umstellung von Nitrat auf Harnstoff kann teilweise zu Problemen führen. Vor allem bei Kulturen mit niedriger Biomassekonzentration ist diese Umstellung problematisch, weil während der Adaption auf Harnstoff kein Wachstum möglich ist und bei etwas höherer Lichtintensität die Kultur absterben kann. Bei Nutzung von Harnstoff als Stickstoffquelle kann bei etwas niedrigerem pH-Wert kultiviert werden und dadurch die Biomasseproduktivität leicht gesteigert werden. Die durchschnittliche Biomasseproduktivität bei optimalen Bedingungen im Labor bei Dauerlicht und Nutzung von Harnstoff beträgt ca.  $0,7 \text{ gTS l}^{-1}\text{d}^{-1}$ .



**Abbildung 4:** Wachstum von *Nannochloropsis oculata* auf Nitrat (Tag 0-6) und Harnstoff (Tag 6-12) als Stickstoffquelle

### Betriebsweise bei der Kultivierung von *Nannochloropsis oculata*

Bei einer längeren Laufzeit eines Reaktors mit *Nannochloropsis oculata*-Kultur wurde festgestellt, dass zahlreiche Probleme auftreten können. Vor allem die Bildung und die darauffolgende Absetzung von Agglomeraten sind problematisch. Auch die Produktion von Stoffen, die an einer Verfärbung des Mediums zu erkennen sind, hat eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum der Kultur. Als Beispiel soll hier eine ca. dreimonatige Kultivierung der Alge in einem 30 Liter-FPA Reaktor dienen (siehe Abbildung 5). Dabei kann man erkennen, dass die immer wieder auftretenden Kultivierungsprobleme (rote Pfeile im Diagramm) nur durch einen regelmäßigen Austausch des Mediums verhindert werden können. Aus diesem Grund soll diese Kultur im Freiland mindestens wöchentlich geerntet und mit frischem Medium aufgefüllt werden. Pro Woche sollte ein Volumen von 20 bis 50 Prozent, in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen (Lichtverfügbarkeit und Temperatur), ausgetauscht werden. Um die Agglomeratbildung in der Kultur zu verhindern, sollen die Begasungsrate höher als bei Kultivierung anderer Algen eingestellt werden.



**Abbildung 5:** Wachstum von *Nannochloropsis oculata* in einem 30 Liter-Reaktor  
(Pfeile: Kultivierungsprobleme wahrscheinlich durch inhibierende Stoffe)

### 3.2.2. AP 2.2 Optimierung der Prozessparameter Lichtintensität, CO<sub>2</sub>-Konzentration, Temperatur und Betriebsweise für *Monodus subterraneus* und *Odontella aurita*

#### Wachstumsversuche mit *Monodus subterraneus*

##### Temperatur

*Monodus subterraneus* kann in Temperaturbereich zwischen 20° und 27°C kultiviert werden, das Optimum liegt bei ca. 25°C.

##### pH-Wert

*Monodus subterraneus* wächst relativ unabhängig vom pH-Wert im Bereich von 6,5 bis 8,2. Die höchste durchschnittliche Biomasseproduktivität kann bei ca. 7,5 erreicht werden (siehe Abbildung 6).

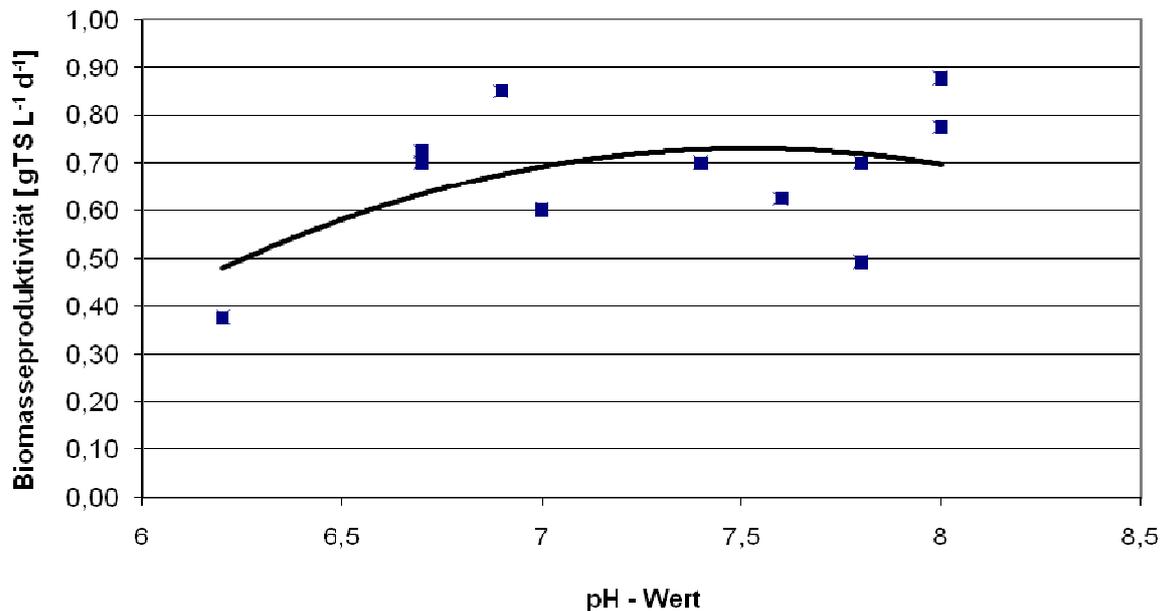
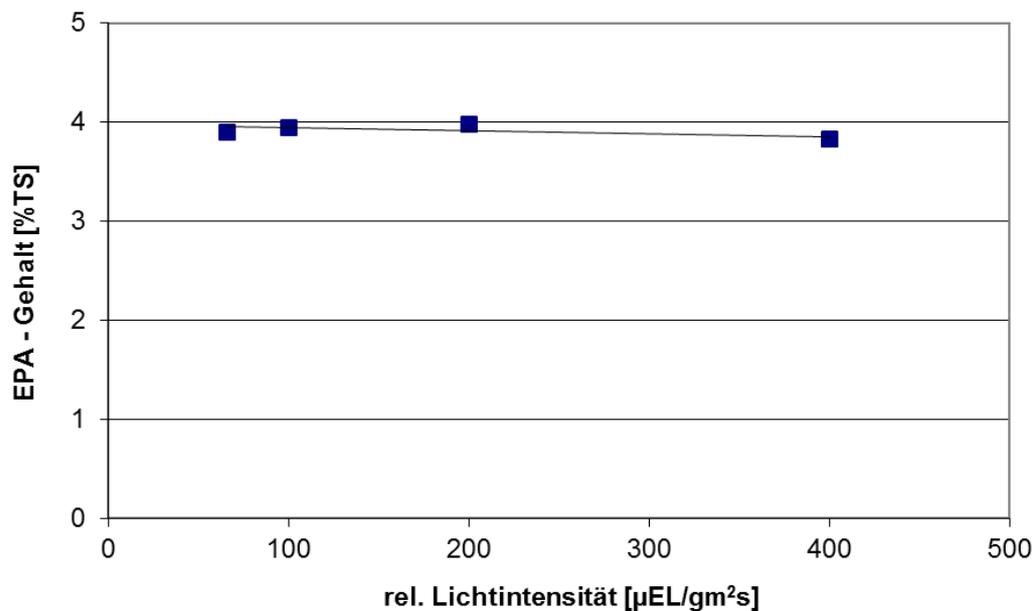


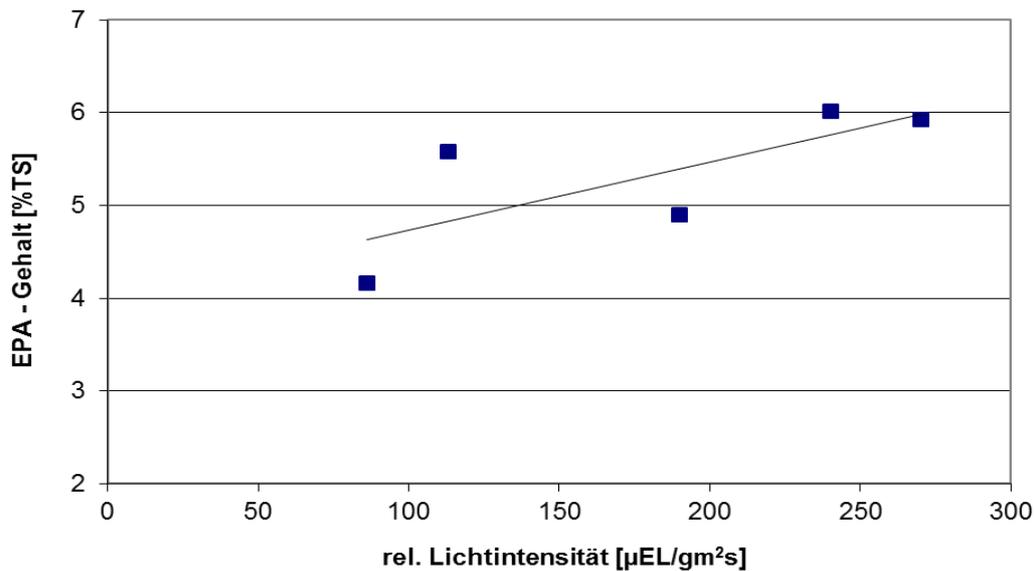
Abbildung 6: Biomasseproduktivität von *Monodus* in Abhängigkeit von pH-Wert

### EPA – Gehalt in Abhängigkeit von Biomassekonzentration

Der EPA–Gehalt bei *Monodus subterraneus* ist konstant und in weiten Bereichen von der Lichtintensität und Biomassekonzentration unabhängig. Der EPA–Gehalt liegt bei ca. 4 Prozent TS (siehe Abbildung 7). Aus diesem Grund muss bei der Kultivierung dieser Alge nur die Biomasseproduktivität optimiert werden, um die maximale EPA-Produktivität zu erreichen. Im Gegenteil zu *Monodus subterraneus* zeigt *Nannochloropsis oculata* eine sehr starke Abhängigkeit des EPA–Gehalts von der Biomassekonzentration und der relativen Lichtintensität (siehe Abbildung 8). Aus diesem Grund sollte diese Alge, um eine maximale EPA–Produktivität zu erreichen, mit Biomassekonzentrationen zwischen 2 und 5 gTS l<sup>-1</sup> kultiviert werden. Hierdurch kann gewährleistet werden, dass eine hohe relative Lichtintensität erreicht wird, was sich im hohen EPA-Gehalt widerspiegelt.



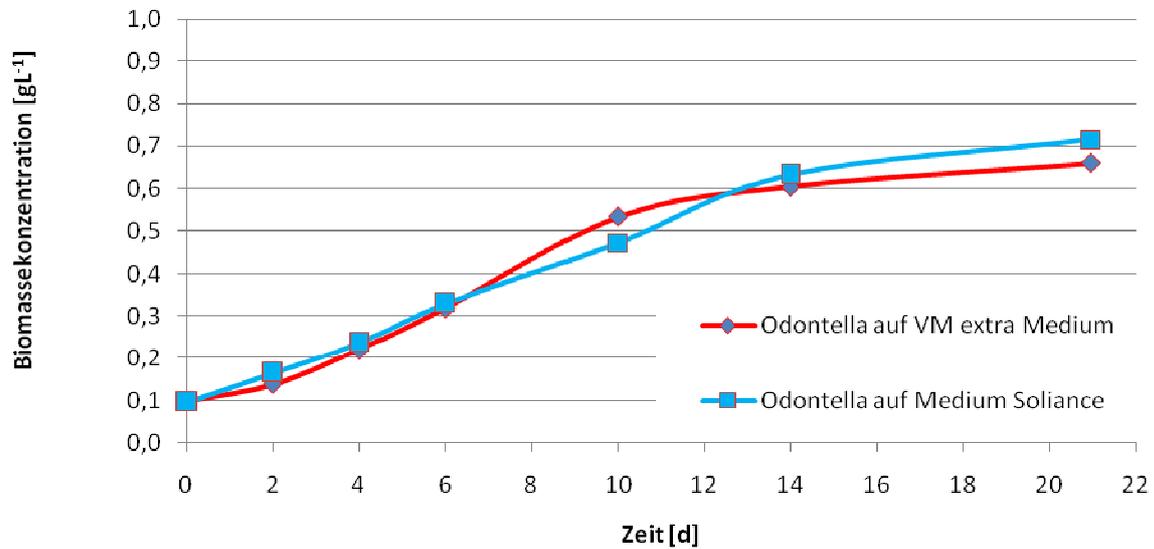
**Abbildung 7:** *Monodus subterraneus* - EPA – Gehalt in Abhängigkeit von der Lichtintensität und Biomassekonzentration (rel. Lichtintensität)



**Abbildung 8:** *Nannochloropsis oculata* - EPA-Gehalt in Abhängigkeit von der Lichtintensität und Biomassekonzentration (rel. Lichtintensität)

### Wachstumsversuche mit *Odontella aurita*

Im Rahmen dieses Projektes wurden durch Subitec GmbH drei *Odontella* Stämme (Eigenisolat der Firma Soliance, CCMP 1796 und CCAP 1054/1) untersucht. Dabei gab es anfangs Probleme mit der Auswahl des Mediums. Zunächst wurden alle drei Stämme auf mit Nährstoffen angereichertem Meerwasser aus Frankreich und auf synthetischem Meerwassermedium (VM – Standardmedium) kultiviert. Dabei zeigte sich, dass diese Kieselalgen nicht auf dem VM-Medium zu kultivieren waren, wahrscheinlich weil notwendige Spurenelemente fehlten. Nach einer Modifikation des VM-Mediums durch Verwendung von speziellem Meersalz mit einem deutlich höheren Anteil an Spurenelementen konnte alle drei *Odontella*-Stämme zum Wachstum gebracht werden. Der Vergleich zwischen dem Medium von Soliance (angereichtes Meerwasser) und dem modifiziertem VM Medium (VM extra Medium) in 500 ml Kolben ist in Abbildung 9 dargestellt. Dabei konnten keine Unterschiede im Wachstum zwischen den beiden Medien festgestellt werden. Die durchschnittliche Produktivität von *Odontella aurita* im Schüttelkolben betrug jedoch nur  $0,04 \text{ gTS l}^{-1}\text{d}^{-1}$ , was relativ wenig ist, verglichen mit Schüttelkulturen anderer Algen wie z.B. *Chlorella vulgaris* mit  $0,130 \text{ gTS l}^{-1}\text{d}^{-1}$ .

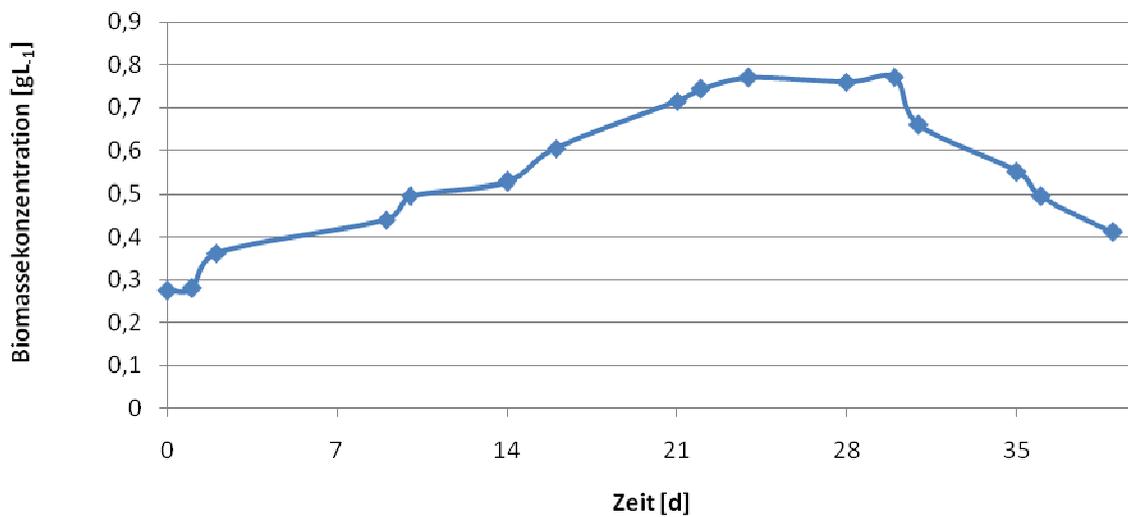


**Abbildung 9:** Wachstum von *Odontella aurita* auf zwei Medien

Nach einer erfolgreichen Bereitstellung der Vorkultur in begasten 10 Liter-Flaschen wurde diese Alge in dem 5 Liter FPA-Reaktor kultiviert. Die Wachstumskurve ist in Abbildung 10 dargestellt. Dabei war es jedoch nicht möglich, eine hohe Biomassekonzentration zu erreichen. Die maximale Biomassekonzentration von ca.  $0,8 \text{ gTS l}^{-1}$  wurde nach ca. 3 Wochen nach der Inokulation erreicht. In der Wachstumsphase, bei relativ hoher Lichtintensität, wurde eine durchschnittliche Biomasseproduktivität zwischen  $0,04 \text{ gTS l}^{-1}\text{d}^{-1}$  und  $0,08 \text{ gTS l}^{-1}\text{d}^{-1}$  erreicht.

Zu den größten Problemen bei der Kultivierung von *Odontella aurita* gehört das schnelle Absetzen der Kultur, verursacht durch die Morphologie der Alge. Unter dem Mikroskop kann man fast nie einzelne Zellen beobachten, da *Odontella aurita* lange Ketten bildet, die zu Agglomeration und Sedimentation im Reaktor führen.

Da die erreichte Biomasseproduktivität und die Biomassekonzentration sehr niedrig waren, ist diese Alge für eine Produktion von EPA im FPA-Reaktor nicht geeignet.



### **3.3. AP 3 Algenproduktion für die Versuchsmusterherstellung**

#### **3.3.1. AP 3.1 Umrüstung und Inbetriebnahme der Pilotanlagen**

##### **Pilotanlage in Eutingen- Weitingen**

Im Jahr 2008 wurde im Rahmen dieses Projektes auf der Pilotanlage der Subitec GmbH in Eutingen-Weitingen nur *Phaeodactylum tricornutum* kultiviert. Es konnte auf Erfahrungen mit dieser Alge in der Freilandproduktion im 30 Liter-FPA zurück gegriffen werden (Meiser, 2004). 2009 wurde die Pilotanlage umgebaut und erweitert, um neben *Phaeodactylum tricornutum* auch *Nannochloropsis oculata* und *Monodus subterraneus* zu kultivieren. Bis September 2009 wurden im Rahmen des DBU-Projektes die Algen *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis oculata* und *Monodus subterraneus* im Kilogramm-Maßstab produziert und an die Projektpartner weitergegeben. Es wurden die Ergebnisse aus dem Labor berücksichtigt, um Algenbiomasse mit hohem EPA-Gehalt zu produzieren. Es konnte daher *Phaeodactylum tricornutum*-Biomasse mit mindestens 4 Prozent EPA, *Nannochloropsis oculata*-Biomasse mit mehr als 5 Prozent EPA-Gehalt und *Monodus subterraneus*-Biomasse mit konstantem EPA-Gehalt von 4 Prozent produziert werden. Neben der Produktion der Algenbiomasse wurden auch zahlreiche Versuche zur Optimierung der Kultivierung im Freiland durchgeführt. Für die Kultivierung von *Phaeodactylum tricornutum* standen zwei Module mit je acht 180 Liter-FPA-Reaktoren zur Verfügung, *Nannochloropsis oculata* und *Monodus subterraneus* wurden in Einzelreaktoren kultiviert. Die Pilotanlage wurde im Frühjahr 2010 stillgelegt und abgebaut.

##### **Pilotanlage in Reutlingen**

Nach einer vorgezogenen Inbetriebnahme der neuen Anlage im Gewächshaus im Mai 2010, wurde dort bis zum November 2010 *Phaeodactylum tricornutum*-Biomasse produziert. Es standen hierfür zwölf 180 Liter-FPA-Reaktoren zur Verfügung.

### 3.3.2. AP 3.2 Herstellung von *Phaeodactylum tricornutum*-Chargen

#### Chargen in 2008

Das Wachstum von *Phaeodactylum tricornutum* im Freiland ist für den Sommer 2008 in Abbildung 11 dargestellt. Diese Alge wurde von Mitte Juni bis Anfang November 2008 kultiviert.

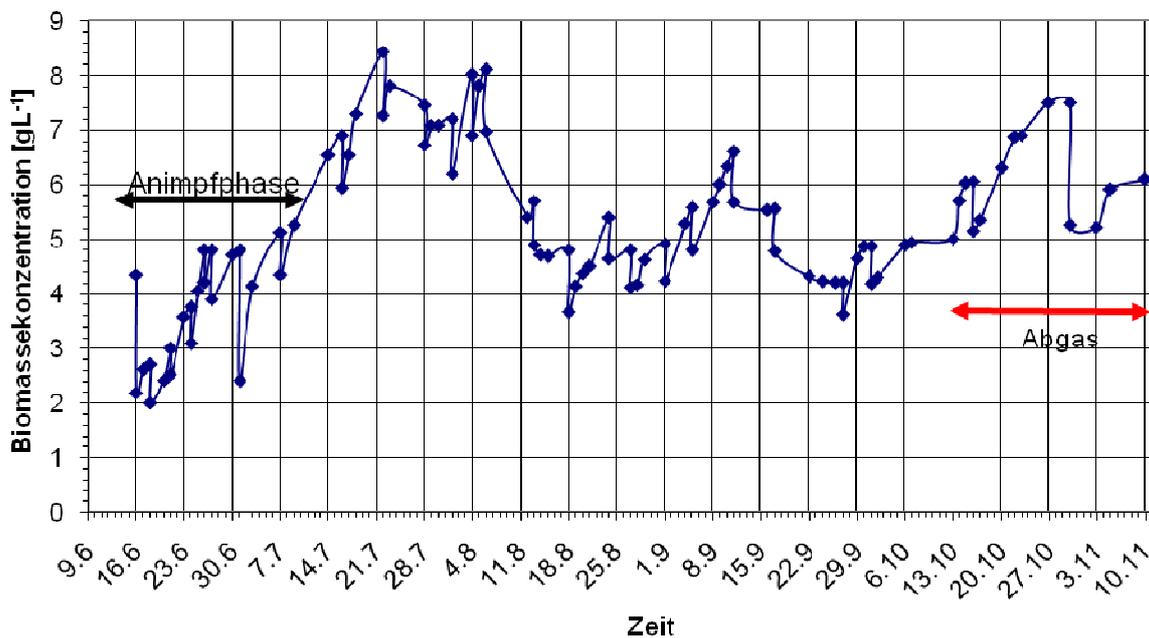
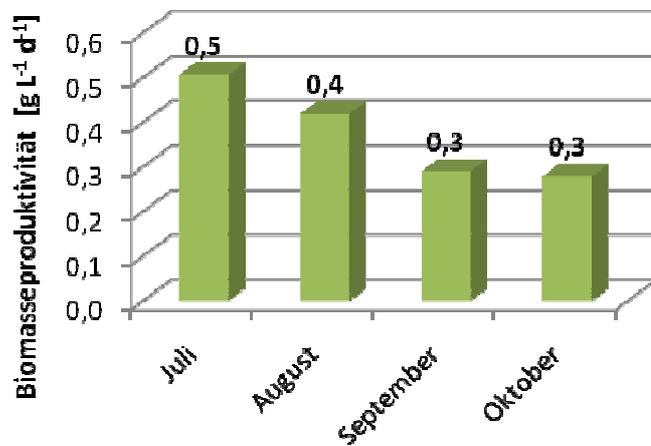


Abbildung 11: Wachstum von *Phaeodactylum tricornutum* im Freiland im Jahr 2008

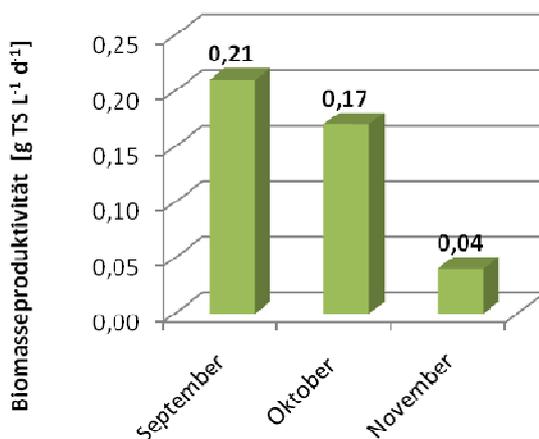
In diesem Zeitraum konnten ca. 21 kg an *Phaeodactylum tricornutum*-Biomasse hergestellt werden. Die Biomasseproduktivität von *Phaeodactylum tricornutum* im Jahr 2008 ist in Abbildung 12 dargestellt. Als Kohlenstoffquelle wurde bis Mitte Oktober technisches CO<sub>2</sub> verwendet, danach wurde die Produktion auf CO<sub>2</sub> aus dem Abgas eines biogasbetriebenen BHKWs umgestellt. Es konnten keine Unterschiede in der Qualität der Biomasse und der Produktivität festgestellt werden.



**Abbildung 12:** Durchschnittliche Biomasseproduktivität pro Monat bei der Kultivierung von *Phaeodactylum* im Jahr 2008

### Chargen in 2009

Im Vergleich zum Jahr 2008 wurde im Sommer 2009 *Phaeodactylum* bei niedrigerer Biomassekonzentration kultiviert, um den gewünschten hohen EPA-Gehalt (mehr als 4 Prozent) zu erreichen. Der EPA-Gehalt der Algenbiomasse (trocken) wurde mit der vom Fraunhofer IGB entwickelten Standardmethode ermittelt. Der Produktionszeitraum umfasste Mai bis Anfang Juli und Ende September bis Anfang November, insgesamt ca. 3,5 Monate. Die Biomasseproduktivität im Sommer lag wiederum im Bereich zwischen 0,3 und 0,5 g l<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. Die Biomasseproduktivität im Herbst war deutlich geringer und lag bei 0,04 bis 0,21 g TS l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (siehe Abbildung 13). Die produzierte trockene Biomasse betrug 5,6 kg.



**Abbildung 13:** Durchschnittliche Biomasseproduktivität pro Monat bei der Kultivierung von *Phaeodactylum* im Herbst 2009

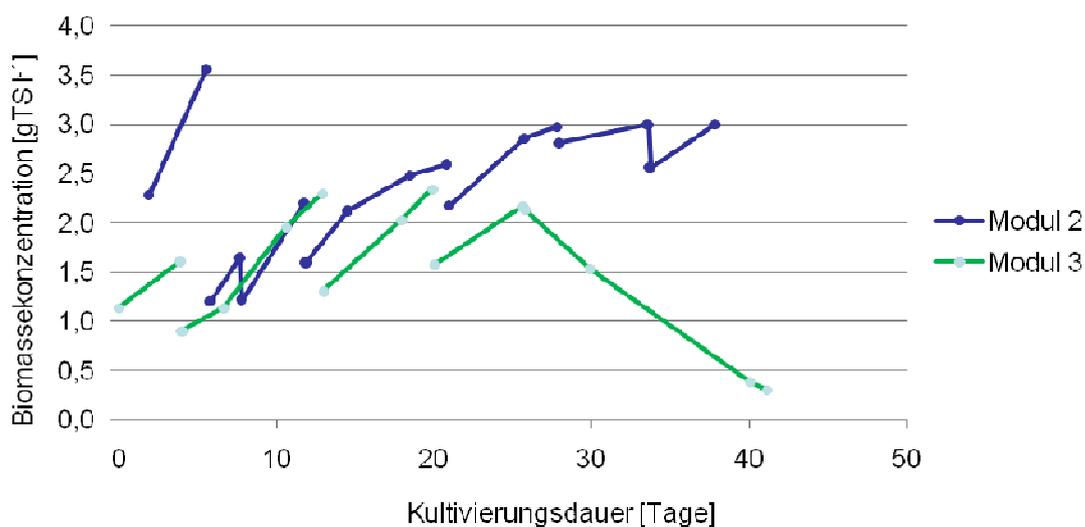
## Chargen in 2010

### Labor

Von Mitte Februar bis Mitte Mai (ca. 3 Monate) wurde *Phaeodactylum tricornutum*-Biomasse in ein bis drei 30 Liter-FPA-Reaktoren im Labor produziert. Die produzierte, gewaschene und getrocknete Biomasse (1,5 kgTS) wurde an das IGVT geliefert. Die durchschnittliche Biomasseproduktivität bei Dauerlicht betrug  $0,9 \text{ gTS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Von Anfang Oktober bis Ende Dezember (ca. 3 Monate) wurde zusätzlich zur Pilotanlagenproduktion *Phaeodactylum tricornutum*-Biomasse in zwei 30 Liter-FPA-Reaktoren im Labor produziert. Die Biomasse wurde gewaschen und eingefroren an das IGVT (ca.1 kgTS) bzw. gewaschen und getrocknet an KD Pharma (0,6 kg TS) geliefert.

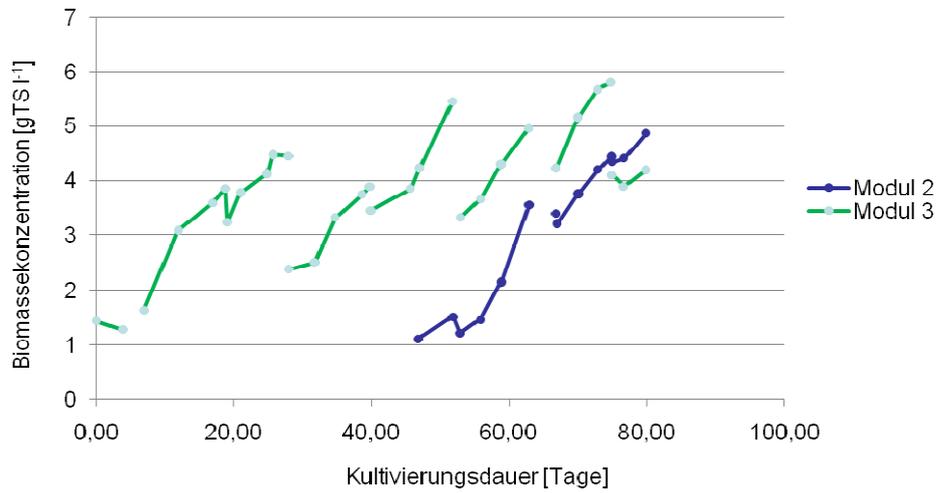
### Pilotanlage

Auf der Pilotanlage im Gewächshaus in Reutlingen wurde ab Mai 2010 *Phaeodactylum tricornutum* kultiviert (siehe Abbildung 14). Durch einen Ausfall der Kühlung starb die erste Kultur ab.



**Abbildung 14:** Erste Kultivierung von *Phaeodactylum tricornutum* im Gewächshaus in Reutlingen (Abbrechen der Linie = Ernte bzw. Überimpfen auf weitere Reaktoren). Am 38. bzw. 42. Tag wurde die Kultur abgelaufen

Die zweite Kultivierung verlief von Ende Juli bis November 2010 (siehe Abbildung 15). Die Biomassekonzentration betrug 2 bis 6 gTS l<sup>-1</sup>. Es wurden insgesamt 7 kg gewaschene und getrocknete Biomasse produziert und an KD-Pharma übergeben.



**Abbildung 15:** Zweite Kultivierung von *Phaeodactylum tricornutum* im Gewächshaus in Reutlingen (Abbrechen der Linie = Ernte bzw. Überimpfen auf weitere Reaktoren)

### 3.3.3. AP 3.3 Herstellung von *Nannochloropsis oculata* – Chargen

Alle Kultivierungen im Freiland fanden bei konstanter Begasungsrate, konstantem CO<sub>2</sub>-Gehalt der Zuluft, sowie bei teilweise zu hohen Temperaturen statt, da die verwendete Verdunstungskühlung bei hohen Außentemperaturen und hoher Lichtintensität an ihre Grenzen stößt. Bei besserer Temperaturkontrolle sowie geregelterm CO<sub>2</sub>-Gehalt bzw. geregelter Begasungsrate sollte ein deutlicher Anstieg der volumetrischen Produktivitäten zu erwarten sein.

*Nannochloropsis oculata* wurde in zwei 180 Liter-FPA-Reaktoren kultiviert. Es wurde Anfang Juni in dem FPA 2 (Modul 1) angeimpft, die Kultur in FPA 3 (Modul 1) wurde durch Teilung der Kultur in FPA 2 Anfang Juli erhalten (siehe Abbildung 16). Die Kultur in FPA 2 wurde durchgehend mit Kaliumnitrat als Stickstoffquelle kultiviert, die Kultur in FPA 3 wurde Ende Juli auf Ammoniumcarbonat umgestellt. Dies hatte eine Adaptionsphase zur Folge, in der die Biomassekonzentration abfiel. Der Ausfall der Kühlung am 21. Juli hatte dagegen keine negativen Auswirkungen auf die Kultur in FPA 3, dagegen aber auf die Kultur in FPA 2.

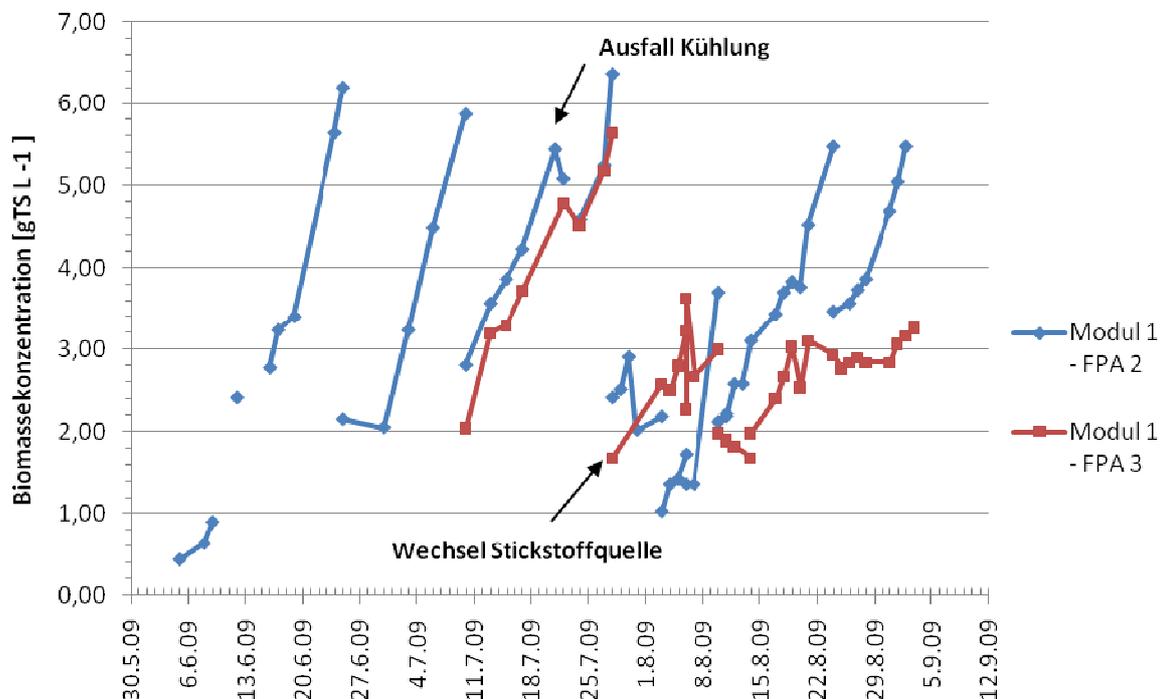


Abbildung 16: Wachstum von *Nannochloropsis oculata* auf technischer Kohlensäure

### Kultivierung in FPA 2

Es wurde mit einer Biomassekonzentration von 2 bis 6 gTS l<sup>-1</sup> kultiviert, um die Zellen mit möglichst viel Licht zu versorgen. Dabei wurden durchschnittliche Biomasseproduktivitäten zwischen 0,14 und 0,30 gTSl<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> erreicht (siehe Abbildung 17). Die maximale Biomasseproduktivität bei einer Biomassekonzentration von 3,0 gTSl<sup>-1</sup> betrug 0,42 gTSl<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> (Anfang September). Die monatliche Biomasseproduktivität war von Juli bis September am höchsten. Normalerweise wäre eine maximale Produktivität im Juni zu erwarten. Allerdings reduzierte die Adaptionsphase nach dem Animpfen die durchschnittliche Produktivität.

### Kultivierung in FPA 3

Es wurde mit einer Biomassekonzentration von 1,5 bis 4 gTSl<sup>-1</sup> kultiviert. Dabei wurden durchschnittliche Biomasseproduktivitäten von 0,05 bis 0,15 gTSl<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> erreicht (siehe Abbildung 17). Die maximale Biomasseproduktivität bei einer Biomassekonzentration von 2,3 gTSl<sup>-1</sup> wurde Ende August erreicht und betrug wie bei FPA 2 0,42 gTSl<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

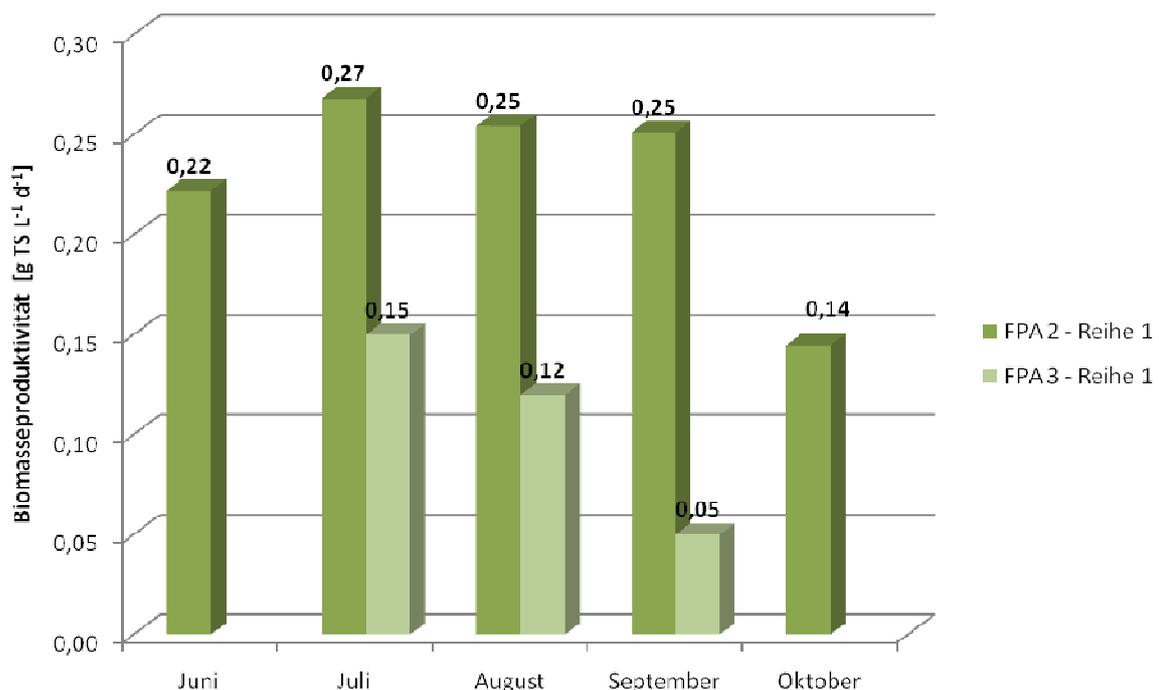


Abbildung 17: Durchschnittliche monatliche Biomasseproduktivität 2009 von *Nannochloropsis oculata* im FPA 2 und FPA 3

### 3.3.4. AP 3.4 Herstellung von *Monodus subterraneus*-Chargen

#### Wachstum von *Monodus subterraneus*

*Monodus subterraneus* wurde Ende Juli im Reaktor 1 im Modul 1 angeimpft. Nach einer kurzen Adaptionsphase (3 Tage, siehe Abbildung 18), in der sich die Kultur von den Bedingungen im Labor auf die des Freilands umstellen musste, zeigte sich ein lineares Wachstum im Bereich von 1 bis 4 gTS l<sup>-1</sup>. Es wurde bis zu einer maximalen Biomassekonzentration von 5,8 gTS l<sup>-1</sup> kultiviert. Kaliumnitrat diente dieser Kultur als Stickstoffquelle, da dies in den Laborversuchen zur höchsten Biomasseproduktivität führte.

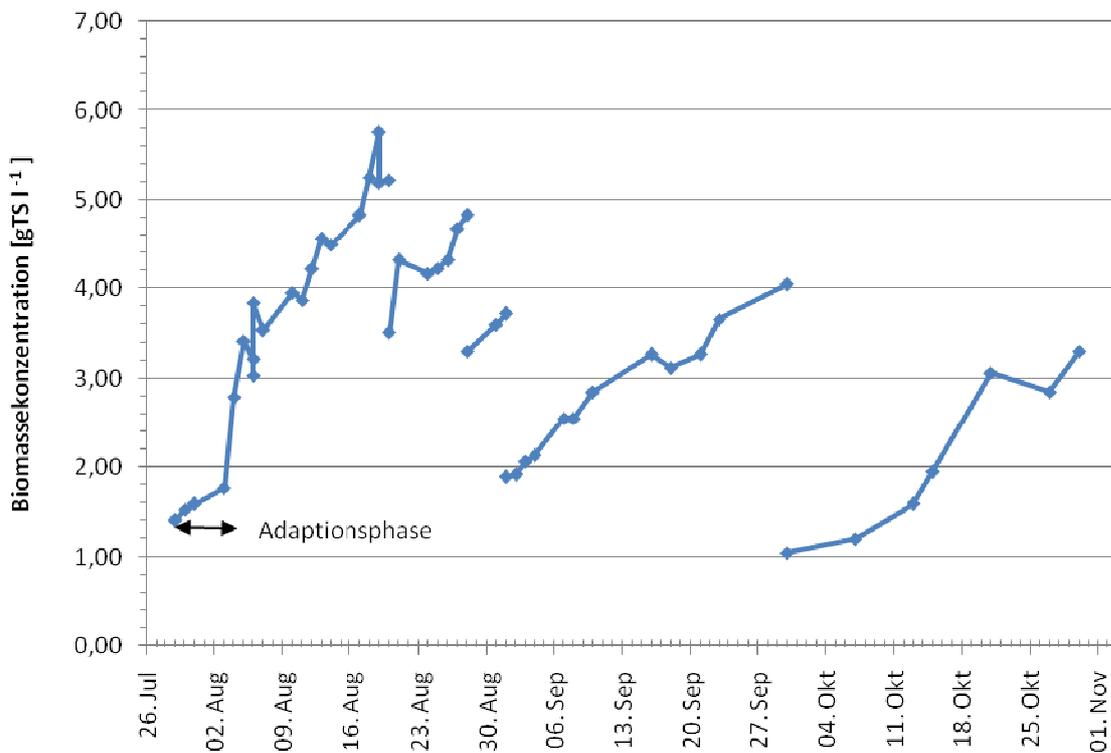
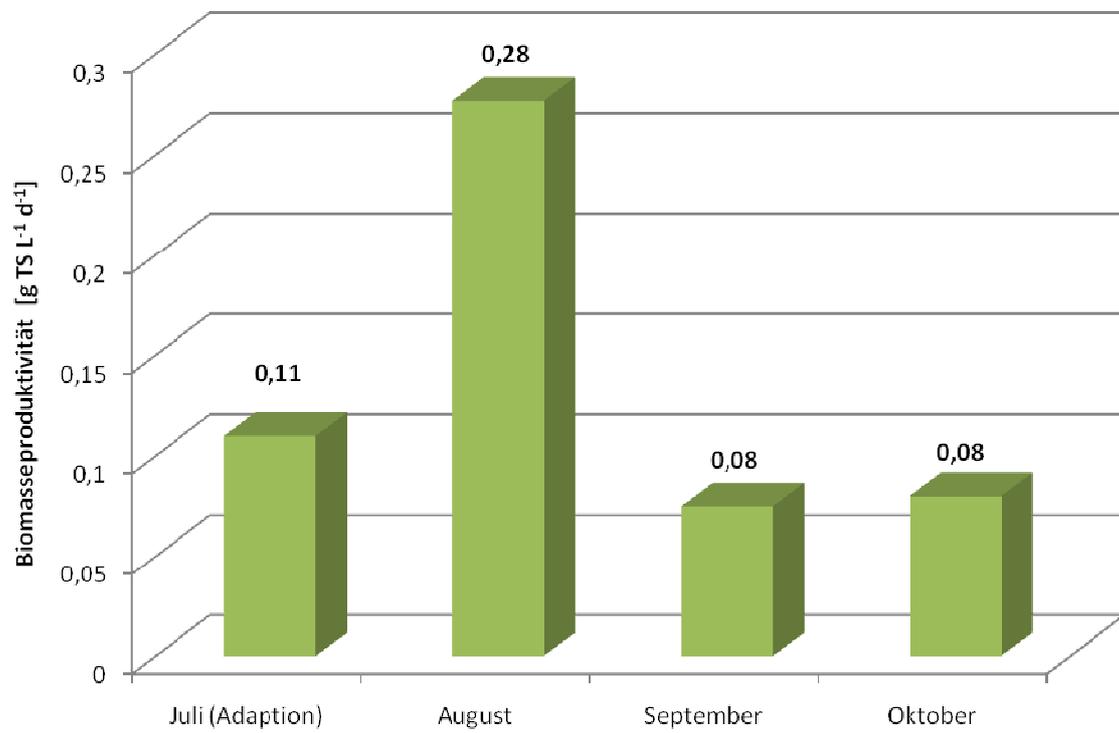


Abbildung 18: Wachstum von *Monodus subterraneus*

#### Biomasseproduktivität von *Monodus subterraneus*

Es wurde bei einer Biomassekonzentration von 2 bis 5 gTS l<sup>-1</sup> kultiviert, um die Lichtverfügbarkeit für die Zellen möglichst hoch zu halten. Dabei wurden durchschnittliche Biomasseproduktivitäten von 0,08 gTS l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> im September und Oktober bis 0,48 gTS l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Anfang August erreicht (siehe Abbildung 19). Die maximale Biomasseproduktivität bei einer Biomassekonzentration von 3,4 gTS l<sup>-1</sup> betrug 0,63 gTS l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Anfang August).



**Abbildung 19:** Durchschnittliche Biomasseproduktivität pro Monat von *Monodus subterraneus*

### 3.4. AP 4 Trocknung von Algenbiomasse von *Phaeodactylum tricornutum*

#### Ernte und Separation

Die Algenbiomasse wurde in den Monaten Oktober und November 2010 aus zwölf 180 Liter-FPA-Reaktoren mit einer Biomassekonzentration im Kulturmedium von ca. 0,4 bis 0,6 % geerntet (siehe Kapitel 3.3.2.3). Zusätzliche Algenbiomasse entstammte 30 Liter-FPA-Reaktoren (siehe Kapitel 3.3.2.3). Die Ernte der 30 Liter-FPA wurde bei ca. 1 % Zelldichte im Kulturmedium durchgeführt. Überdies hinaus entstammte ein geringer Anteil der insgesamt getrockneten Algenbiomasse (ca. 520 g Trockensubstanz) einer Ernte aus dem Jahre 2008. Da die Kulturbrühe im Freiland neben ca. 0,4 bis 0,5 % Biomasse von *Phaeodactylum tricornutum* auch das Prozesswasser, ein salzhaltiges Nährmedium, enthielt, war eine mehrfache Separation nötig, um die Biomasse von der Salzlast und restlichen Nährstoffen (Phosphat-Ionen und gelöster Harnstoff) zu trennen. Hierzu wurde ein halbkontinuierlich betriebener Tellerseparator der Firma Westfalia benutzt. Nach der erstmaligen Separation erfolgte ein weiterer Waschschrift. Anschließend wurde die gewaschene Algenbiomasse, deren Konsistenz als „dickflüssig“ (10–15 % Trockensubstanz) beschrieben werden kann, bei 4°C bis zur Trocknung für eine Zeitspanne von maximal 4 Tagen gelagert.

#### Trocknung

Eine Trocknung durch Lyophilisation (Sublimationstrocknung) der anfallenden Mengen feuchter Biomasse konnte aufgrund der geringen Kapazität der vorhandenen Labor-Gefriertrockner nicht durchgeführt werden. Deshalb wurde auf eine modifizierte Konvektionstrocknung, in einem batchweise betriebenen Labortrockner, zurückgegriffen (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Der Konvektionsbatchtrockner von schräg rechts vorne (linke Abb.) und des Beschickungsgestells mit ungefülltem, eingesetztem Sieb (rechte Abb.)

Das verfahrenstechnische Prinzip der Konvektionstrocknung wurde von der Abteilung Physikalische Prozesstechnik (PT) des Fraunhofer-Instituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB) dahingehend weiterentwickelt, dass als Trägergas überhitzter Wasserdampf unter Normaldruck in einem Kreislaufsystem zur Trocknung des Feuchtguts verwendet werden kann. Gegenüber der Trocknung mit Heißluft bietet der überhitzte Wasserdampf die folgenden Vorteile (IGB, 2011):

- bis zu 50 % geringerer Energiebedarf
- bis zu 90 % der benötigten Energie ist rückführbar
- geringerer Platzbedarf bei gleichem Durchsatz (kürzere Verweilzeiten, geringere Baugröße)
- Betrieb bei Normaldruck (offenes System, keine Absperrungen, Schleusen, Abdichtungen)
- geringere Investitionskosten
- Rezirkulation des überhitzten Dampfes (Kreislaufsystem)
- Verringerung von Oxidationsprozessen (geringerer Luftanteil im Trägergasgemisch)
- Produktsterilisation (Dampftemperatur  $>100\text{ °C}$ )
- geringere Feuer- und Explosionsgefahr (keine Staubentwicklung)
- Kondensat (demineralisiertes Wasser,  $95\text{ °C}$ ) kann für andere Prozessschritte genutzt werden.

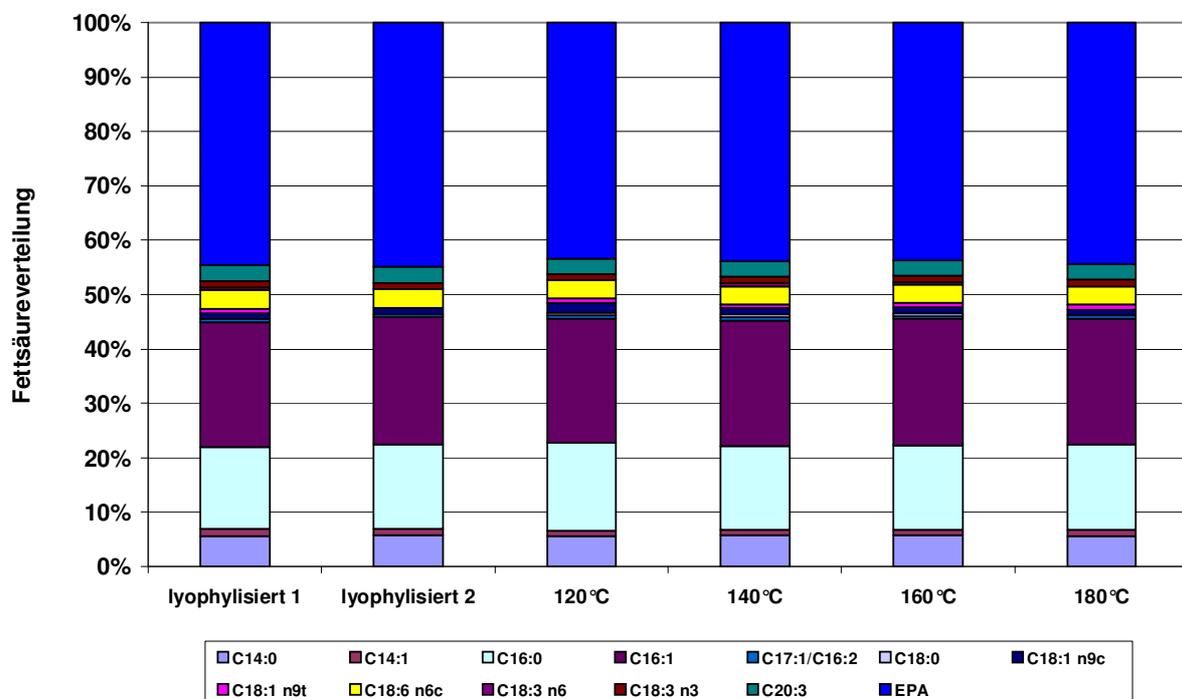
Die dickflüssige Algenbiomasse (10 - 15 % Trockensubstanz) wurde auf Trocknungssieben aus Edelstahl (siehe Abbildung 21 ) in Portionen je 800 ml aufgebracht. Die Maschenweite der Siebe betrug  $4\text{ }\mu\text{m}$ , was einen konvektiven Gasstrom des heißen Trägergases von unten durch die Biomasse hindurch gewährleisten sollte, bei gleichzeitigem Ausbleiben eines Hindurchsickerns der dickflüssigen Algenbiomasse durch das Sieb. Die Vorversuche wurden zuvor von einem Mitarbeiter des Fraunhofer IGB durchgeführt. Der Trocknungsvorgang dauerte ca. 2 h für 800 ml feuchte Biomasse bei einer Prozesstemperatur von  $160 - 170\text{ °C}$ . Diese lange Trocknungsdauer ist wahrscheinlich auf ein Zusetzen der Maschen mit trockener Algenbiomasse zurückzuführen. Eine Durchströmung der Biomasse mit überhitztem Wasserdampf war nach dem Zusetzen nicht mehr möglich. Ein Trocknungsvorgang lieferte ca. 100 g trockene Algenbiomasse. Es wurde eine Restfeuchte von durchschnittlich 2 - 5 % ermittelt. Um eine homogenere Erscheinungsform der getrockneten Algenbiomasse zu gewährleisten, wurden die aus den Sieben herausgelösten Bruchstücke durch ein Korngrößen-Klassifiziersieb mit einer Maschenweite von 2 mm mit einem Pistill von Hand vermahlen.



**Abbildung 21:** Probensiebe für den Batchtrockner zur Trocknung von feuchter Algenbiomasse (Restfeuchte ca. 80–90 %). Porenweite Innenseite:  $4\text{ }\mu\text{m}$ . Verstärkungsdrahtgeflecht auf Unterseite

### Auswirkung der Trocknung auf den EPA-Gehalt

Die Auswirkungen der Prozesstemperatur und der konvektiven Durchströmung mit überhitztem Dampf auf den Gehalt an EPA in der Biomasse war nicht bekannt. Um zu gewährleisten, dass die gewählte Trocknungsmethode eine Alternative gegenüber der Sublimationstrocknung darstellt, wurde ein Vergleichsexperiment durchgeführt. Dazu wurde jeweils eine Trocknung der feuchten Algenbiomasse (ca. 10–15 % TS) bei 120 °C, 140 °C, 160 °C und 180 °C bis zur Gewichtskonstanz durchgeführt (Zeitdauer von ca. 3 h bei 120 °C bis ca. 1,75 h bei 180 °C). Zum Vergleich wurden zwei Proben der gleichen Charge lyophilisiert und analysiert. Der Zellaufschluss bzw. die EPA-Extraktion und Umesterung der Triglyceride erfolgte nach der vom Fraunhofer IGB entwickelten Standardmethode (siehe Anhang 2). Die Analyse der Fettsäure-Spektren, die mit Hilfe der Gas-Chromatografie erstellt wurden, zeigte, dass der relative Gehalt an EPA bei allen Proben konstant blieb (siehe Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Einfluss verschiedener Prozesstemperaturen bei der semi-kontinuierlichen, konvektiven Trocknung mit überhitztem Dampf verglichen mit gefriergetrockneten Proben

Deutlich zu sehen ist die gleichbleibende prozentuale Verteilung der verschiedenen Fettsäuren. Die Analytik wurde vom IGVT durchgeführt.

### **Verschickung der getrockneten Proben an den Projektpartner KD-Pharma**

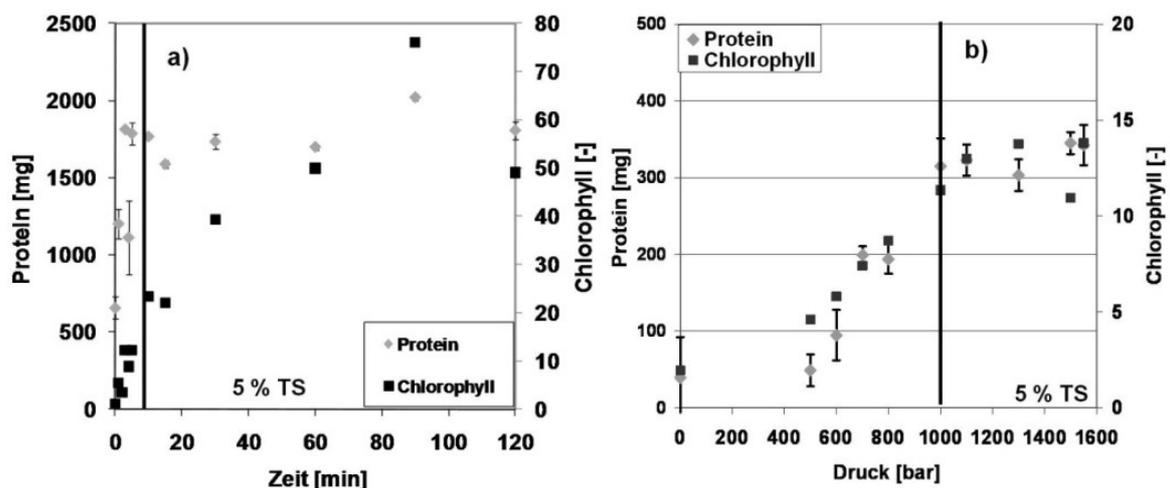
Die getrocknete und mechanisch homogenisierte Biomasse (Partikelgröße  $\leq 2$  mm) wurde bis zur Verschickung in luftdichten Weithalschraubgefäßen aufbewahrt. Zur Verschickung wurde die Biomasse in Kunststoffbeuteln eingeschweißt. Die erste Charge hatte ein Gesamtgewicht von 2900 g und wurde am 25.10.2010 verschickt. Die zweite Charge hatte ein Gesamtgewicht von 4015 g und wurde am 02.12.2010 verschickt. Eine Analytik des EPA-Gehalts der ersten Charge ergab einen durchschnittlichen Anteil von ca. 3,3 %, die der zweiten Charge. 3,9 % der Trockensubstanz.

### 3.5. AP 5 Entwicklung und Optimierung des Zellaufschlusses

#### Austestung verschiedener Zellaufschlussmethoden für einen produktschonenden Aufschluss von *Phaeodactylum tricornutum*

Zur Untersuchung des Zellaufschlussverhaltens wurde jeweils eine Suspension aus lyophilisierter Algenbiomasse und aqua dest. angesetzt. Der Zellaufschluss wurde jeweils durch die Bestimmung der Protein- und Chlorophyllkonzentration bestimmt. Beim Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle wurde eine DYNO-Mill der Fa. WAB verwendet. Der Zellaufschluss erfolgte bei RT batchweise in einem Glasgefäß (V=0,3 Liter) mit Glaskugeln (d= 0,25 - 0,5 mm) bei 2000 Upm und einer Rührscheibenumfangsgeschwindigkeit von 10 m/s. Der Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator erfolgte kontinuierlich einstufig in einem Gerät der Fa. APV.

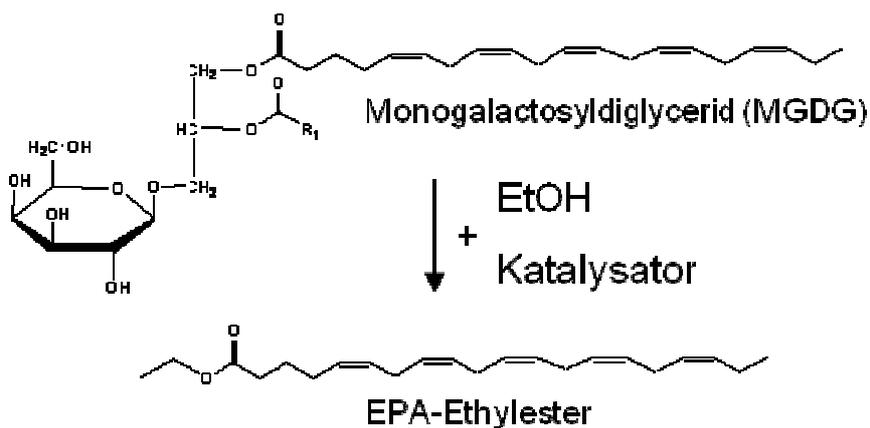
In Abbildung 23 sind die jeweiligen Protein- und Chlorophyllkonzentrationen im Überstand beim Zellaufschluss von *Phaeodactylum tricornutum* mittels Rührwerkskugelmühle und Hochdruckhomogenisator dargestellt. Nach ca. 15 min ist der Zellaufschluss mit Rührwerkskugelmühle, bei Messung der Proteinkonzentration im Überstand, abgeschlossen. Die Chlorophyllkonzentration zeigte dagegen erst nach 60 min keine Steigerung mehr. Da Chlorophyll ausschließlich in den Chloroplasten vorkommt, werden in der Rührwerkskugelmühle die Chloroplasten teilweise mit aufgeschlossen. Mittels Hochdruckhomogenisator ist ein Druck von ca. 1000 bar für den Zellaufschluss notwendig. Der gleiche Verlauf der Protein- und Chlorophyllkonzentration im Ansatz mit Hochdruckhomogenisator lässt sich darauf zurückführen, dass hierbei die Zellen, nicht wie mittels Rührwerkskugelmühle zermahlen werden, sondern lediglich zum Platzen gebracht werden.



**Abbildung 23:** Protein- und Chlorophyllkonzentration im Überstand einer 5%igen (w/w) Suspension von *Phaeodactylum tricornutum* a) in Abhängigkeit der Zeit mittels Rührwerkskugelmühle, b) in Abhängigkeit des Drucks mittels Hochdruckhomogenisator

### 3.6. AP 6 Entwicklung und Optimierung der Extraktion und Umesterung mit scCO<sub>2</sub>

Die Omega-3-Fettsäure EPA liegt in den Algenzellen in der Chloroplastenmembran vorwiegend als Monogalactosyldiglycerid (MGDG) vor (Abbildung 24) (Arao et al. 1987). Aus diesem Grund ist es notwendig, die Fettsäure aus den Zellen heraus zu extrahieren. Dies erfolgte mit einer Extraktion mit scCO<sub>2</sub>. Da die Fettsäure im Nahrungsergänzungsmittelbereich als EPA-Ethylester eingesetzt wird, ist es zusätzlich notwendig, mittels Umesterung die Fettsäure vom MGDG abzuspalten und mit Ethanol zu verestern. Durch die Ansäuerung von Ethanol mit Schwefelsäure ist es möglich, die Extraktion und Umesterung in einem Schritt zu realisieren. Im Anschluss an die Umesterung muss eine weitere Aufreinigung des Reaktionsgemisches erfolgen (siehe Abschnitt 3.6.2). Nach Abtrennung des Ethanols mittels Destillation erfolgt eine weitere scCO<sub>2</sub>-Extraktion (SFE). Hierbei werden polare Bestandteile sowie anfallende Salze von den Ethylestern abgetrennt.

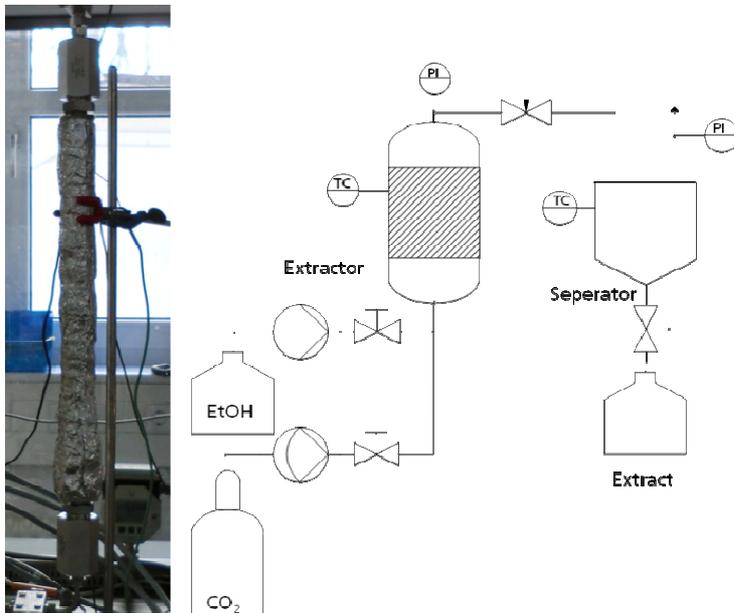


**Abbildung 24:** Umsetzung von Monogalactosyldiglycerid mit der Omega-3-Fettsäure EPA an Position 1 zu EPA-Ethylestern mit Ethanol

### 3.6.1. AP 6.1 Optimierung der Extraktion der Galactolipide im Festbett mittels $\text{scCO}_2$ und Ethanol als Modifier für *Phaeodactylum tricornutum*

#### Versuche des IGVT

In Vorversuchen (batch) wurde die reine Lösungsmittelextraktion mit Ethanol untersucht (Statusbericht 2009). Hierbei hat sich gezeigt, dass die Gesamtausbeute bei der Extraktion von feuchter Biomasse mit ca. 85 % wesentlich höher ist als die Ausbeute bei der Extraktion von trockener Biomasse mit ca. 45 %. Insgesamt ergab sich für die Extraktion ein Verbrauch an Ethanol von ca. 80 g/g Biomasse. Diese entspricht MGDG-Konzentrationen von ca. 0,4 – 1,5 g  $\text{l}^{-1}$ . Aufgrund des hohen Ethanolverbrauchs wurde versucht, mittels Extraktion mit  $\text{scCO}_2$  (mit und ohne Ethanol als Modifier) die Menge an Ethanol zu reduzieren.

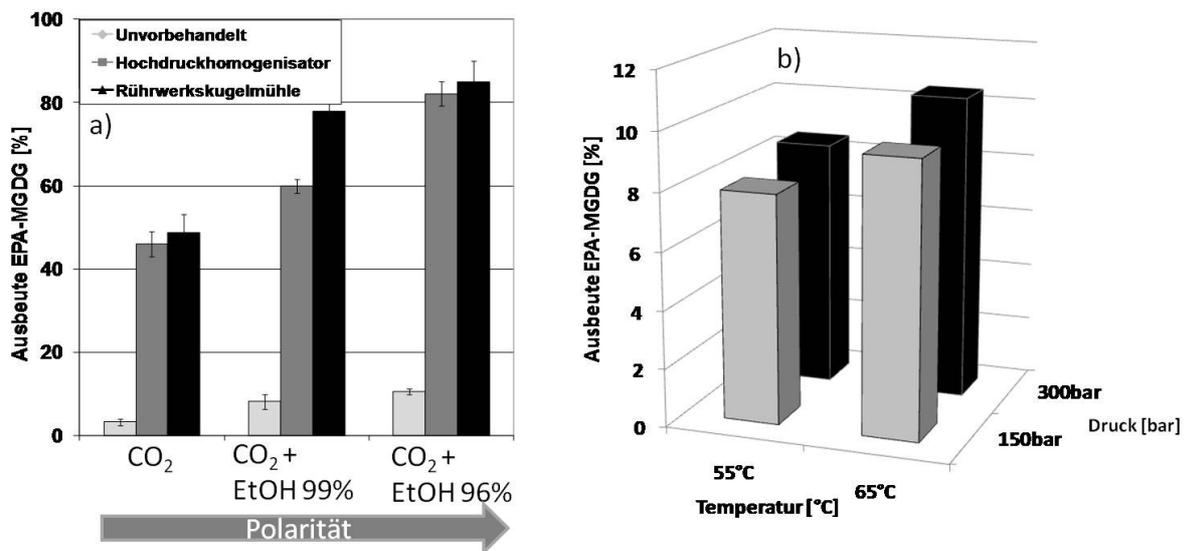


**Abbildung 25:** Anlagenfließbild der  $\text{scCO}_2$ -Anlage zur Untersuchung der MGDG-Extraktion und der Umesterung mittels Enzymfestbett (links) mit der verwendeten Extraktorsäule (rechts)

In Abbildung 25 ist das Anlagenfließbild zur Untersuchung der MGDG-Extraktion mit  $\text{scCO}_2$  und Ethanol dargestellt. Zur Extraktion der EPA-haltigen Galactolipide wurde aufgeschlossene und nichtaufgeschlossene, lyophilisierte Biomasse als Festbett gepackt und kontinuierlich mit  $1 \text{ kg CO}_2 \text{ h}^{-1}$  und  $3,5 \text{ ml EtOH min}^{-1}$  extrahiert. Im Anschluss wurde das  $\text{CO}_2$  im Separator entspannt und der Ethanolextrakt aufgefangen. Der Extrakt wurde mittels der Methode nach Lepage und Roy (1984) gaschromatographisch analysiert.

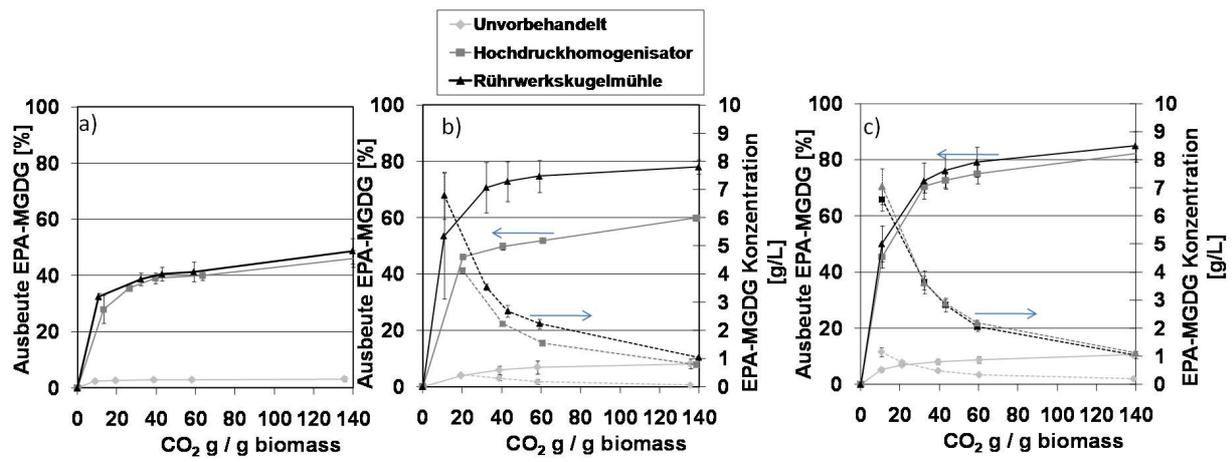
In Abbildung 26 ist ein Vergleich der EPA-Ausbeute als MGDG mit lyophilisierter Biomasse bei der Extraktion mit  $\text{scCO}_2$  in Abhängigkeit der Verwendung eines Modifiers (EtOH 99 %, EtOH 96 %) und des Zellaufschlusses ( $65 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $300 \text{ bar}$ ,  $1 \text{ kg h}^{-1} \text{ CO}_2$ ,  $3,5 \text{ ml min}^{-1} \text{ EtOH}$ ) sowie des Drucks und der Tempe-

ratur dargestellt. Die Ausbeute steigt mit steigender Polarität des Lösungsmittelgemisches  $\text{scCO}_2$  und EtOH sowie mit dem Zellaufschlussgrad. Somit zeigt die Extraktion von mit einer Rührwerkskugelmühle aufgeschlossener Biomasse mit 96%igem EtOH als Modifier die höchste Ausbeute von ca. 90 %. Druck und Temperatur zeigen bei der Extraktion von unbehandelten trockenen Zellen, mit einem Ausbeuteunterschied von ca. 3 %, nur einen geringen Einfluss. Der EPA-Anteil, bezogen auf das gesamte Fettsäurespektrum nach der Extraktion, liegt bei allen Untersuchungen im Mittel bei ca. 30-40 %.



**Abbildung 26:** Ausbeute an EPA-MGDG bei der Extraktion mit  $\text{scCO}_2$  von getrockneter *Phaeodactylum tricornutum* Biomasse. Untersucht wurde der Einfluss a) der EtOH Qualität (99 %, 96 %) als Modifier und des Zellaufschlusses (Hochdruckhomogenisator, Rührwerkskugelmühle) b) des Drucks und der Temperatur bei der Extraktion von unbehandelten Zellen mit 96%igem EtOH als Modifier

In Abbildung 27 ist der zeitliche Verlauf der Extraktion aus Abbildung 26 von aufgeschlossenen Zellen mit und ohne Modifier in Abhängigkeit der  $\text{CO}_2$ -Menge dargestellt. Unabhängig von den Einflussparametern ist ab einer Menge an  $\text{CO}_2$  von ca. 45 g/g Biomasse (ca. 7 g EtOH /g Biomasse) keine wesentliche Ausbeutesteigerung mehr möglich. Im Extraktionsverlauf ergeben sich MGDG-Konzentrationen im EtOH von ca. 2,5-7 g  $\text{l}^{-1}$ , welche für die anschließende Umesterung relevant sind.



**Abbildung 27:** Vergleich der Ausbeute und Konzentration an EPA-haltigem MGDG der Extraktion mit scCO<sub>2</sub> von trockener *Phaeodactylum tricornutum* Biomasse in Abhängigkeit der CO<sub>2</sub>-Menge. a) reines CO<sub>2</sub> b) scCO<sub>2</sub> mit EtOH 99 % c) scCO<sub>2</sub> mit EtOH 96 %

## Versuche von KD-Pharma

### Material und Ausrüstung

Die folgenden Materialproben wurden in den Versuchen verwendet:

- **A:** *Phaeodactylum tricornutum*, getrocknete Algenbiomasse (aus 2008 und 2010), EPA
- **B:** Mikroalgen-Lipidkonzentrat, AA/EPA
  - **B1:** feuchtes Konzentrat
  - **B2:** trockenes Konzentrat
- **C:** Triglycerid-Musteröl aus Mikroorganismen, EPA

Es wurden folgende Geräte und Anlagen im Labor und Technikum eingesetzt:

- SFE: KD-Pharma SFE Pilotanlage
- SFC: KD-Pharma SFC Pilotanlage
- GC:
  - Shimadzu GC 17A;  
M&N Permabond CW20M 30m x 0,25mm x 0,25µm (Ph.Eur.)
  - Shimadzu GC 2014  
Zebron ZB-1, 15m x 0,25mm x 0,25µm on GC 2014
- Erlenmeyerkolben 3 Liter und 5 Liter
- Dimrothkühler
- Zweihalsaufsatz
- Schliffadapter
- Heizrührer
- Rotationsverdampfer
- Vakuumpumpe

### Durchgeführte Versuche

Es wurde in der SFE-Pilotanlage eine direkte SFE ohne separate Umesterung der Galactolipide im Festbett mittels überkritischem CO<sub>2</sub> und Ethanol als Modifier für *Phaeodactylum tricornutum* durchgeführt. Hierzu wurde getrocknete, nicht aufgeschlossene Algenbiomasse ohne weitere Maßnahmen und im Massenverhältnis 1:1 mit Kieselgur vermengt und per SFE zuerst ohne, dann mit Ethanol als Modifier [0 bis 50 % (w/w)] extrahiert.

Es konnte kein Extrakt gewonnen werden. Der Inhalt der Extraktionskammer ohne Kieselgur verstopfte sich. Mit Kieselgur kann die Extraktion durchgeführt werden, wobei allerdings weder mit, noch ohne Modifier Extrakt anfällt.

Wie auch in Kapitel 3.6.1.1 beschrieben, ist nur eine geringe Ausbeute durch direkte SFE mit Biomasse ohne separate Umesterung möglich (siehe zur Extraktion von aufgeschlossener und nicht aufgeschlossener Phaeodactylum-Biomasse auch Abbildung 26).

### 3.6.2. AP 6.2 Optimierung des Enzymfestbettreaktors mit scCO<sub>2</sub> als Lösungsmittel in Abhängigkeit der EPA-Konzentration im scCO<sub>2</sub>-Extrakt aus AP6.1 (Prozessintegration)

#### Versuche des IGVT

In Vorversuchen (Schüttelkolben) hatte die Lipase aus *Mucor miehei* (immobilisiert auf Ionenaustauscherharz) im Vergleich zu anderen Lipasen die größten Ausbeuten an EPA-Ethylestern mit Algenextrakt gezeigt. Zusätzlich konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass für die enzymatische Umesterung ein Lösungsmittel wie Hexan bzw. scCO<sub>2</sub> als Hexan-Ersatz, notwendig ist. In reinem EtOH-Extrakt konnte kein Umesterungsoptimum festgestellt werden (Statusbericht 2009).

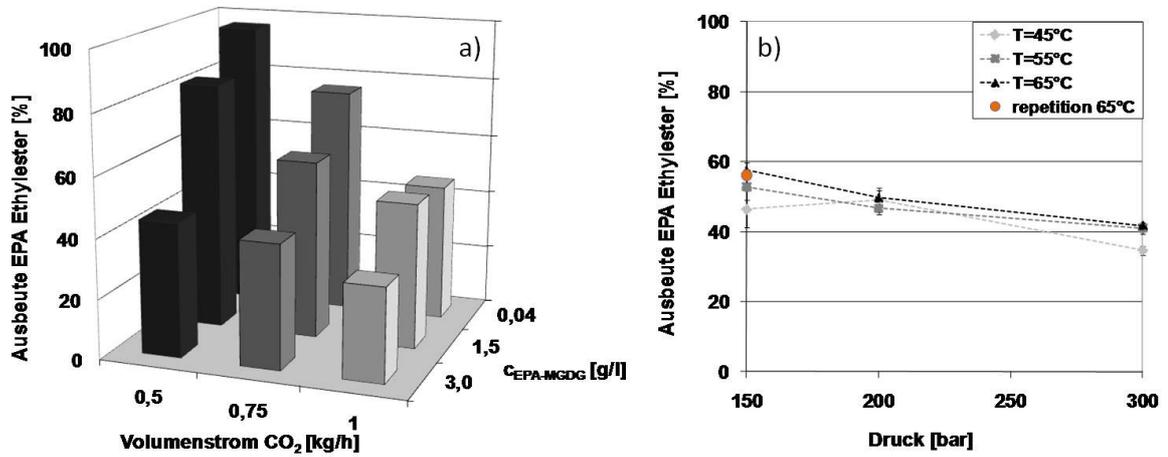
Zur Untersuchung der Umesterung in scCO<sub>2</sub> wurde EtOH-Extrakt (siehe Ethanolextraktion Kapitel 3.5) mit bekannter MGDG-Konzentration hergestellt. Die Umesterung erfolgte in einem Enzymfestbett (analog des Versuchsaufbaus der MGDG-Extraktion (siehe Abbildung 25) mit immobilisierter Lipase aus *Mucor miehei* mit einem definierten kontinuierlichen CO<sub>2</sub>-Volumenstrom (Knez, 2009). Entsprechend eines Massenanteils von ca. 15 % wurde dem CO<sub>2</sub>-Strom kontinuierlich das Ethanolextrakt mit definierten MGDG-Konzentrationen zudosiert. Im Anschluss wurde das CO<sub>2</sub> entspannt, der Ethanol-extrakt aufgefangen und dieser gaschromatographisch analysiert.

Zur Prozessintegration wurde bei definierten Bedingungen ein Festbett gepackt, welche aus einem Anteil an Biomasse (CO<sub>2</sub>-Eingang) und einem Anteil an Enzym (CO<sub>2</sub>-Ausgang) bestand. Das Verhältnis aus Biomasse zu Enzym betrug ca. 0,4 g Biomasse pro g Enzym.

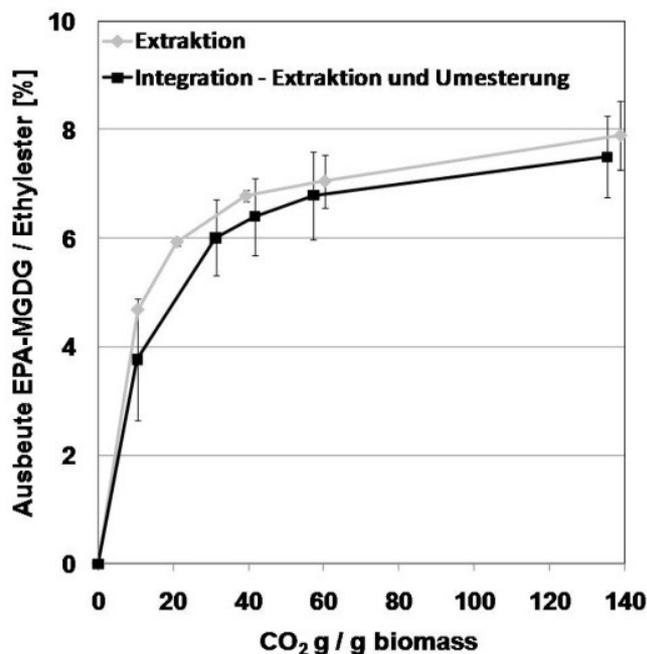
In Abbildung 28 ist die kontinuierliche Umesterung in scCO<sub>2</sub> mittels Enzymfestbett in Abhängigkeit des scCO<sub>2</sub>-Volumenstroms und der EPA-MGDG-Konzentration (0,04-3,0 g l<sup>-1</sup>) bei 150 bar und 45 °C dargestellt. Die Ausbeute fällt mit steigender Konzentration sowie mit steigendem Volumenstrom. Bei einer EPA-MGDG-Konzentration von 0,04 g l<sup>-1</sup> und einem Volumenstrom von 0,5 kg CO<sub>2</sub>h<sup>-1</sup> wird eine Ausbeute von ca. 90 % erreicht, wohingegen bei 1 kg CO<sub>2</sub>h<sup>-1</sup> (Volumenstrom bei untersuchter Extraktion mit MGDG-Konzentrationen von 2,5-7 g l<sup>-1</sup>; Kapitel 3.5.1) maximale Ausbeuten von 45 % erreichbar sind. Der Einfluss der Temperatur und des Drucks (MGDG-Konzentration 0,4 g l<sup>-1</sup> mit 1 kg h<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>) sind mit Ausbeuteunterschieden von ca. 10 % vernachlässigbar. Zukünftig ist es notwendig, die Enzymmenge in Abhängigkeit der Extraktionsbedingungen (MGDG-Konzentration, CO<sub>2</sub>-Volumenstrom) anzupassen.

Extraktion und Umesterung wurden bisher ausführlich bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen untersucht. Jedoch hat sich gezeigt, dass sowohl Druck wie auch Temperatur auf die Ausbeute in beiden Aufarbeitungsschritten nur einen geringen Einfluss haben. Somit ist zukünftig eine Integration beider Schritte bei gleichen Bedingungen möglich. In Abbildung 29 ist die Integration der Extraktion und Umesterung in scCO<sub>2</sub> mit 96%igem EtOH mit unbehandelter Biomasse dargestellt. Hierbei erfolgte die direkte Umesterung mittels Enzymfestbett im Anschluss an die Extraktion mit nur einem CO<sub>2</sub>-Volumenstrom. In Abhängigkeit der Enzymmenge ist eine Integration möglich. Der Ausbeuteverlauf der reinen Extraktion deckt sich im Wesentlichen mit dem Ausbeuteverlauf der Integration. Diese

muss zukünftig auf die Extraktion von aufgeschlossenen Zellen für höhere MGDG-Konzentrationen im Extrakt übertragen werden.



**Abbildung 28:** EPA-Ethylesterausbeute nach Umesterung in einem Enzym-Festbettreaktor mit Ethanolextrakt (96%igem EtOH) in scCO<sub>2</sub> in Abhängigkeit a) des Volumenstroms von scCO<sub>2</sub> mit 15 % (w/w) Ethanolextrakt, sowie der EPA-MGDG-Konzentration. b) Untersuchung des Einflusses von Druck und Temperatur bei 1 kg h<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> Volumenstrom und 0,4 g l<sup>-1</sup> EPA-MGDG-Konzentration im EtOH-Extrakt



**Abbildung 29:** EPA-Ethylesterausbeute durch Integration von Extraktion und enzymatischer Umesterung in scCO<sub>2</sub> von unbehandelter Biomasse und den Betriebsparametern 0,5 kg h<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>, 150 bar, 65 °C, in Abhängigkeit von der CO<sub>2</sub> Menge

### 3.6.3. AP 6.3 Direkte Umesterung und Extraktion der Galactolipide zu EPA-Ethylestern mit Säure und Ethanol

Da wie unter Punkte 3.6.1 beschrieben, eine Extraktion der Galactolipide im Festbett mittels überkritischem CO<sub>2</sub> und Ethanol als Modifier für unbehandelte, nicht aufgeschlossene Biomasse von *Phaeodactylum tricornutum* nicht möglich war, wurden Versuche zur Umesterung der Galactolipide zu EPA-Ethylestern durchgeführt.

#### **Gewinnung hochgereinigter $\omega$ 3-Konzentrate unter Verwendung von überkritischem CO<sub>2</sub>**

Da die direkte Extraktion der Galactolipide mittels Ethanol aus feuchter Biomasse (siehe 3.6.1.1) im Technikumsmaßstab nicht umsetzbar war und getrocknete Phaeodactylum-Biomasse erst im Herbst 2010 zur Verfügung stand (siehe 3.4), wurde als Alternative unter anderem ein EPA-haltiges Öl aus Mikroorganismen verwendet. Somit kamen in den durchgeführten Versuchen zur Gewinnung hochgereinigter  $\omega$ 3-Konzentrate unter Verwendung von überkritischem CO<sub>2</sub> sowohl feuchte als auch getrocknete, nicht aufgeschlossene Phaeodactylum-Biomasse aus 2008 sowie aus 2010, feuchte und trockene Mikroalgen-Lipidkonzentrate und ein Triglycerid-Musteröl aus Mikroorganismen als Ausgangsmaterialien zum Einsatz.

#### Material und Ausrüstung

Die folgenden Materialproben wurden in den Versuchen verwendet:

- **A:** *Phaeodactylum tricornutum*, getrocknete Algenbiomasse (aus 2008 und 2010), EPA
- **B:** Mikroalgen-Lipidkonzentrat, AA/EPA
  - **B1:** feuchtes Konzentrat
  - **B2:** trockenes Konzentrat
- **C:** Triglycerid-Musteröl aus Mikroorganismen, EPA

Es wurden folgende Geräte und Anlagen im Labor und Technikum eingesetzt:

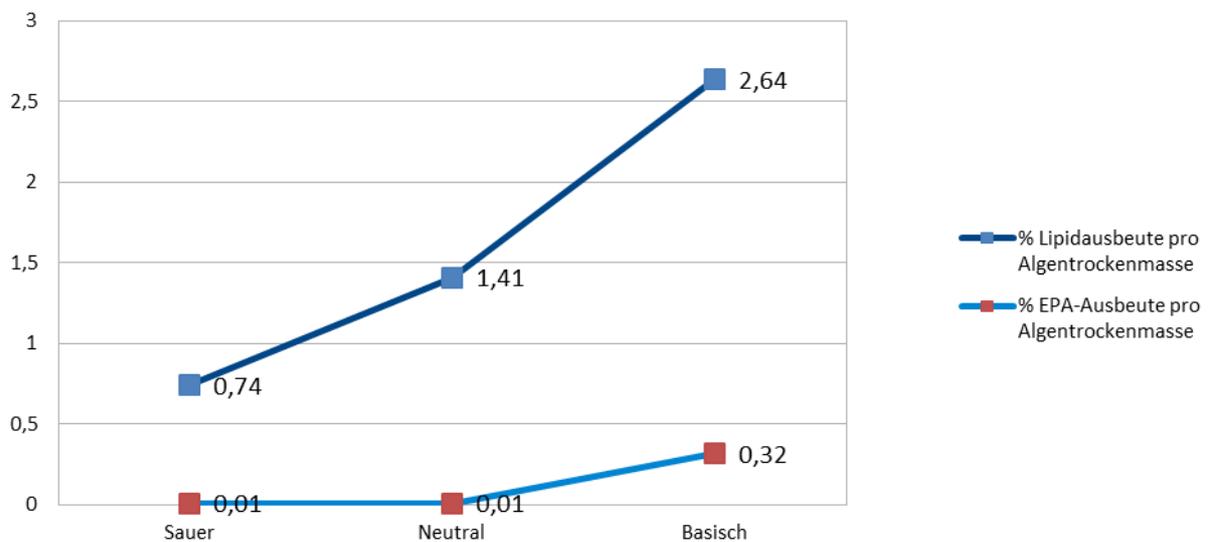
- SFE: KD-Pharma SFE Pilotanlage
- SFC: KD-Pharma SFC Pilotanlage
- GC:
  - Shimadzu GC 17A;  
M&N Permabond CW20M 30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m (Ph.Eur.)
  - Shimadzu GC 2014  
Zebron ZB-1, 15m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m on GC 2014
- Erlenmeyerkolben 3 Liter und 5 Liter
- Dimrothkühler
- Zweihalsaufsatz
- Schliffadapter
- Heizrührer
- Rotationsverdampfer
- Vakuumpumpe

## Durchgeführte Versuche

### **Probe A: Vorversuche**

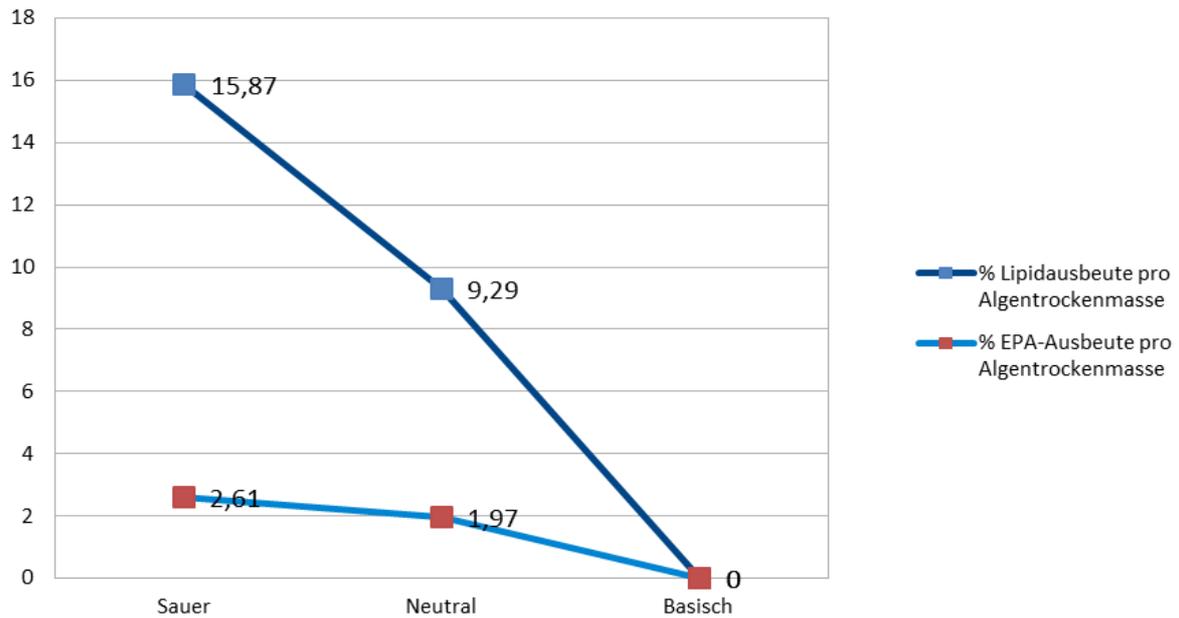
Da die enthaltenen Fettsäuren nicht in der benötigten Form als Ethylester (EE) oder freie Fettsäuren (FFA) vorliegen, waren einige Vorversuche zur Umesterung der Galaktolipide erforderlich. Diese Vorversuche wurden mit *Phaeodactylum*-Biomasse „Ernte 2008“ durchgeführt.

Eine erste Reihe zur Gewinnung von FFA wurde in Wasser durchgeführt (siehe Abbildung 30):



**Abbildung 30:** Erste Messreihe zur Gewinnung von FFA; Durchführung in Wasser (Probe A-Vorversuch)

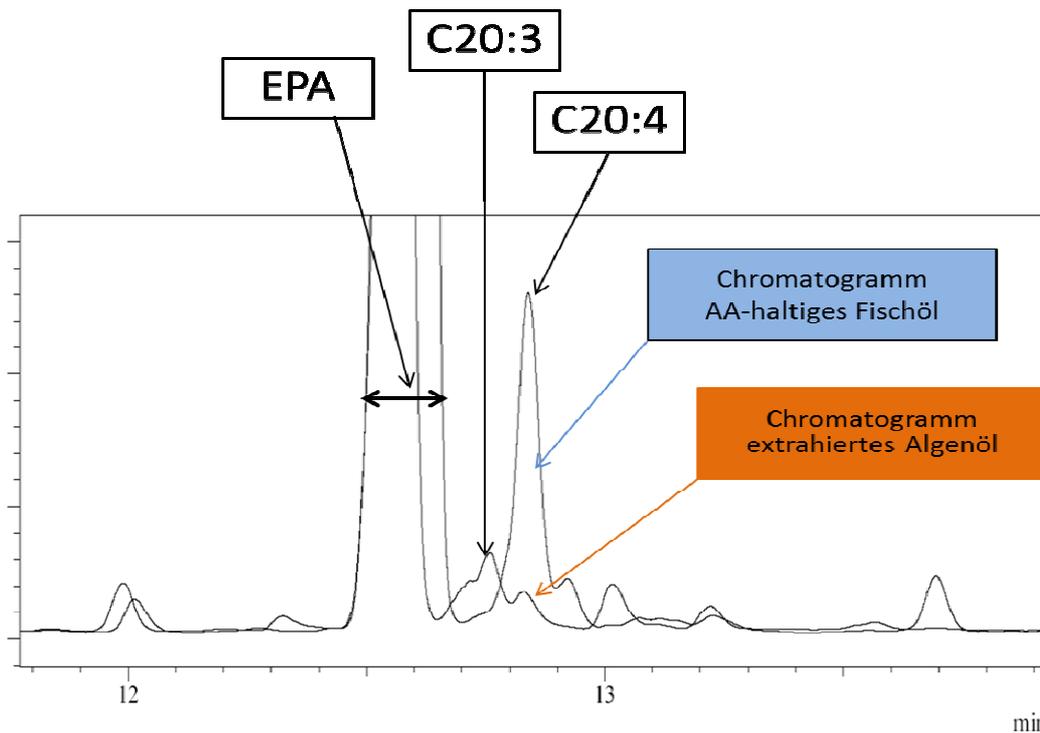
Da die Ausbeuten hinter den Erwartungen zurückblieben, wurde eine zweite Messreihe in Ethanol durchgeführt, bei der sich ein umgekehrter Einfluss des pH-Wertes auf die Ausbeute feststellen ließ (siehe Abbildung 31)



**Abbildung 31:** Zweite Messreihe zur Gewinnung von FFA; Durchführung in Ethanol (Probe A-Vorversuch)

Die sauren Ansätze in Ethanol wurden nach Neutralisation im Vakuum eingedampft und in einem Mischungsverhältnis von 1:1 (w/w) mit Bleicherde oder sehr feinkörnigem Kieselgur per SFE extrahiert. Das extrahierte Öl ist im Gegensatz zu allen Extraktionen mit Hexan, Isooctan und Ethanol frei von grünen und schwarzen Verunreinigungen.

Da die laut Literaturangaben enthaltene C20:3 Fettsäure (Di-Homo-Gamma-Linolensäure) auf der zunächst verwendeten GC-Säule nach Ph.Eur. mit der C20:4 Fettsäure (Arachidonsäure=AA) koeeluiert, wurde eine Vergleichsmessung auf einer anderen Säule (Zebron ZB-1) durchgeführt.



**Abbildung 32:** Vergleich der Fettsäuren (unbekannte Fettsäure aus Probe A - Vorversuch zu C20:4 aus Fischöl)

Wie dem Chromatogramm (Abbildung 32) zu entnehmen ist, zeigt der Vergleich mit einem typischen AA-haltiges Fischöl, dass die gefundene Fettsäure mit der C20:4 nicht identisch ist

**Probe A: Technikumsversuche – Gewinnung der Ethylester aus nicht aufgeschlossener, getrockneter Phaeodactylum-Biomasse**

Folgenden Mengen an Biomasse wurden eingesetzt (siehe Tabelle 2):

**Tabelle 2:** Eingesetzte Algenbiomasse (Probe A – Technikumsversuch)

Ansatz	Ernte Oktober 2010	Ernte November 2010
1	800g	---
2	813g	---
3	672g	134g
4	---	814g

Entsprechend der vorangegangenen Versuche wurde die Biomasse in angesäuertem Ethanol umgeestert. Aufgrund der Begrenzungen durch die vorhandene Ausrüstung wurde die Umesterung in mehreren Teilen durchgeführt (Tabelle 3):

**Tabelle 3:** Ausgeführte Umesterungen unterteilt in verschiedene Ansätze (Probe A - Technikumsversuch)

<b>Ansatz</b>	<b>Getrocknete Biomasse</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96 % tech.</b>	<b>EtOH trocken, tech.</b>	<b>Getrocknetes Extrakt</b>
1	800,0 g	111,6 g	2000 ml	87,8 g
2	812,9 g	250,0 g	2000 ml	389,1 g
3	805,7 g	250,0 g	2000 ml	440,9 g
4	814,3 g	250,0 g	2000 ml	404,2 g
Σ	3232,9 g	861,6 g	8000 ml	1322,0 g

Jeder Ansatz wird gerührt und 2 Stunden unter Rückfluss gekocht. Anschließend wird mit gesättigter wässriger NaOH-Lösung neutralisiert und bei 70 °C/50 mbar eingedampft. Die Neutralisation hat zur Vermeidung der Bildung von FFA möglichst wasserarm zu erfolgen. Da die Neutralisation in Abwesenheit von Wasser aber nicht durchführbar ist, wird gesättigte wässrige NaOH-Lösung verwendet.

Die Ausbeute in diesem Schritt beträgt 40,9 % bezogen auf die Einwaage an getrockneter Biomasse. Wird Ansatz Nr.1 nicht in die Berechnung einbezogen, wird eine Ausbeute von 50,7 % erreicht. Die Mengen an Extrakt scheinen zunächst unrealistisch hoch. Ursächlich hierfür ist die Tatsache, dass der Rückstand Natriumsulfat aus der Neutralisation, sowie andere Salze und Ethanol-lösliche Bestandteile der Biomasse enthält. Diese werden in der SFE zuverlässig entfernt.

Der getrocknete Rückstand wird im Massenverhältnis 1:1 mit Kieselgur vermengt und in der SFE bei 100 bis 300 bar extrahiert. Es wird, bezogen auf die eingesetzte Trockenmasse, bei einer Ausbeute von 14,8 % ein klares, orangefarbenes Öl extrahiert. Dieses wurde mittels SFC aufgetrennt (siehe Kapitel 3.7).

## **Probe B: Versuche mit einem EPA/AA-haltigen Lipidkonzentrat aus Mikroalgen**

Aufgrund der geringen Menge an Probe B1 und B2 konnten nur Versuche im Labormaßstab durchgeführt werden.

### **Probe B1: Versuch zur Umesterung – Feuchtes Lipidkonzentrat**

Saure Umesterung:

Das feuchte Lipidkonzentrat wurde bei 70°C und 50 mbar im Rotationsverdampfer getrocknet. Dann wurde, wie oben beschrieben, eine saure Umesterung durchgeführt. Nach der Neutralisation mit gesättigter wässriger NaOH-Lösung und Trocknung wird der Rückstand 1:1 mit Kieselgur vermengt und in der SFE bei 180 bar extrahiert. Es wird ein klares orangenes Öl bei einer Ausbeute von 66,6 % bezogen auf das getrocknete und 46,0 % bezogen auf das feuchte Konzentrat erhalten.

Alkalische Umesterung:

Das feuchte Konzentrat wird im Massenverhältnis 1:2 mit wässriger 1N KOH-Lösung zu 500 ml aufgefüllt und 3 h unter Rückfluss gekocht. Anschließend wurde mit 2 x 250 ml Hexan extrahiert, um die FFA zu erhalten. Die Ausbeute lag bei 11 % bezogen auf die Einwaage an feuchtem Lipidkonzentrat.

Die saure Umesterung zeigte erneut die höchsten Ausbeuten.

### **Probe B2: Versuche zur Umesterung – Trockenes Lipidkonzentrat**

Die gesamte Probe wurde in EtOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> umgeestert, neutralisiert, getrocknet und mittels SFE extrahiert, um eine zur Trennung ausreichende Menge an klarem Ethylester-Gemisch zu gewinnen (zur weiteren Aufreinigung siehe 3.7).

### Probe C: Triglycerid-Musteröl aus Mikroorganismen

Bei diesem Öl sind keine Vorversuche erforderlich, da die Umesterung von Triglyceriden eine Standardprozedur der KD-Pharma darstellt.

Verarbeitungsschritte:

Das Öl wird entsprechend vorgegebener Standardarbeitsanweisung (KD-SOP-34-001) mit Natriumethylat und Ethanol umgeestert. Das gewonnene Ethylestergemisch wird mit Aktivkohle behandelt, um unerwünschte Begleitstoffe zu entfernen, die die nachfolgende Trennung beeinflussen könnten. Standardmäßig geschieht dies per SFE. Aufgrund der geringen Ölmenge war dies in diesem Falle aber nicht möglich.

Ausbeuteberechnung für die Aufreinigung des Triglycerid-Musteröls:

**Tabelle 4:** EPA-Ausbeuteberechnung für Probe C

	Roh-material	Um-esterung	Aktivkohle-behandlung	SFE		SFC	
Masse	25,0 kg	25,0 kg	22,6 kg	5,1 kg (A)	5,5 kg (B)	3,6 kg	1,6 kg
EPA %	60,0	60,0	60,0	>50	>80	80-90	>90
Abfall/ Verluste	n.a.	n.a.	2,4 kg	12,0 kg		5,4 kg	
EPA Ausbeute zum vorigen Schritt	n.a.	n.a.	90,4 %	51,6 %		61,7 %	
				19,2 %	32,4 %	41,1 %	20,6 %
EPA Ausbeute absolut	n.a.	n.a.	90,4 %	46,6 %		28,8 %	
				17,3 %	29,3 %	19,2 %	9,6 %

Mit dieser Methode wurde eine Ausbeute von 28,8 % erreicht. Erfahrungsgemäß werden sich im Produktionsmaßstab die Verluste halbieren.

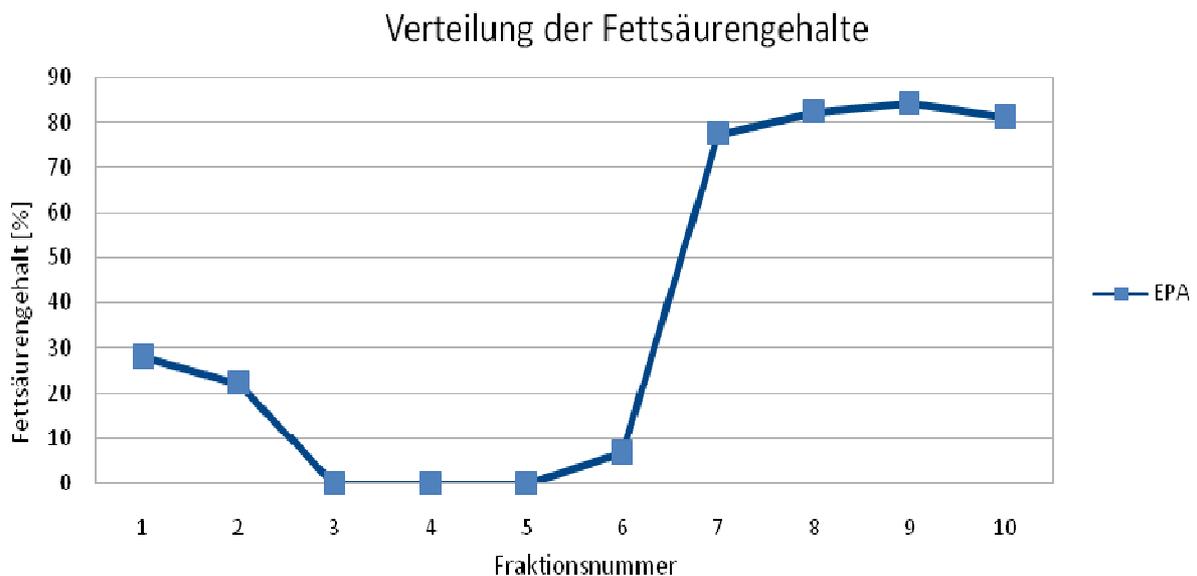
### 3.7. AP 7 Entwicklung und Optimierung der Aufreinigung mit scCO<sub>2</sub>

Nach AP 3.6.3 liegt ein Fettsäure-Ethylester-Gemisch vor. Die enthaltenden Fettsäure-Ethylester besitzen unterschiedliche Wirkungsweisen auf den menschlichen Organismus. Um einen gezielten und definierten Einsatz des EPA zu ermöglichen, ist es notwendig dieses in möglichst reiner Form zu erhalten. Die Auftrennung mittels SFC (Supercritical Fluid Chromatographie) wird hierbei eingesetzt.

#### Auftrennung der Fettsäure-Ethylester mittels SFC

##### Probe A: *Phaeodactylum tricornutum*, getrocknete Algenbiomasse

Das erhaltene Ethylester-Gemisch wird in der SFC-Anlage getrennt. Dabei ergibt sich folgende Trennung (siehe Abbildungen 33 und 34):



**Abbildung 33:** Verteilung der Fettsäuregehalte in Prozent

Anhand dieser Daten lässt sich auf eine im Produktionsmaßstab erreichbare Konzentration von >90 % EPA schließen. Als Nebenkompente tritt hier hauptsächlich die C20:3 Fettsäure mit bis zu 5 % auf.

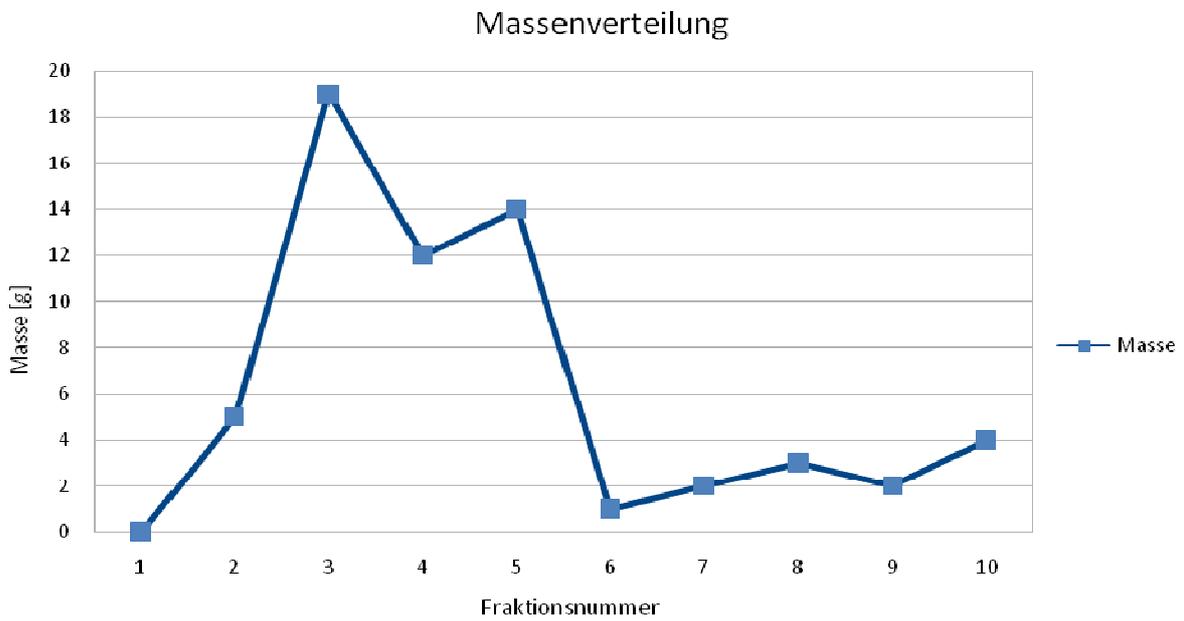


Abbildung 34: Verteilung der Fettsäuregehalte in Masseangaben [g]

### Probe B2: Trockenes Lipidkonzentrat: Versuche zur Aufreinigung

Die Fettsäuregehalte der Fraktionen ergaben sich wie folgt (siehe Abbildung 35):

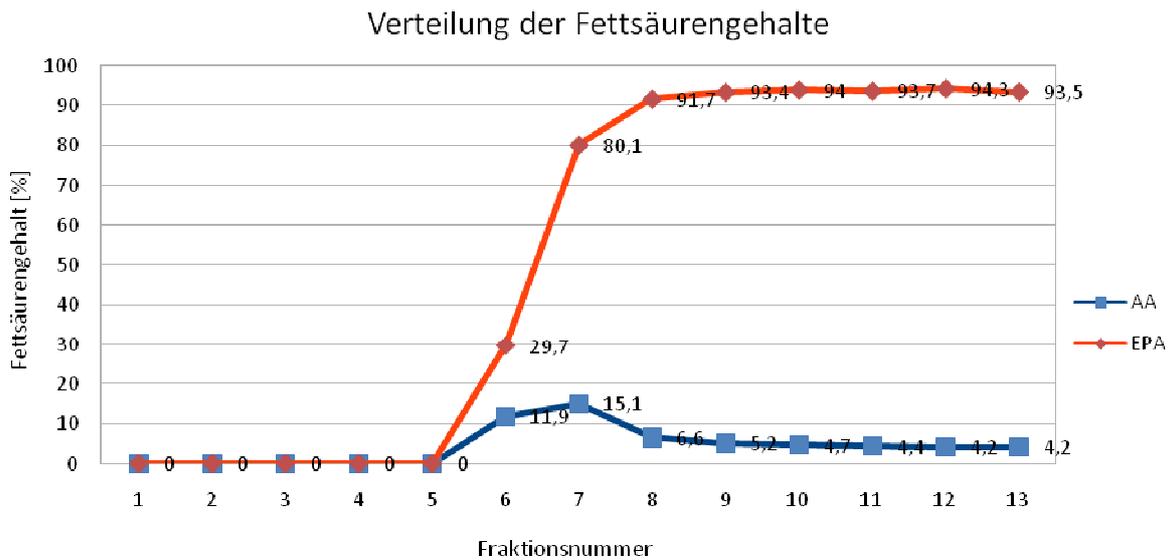
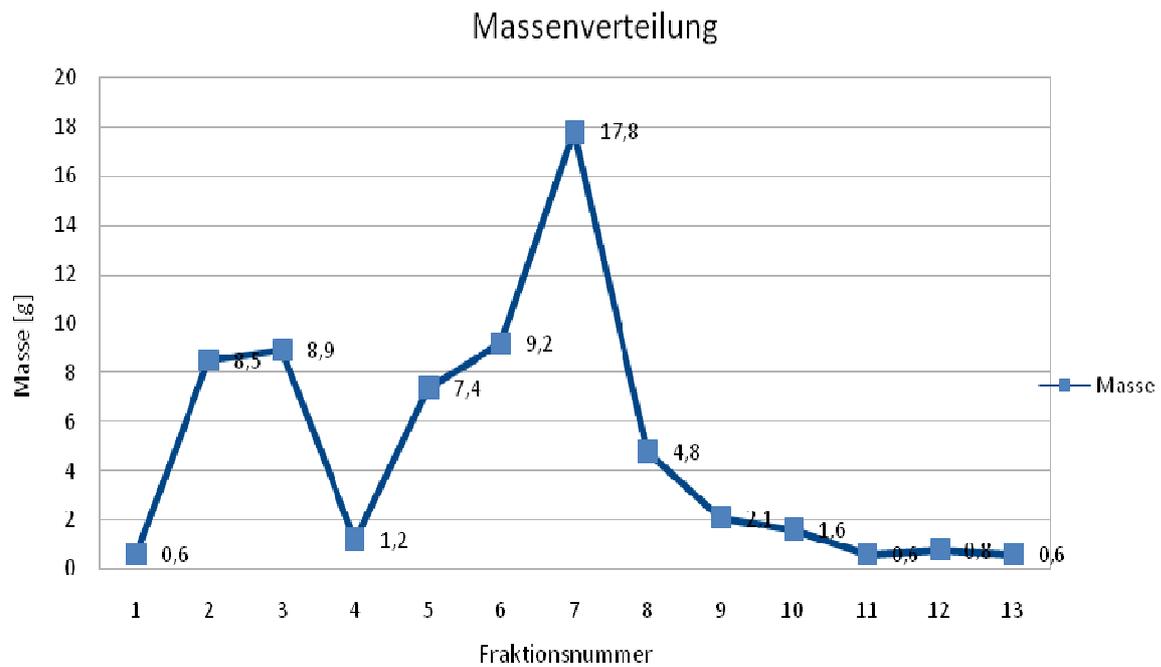


Abbildung 35: Verteilung der Fettsäuregehalte in Prozent (Probe B2)

Die Gesamtmasse der Fraktionen beträgt 64,1 g. Durch Mischen der Fraktionen 9 bis 13 wird ein Öl mit 93 % EPA und 5 % AA bei einer Ausbeute von 8,9 %, bezogen auf das extrahierte Ethylestergemisch, erhalten (siehe Abbildung 36).



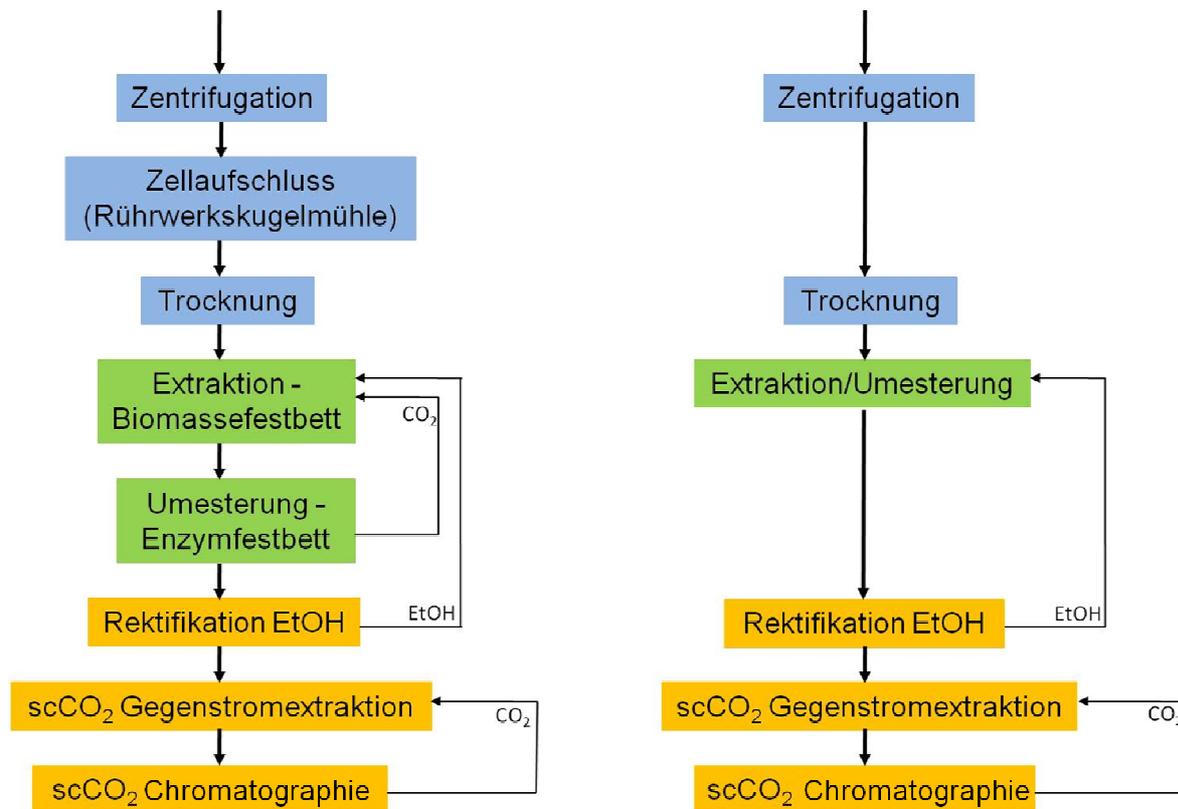
**Abbildung 36:** Massenverteilung der Fettsäuren in Gramm (Probe B2)

### **3.8. AP 8 Bilanzierung des gesamten Aufarbeitungsprozess**

Insgesamt wurde in dem Projekt der gesamte Prozess von der Kultivierung bis zum EPA-Ethylester betrachtet. Da die Aufarbeitung den kritischeren Teil des Projekts darstellte, wurde um diese zu optimieren, lediglich die Bilanz der Aufarbeitungsverfahren (enzymatisch und sauer) untersucht. Insgesamt hat sich gezeigt, dass sowohl der Aufarbeitungsprozess mittels  $\text{scCO}_2$ -Extraktion und enzymatischer Umesterung eine Ausbeute von ca. 70 % aufweist, wie auch der Aufarbeitungsprozess mittels saurer Umesterung eine Ausbeute von ca. 94 % aufweist. Aus diesem Grund erfolgte die Bilanzierung beider Prozesse, um einen Vergleich der beiden Prozesse zu ermöglichen.

Die Bilanzierung wurde mit der Software Sabento Version 1.2.0.371 durchgeführt. Hierzu erfolgte die zusätzliche Programmierung eines Moduls der  $\text{scCO}_2$ -Festbettextraktion-/Umesterung, der Rektifikation, der  $\text{scCO}_2$ -Gegenstromextraktion, der  $\text{scCO}_2$ -Chromatographie sowie eines Moduls zur Extraktion im Rührkessel durch das IFU Hamburg.

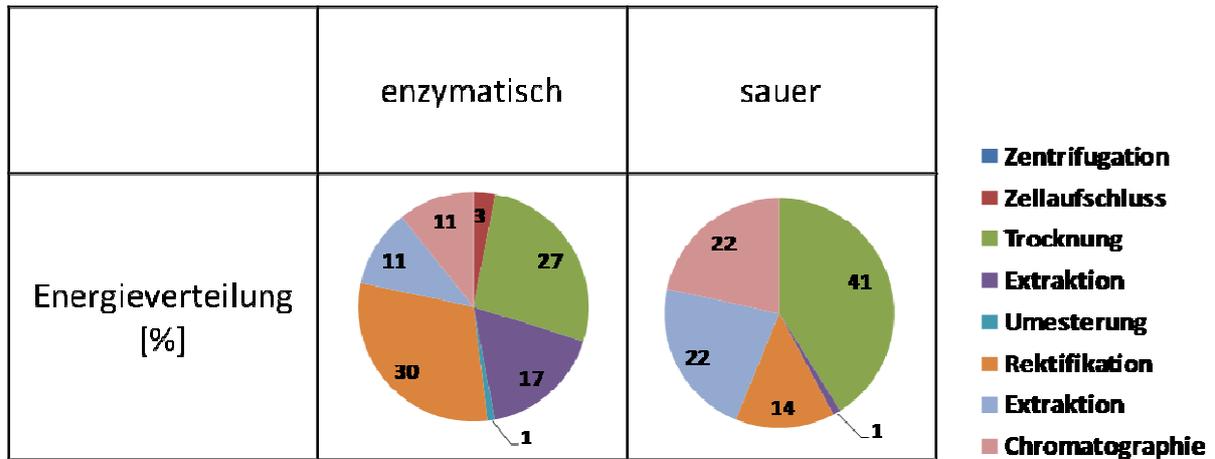
In Abbildung 37 ist ein Verlaufsdiagramm der beiden Aufarbeitungsprozesse dargestellt. Insgesamt ist der Verlauf beider Prozesse relativ ähnlich. Beim enzymatischen Prozess ist lediglich ein zusätzlicher Zellaufschluss notwendig. Zusätzlich wird die Extraktion der MGDGs und die Umesterung zu EPA-Ethylestern nicht in einem Schritt, wie bei der sauren Umesterung durchgeführt, sondern in zwei Einzelschritten betrachtet. Diese sind jedoch über die Nutzung eines  $\text{scCO}_2$ - sowie Ethanolvolumenstroms integriert.



**Abbildung 37:** Verlaufsdiagramm der Aufarbeitungsprozesse bei der enzymatischen (links) und sauren (rechts) Gewinnung von EPA-Ethylestern

In Abbildung 38 ist die relative Verteilung der notwendigen Energieströme (Summe aus thermisch und elektrisch) der beiden Prozesse in Abhängigkeit der einzelnen Verfahrensschritte dargestellt. Beim sauren Prozess nimmt die Trocknung mit ca. 41 % den größten energetischen Anteil ein. Wohingegen beim enzymatischen Prozess die Rektifikation mit ca. 30 % und die Trocknung mit ca. 27 % den größten energetischen Anteil besitzen. Insgesamt beträgt die notwendige Energie des sauren Prozesses nur ca. 65 % des enzymatischen Prozesses. Der Energieindex des enzymatischen Prozesses liegt bei 2605 MJ/kg EPA-Ethylester wohingegen der Index des sauren Prozesses bei 1287 MJ/kg EPA-Ethylester liegt. Folglich ist zum jetzigen Zeitpunkt der saure Prozess bezüglich des energetischen Aufwands wirtschaftlicher.

Um zukünftig energetische Einsparungen zu realisieren, ist es notwendig die Trocknung zu reduzieren bzw. zu umgehen, was bisher kein Bestandteil des Projekts war. Zusätzlich ist es beim enzymatischen Prozess notwendig, die Ethanolmenge bei der Extraktion und der integrierten Umesterung zu reduzieren, um die energetische Belastung der Rektifikation verringern zu können.

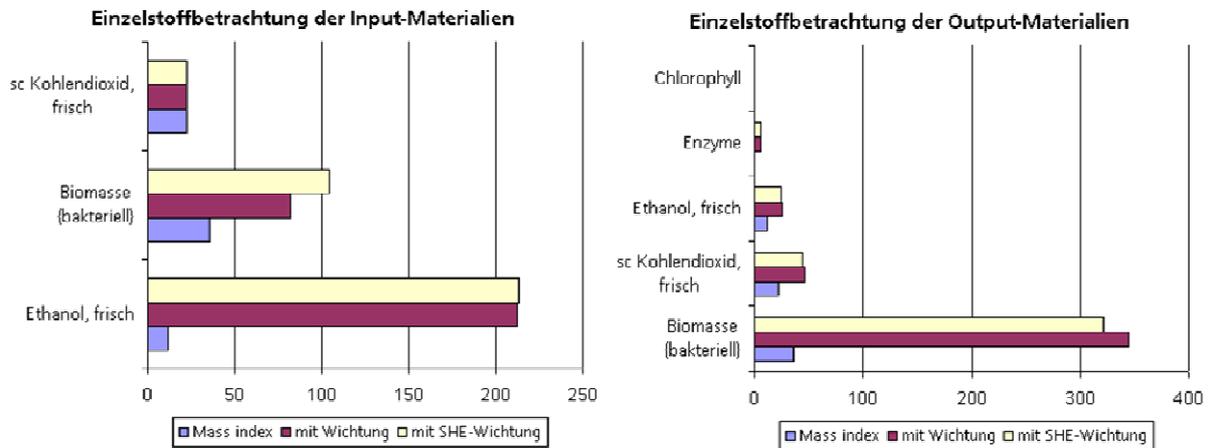


**Abbildung 38:** Relative Verteilung an elektrischer und thermischer Energie der einzelnen Prozessschritte der enzymatischen Aufarbeitung (links) und der sauren Aufarbeitung (rechts) bei der Gewinnung von EPA-Ethylestern

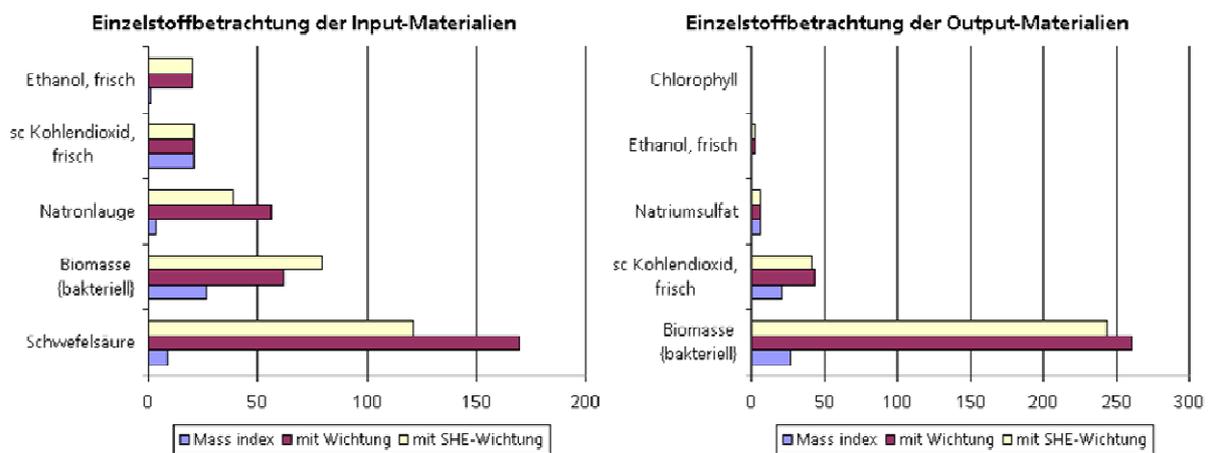
Neben der energetischen Betrachtung wurde zusätzlich eine Stoffbetrachtung durchgeführt. In Tabelle 5 sind die verwendeten Substanzen kg/kg Biomasse im enzymatischen und sauren Prozess dargestellt. Hierbei wurde mit einer Standzeit des Enzymfestbetts von 50 Tagen gerechnet (Laudani et al. 2007). Zusätzlich erfolgte eine ökologische Bewertung der Prozesse. Hierbei ist zu beachten, dass Wasser, welches bei der Zentrifugation anfällt, nicht mitbilanziert wird, um die einzelnen Wirkungen der Substanzen der Aufarbeitung besser herausarbeiten zu können. In Abbildung 39 sind die Einzelstoffbetrachtungen der Input- und Outputseite des enzymatischen Prozesses dargestellt. Hierbei zeigt Ethanol den größten Anteil auf der Inputseite. Wohingegen die Biomasse nach der Extraktion als Abfallstoff in der Outputbetrachtung den größten Anteil einnimmt. Bei dem sauren Prozess (Abbildung 40) zeigt Schwefelsäure auf der Inputseite und ebenfalls die Biomasse auf der Outputseite den größten Anteil.

**Tabelle 5:** Verwendete Substanzen kg/kg Biomasse im Prozess der enzymatischen Aufarbeitung und der sauren Aufarbeitung (Ethanol und CO<sub>2</sub> werden im Prozess im Kreis gefahren).

Enzymatisch		Sauer	
Substanz	Menge kg/kg	Substanz	Menge kg/kg
Ethanol	8	Ethanol	2
Enzym	0,007	Schwefelsäure	0,3
-	-	Natronlauge	0,1
CO <sub>2</sub>	65	CO <sub>2</sub>	26



**Abbildung 39:** Einzelstoffbetrachtung Inputseite (links) und Outputseite (rechts) bei der enzymatischen Gewinnung von EPA-Ethylestern

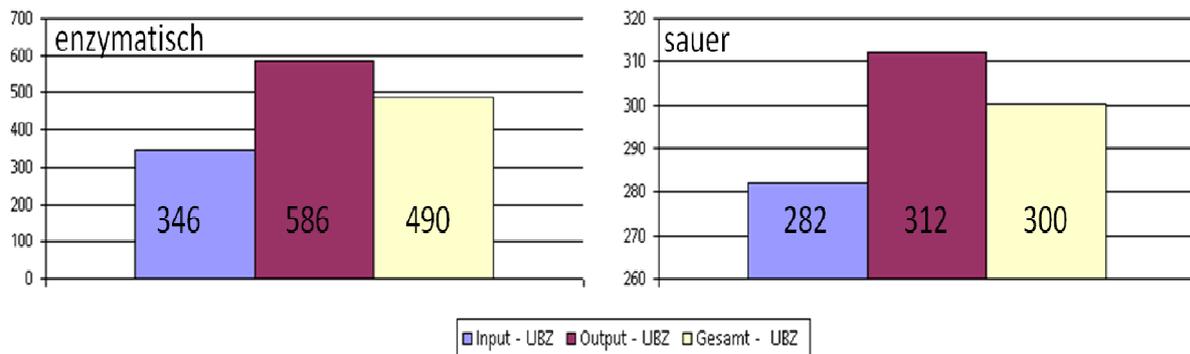


**Abbildung 40:** Einzelstoffbetrachtung Inputseite (links) und Outputseite (rechts) bei der sauren Gewinnung von EPA-Ethylestern

Zur ökologischen Bewertung wird die Umweltbewertungszahl (UBZ) ermittelt. Diese wird in Sabento aus den verschiedenen Wirkungskategorien der Input- und Outputströme bestimmt. Je niedriger die Umweltbewertungszahl ist, desto geringer ist das Umweltwirkungspotential des Prozesses und somit der Prozess als ökologischer einzustufen. Insgesamt ergibt sich aus der Bilanz der einzelnen verwendeten Substanzen für den enzymatischen Prozess, bezogen auf die vorliegende Bilanzierung, eine Umweltbewertungszahl von 490. Die Umweltbewertungszahl des sauren Prozesses liegt bei 300 (Abbildung 41). Der Unterschied der beiden Prozesse liegt daran, dass die Gesamtausbeute beim sauren Prozess mit ca. 94 % höher ist als beim enzymatischen Prozess mit ca. 70 %. Folglich ist für die gleiche Menge an EPA-Ethylestern im enzymatischen Prozess mehr Biomasse notwendig, was in die

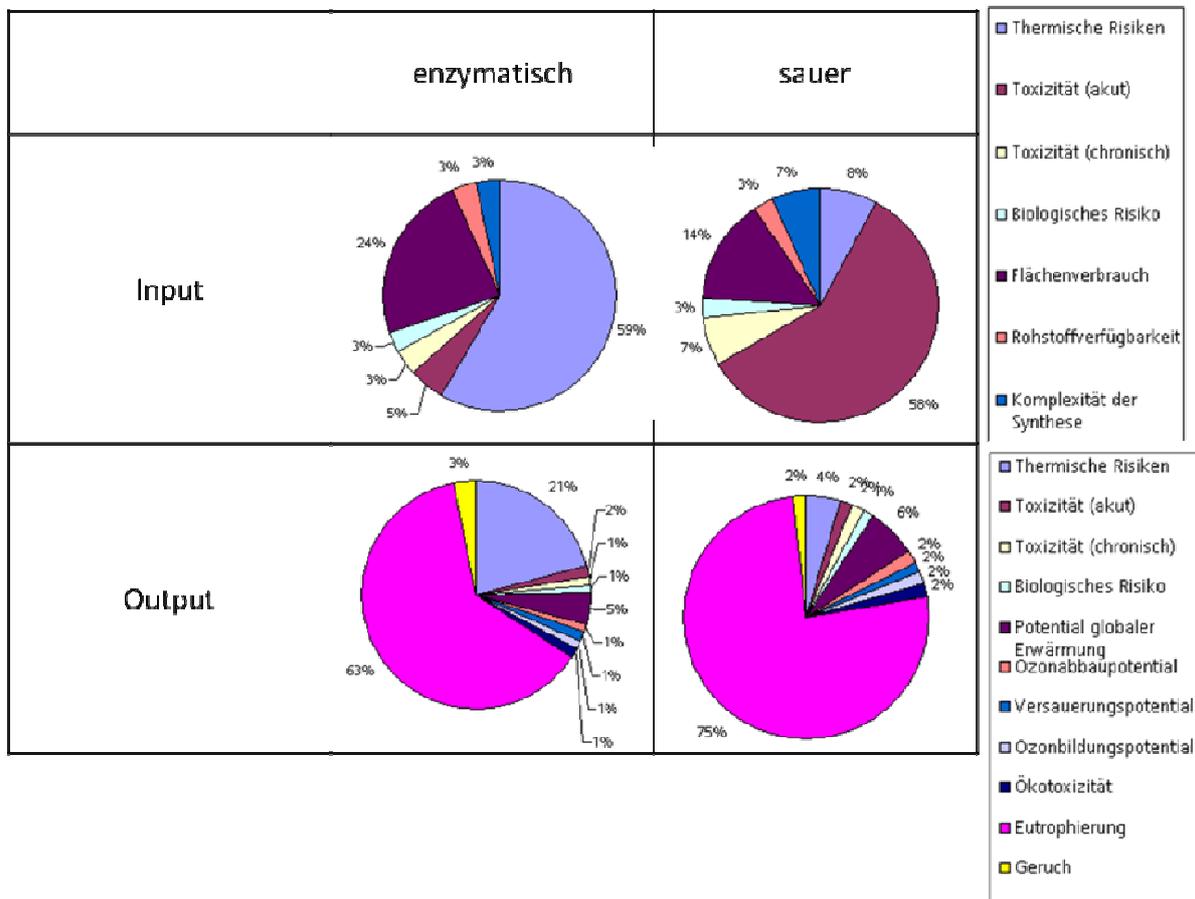
Berechnung der UBZ mit einget (siehe auch Abbildung 39). Somit stellt sich der saure Aufarbeitungsprozess im Moment sowohl als wirtschaftlicher, wie auch als ökologischer dar.

Insgesamt ergibt sich aus der Bilanz der einzelnen verwendeten Substanzen für den enzymatischen Prozess, bezogen auf die vorliegende Bilanzierung, eine Umweltbewertungszahl (UBZ) von 490. Die Umweltbewertungszahl des sauren Prozesses liegt bei 300 (Abbildung 41). Der Unterschied der beiden Prozesse liegt daran, dass die Gesamtausbeute beim sauren Prozess mit ca. 94 % höher ist als beim enzymatischen Prozess mit ca. 70 %. Folglich ist für die gleiche Menge an EPA-Ethylestern im enzymatischen Prozess mehr Biomasse notwendig, was in die Berechnung der UBZ mit einget (siehe auch Abbildung 39). Somit stellt sich der saure Aufarbeitungsprozess im Moment sowohl als wirtschaftlicher, wie auch als ökologischer dar.



**Abbildung 41:** Umweltbewertungszahlen mit spezifischen Wichtungsfaktoren bei der enzymatischen (links) und sauren (rechts) Gewinnung von EPA-Ethylestern

In Abbildung 42 sind die einzelnen Wirkungspotentiale der beiden Prozesse dargestellt. Beim enzymatischen Prozess liegt beim Input, durch die Verwendung von Ethanol, der Schwerpunkt auf dem thermischen Wirkungspotential (59 %). Bei Output überwiegt aufgrund der Biomasse die Eutrophierung (63 %). Zusätzlich bleibt auch hier der Ethanol mit thermischer Wirkung noch von Bedeutung (21 %). Hingegen überwiegt beim sauren Prozess, aufgrund der Schwefelsäure, die akute Toxizität (58 %). Beim Output verschiebt sich das Wirkungspotential aufgrund der Biomasse. Hierbei überwiegt die Eutrophierung (75 %).



**Abbildung 42:** Wirkungspotentiale der Wirkungskategorien Inputseite und Output-Seite bei der enzymatischen (links) und sauren (rechts) Gewinnung von EPA-Ethylestern

Eine weitere Bilanzierung bezüglich der Wirtschaftlichkeit ist zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich, da für den Gesamtprozess noch zu wenige Daten vorliegen. Der Prozess wurde bisher im Labormaßstab untersucht. Ein Upscaling ist noch nicht erfolgt.

## 4. Diskussion

Das Ziel des Projektes – die Entwicklung eines integrierten Prozesses zur Gewinnung von EPA aus phototroph kultivierten Mikroalgen mittels CO<sub>2</sub>-Extraktion – konnte dank der sich ergänzenden Kompetenzen der Projektpartner erreicht werden: Von vier untersuchten Algenarten konnten drei im Pilotmaßstab im Freiland kultiviert werden. Durch die während der im Labormaßstab durchgeführten Untersuchungen zur Optimierung des Kultivierungsprozesses sowie aus den im Freiland gewonnenen Daten lassen sich erste Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen anstellen, die aufzeigen, dass zumindest für die Spezies *Phaeodactylum tricornerutum* eine industrielle Produktion an einem geeigneten, sonnenreichen Standort unter Verwendung industrieller CO<sub>2</sub>-Quellen machbar ist.

Dank der technischen Ausstattung sowie der Erfahrung zur Entwicklung von Downstream-Prozessen des IGVT (unter Rückgriff auf Ressourcen des Fraunhofer IGB) konnten verschiedene Aufschluss- und Extraktionsverfahren für drei Algenarten untersucht werden. Die Kieselalge *Phaeodactylum tricornerutum* zeigte bei dem Vergleich von Aufschluss- und Extraktionsversuchen die besten Ergebnisse, so dass die Untersuchungen ab Herbst 2009 ausschließlich mit dieser Spezies durchgeführt wurden. Ein Vorteil der Verwendung von *Phaeodactylum* als EPA-Quelle besteht darin, dass ein Aufschluss der Algenbiomasse nicht zwingend erfolgen muss: So konnte bei einer Ethanolextraktion von feuchter Biomasse eine Ausbeute von bis zu 90 % erzielt werden. Die Extraktion von EPA-haltigen Galaktolipiden aus feuchter Biomasse stellt energetisch gesehen eine interessante Variante dar, jedoch ist ein großes Ethanol-zu-Biomasse-Verhältnis notwendig, und damit ist die Produktkonzentration, auch bei vollständiger Extraktion, niedrig. Daher entschied man sich, weitere Versuche zur direkten Umesterung aus zuvor getrockneter Biomasse durchzuführen, um die Produktkonzentration im Extrakt zu erhöhen.

Hierbei wurde ein integrierter Prozess zur enzymatischen Umesterung und zur Extraktion mit scCO<sub>2</sub> im Festbett vom IGVT untersucht, während KD-Pharma Versuche zur sauren Umesterung von getrockneter, nicht aufgeschlossener *Phaeodactylum*-Biomasse und anschließender Extraktion der Ethylester mit scCO<sub>2</sub> durchführte.

Insgesamt ist zum jetzigen Zeitpunkt der saure Prozess aus energetischer Sicht sowohl als der wirtschaftlichere als auch der ökologischere Prozess zu bewerten. Die saure Umesterung ist schon seit längerem bekannt. Im analytischen Maßstab wird dieses Verfahren auch schon für Algen angewendet (Lepage und Roy 1984). Der enzymatische Prozess mit der Integration von Extraktion und Umesterung mit scCO<sub>2</sub> und Ethanol wurde bisher noch nicht angewendet. Im Rahmen des Projekts erfolgte bisher nur die Untersuchung der Machbarkeit der Integration bezüglich der unterschiedlichen Versuchsparameter Druck, Temperatur, MGDG-Konzentration und Volumenstrom. Der integrierte Prozess wurde bisher jedoch nicht auf die Ethanolmengen hin optimiert. Aus der Bilanzierung (energetisch und ökologisch) ist ersichtlich (Abbildung 38; Abbildung 39; Abbildung 42), dass die Ethanol-

menge, um den enzymatischen Prozess zukünftig verbessern zu können, reduziert werden muss. Folglich ist eine weitere Optimierung des CO<sub>2</sub>/EtOH Verhältnisses während der integrierten Extraktion und Umesterung notwendig.

Zusätzlich hat sich bei beiden Prozessen die Biomasse im Output (Abbildung 42) bezüglich der Eutrophierung als negativ herausgestellt. Um den Prozess wirtschaftlicher und ökologischer zu gestalten, ist eine Vergärung der Abfallbiomasse zu Biogas möglich. Hierbei kann das Biogas energetisch im Rahmen eines Blockheizkraftwerks genutzt werden. Das entstehende CO<sub>2</sub> kann erneut der Algenkultivierung zur Verfügung gestellt werden. Durch die Trennung der Fest- und Flüssigphase bei der Vergärung ist es zusätzlich möglich, Stickstoff und Phosphat für die erneute Algenkultivierung als Ressourcenersparnis zur Verfügung zu stellen. Bei der Vergärung ist jedoch zu beachten, dass z.B. eine zu hohe Salzkonzentration die Vergärung zu Biogas (Methan) hemmt (Chen et. al. 2008). Beim sauren Prozess entsteht im Anschluss an die Umesterung, aufgrund der Neutralisation der Schwefelsäure mit Natronlauge zu Natriumsulfat (0,2 kg/kg Biomasse). Die Ethylester werden nach Rektifikation des Ethanols mit scCO<sub>2</sub> direkt aus dem Gemisch Biomasse und Salz extrahiert, so dass ein Salz-Biomasse-Gemisch zurück bleibt. Bei der enzymatischen Umesterung liegt die Biomasse nach der Rektifikation nur mit Restethanol vor. Folglich stellt die Vergärung für den enzymatischen Prozess zur Steigerung der Wirtschaftlichkeit und Senkung der UBZ eine Möglichkeit dar. Für den sauren Prozess ist eine Weiterverarbeitung der Biomasse durch Vergärung aufgrund der hohen Salzkonzentration in der Biomasse zu überprüfen und als kritisch zu betrachten. Beide Prozesse sollten zukünftig bezüglich der Verwendung von feuchter Biomasse, um die Trocknung zu sparen, optimiert werden.

Der Vergleich basischer und saurer Aufschlüsse in Wasser sowie Ethanol zeigt, dass die höchste Ausbeute beim Kochen in saurem Ethanol erreicht wird. Dabei wird die Biomasse aufgeschlossen und gleichzeitig werden die Fettsäuren zum Ethylester umgesetzt. Basische Umesterungen sowie Umesterungen in Wasser sind aufgrund der verringerten Ausbeute nicht zu empfehlen. Die Fettsäureethylester können mittels SFE gut aus dem getrockneten Ansatzgemisch abgetrennt werden.

Eine direkte Extraktion der Galactolipide im Festbett mittels überkritischem CO<sub>2</sub> und Ethanol als Modifier konnte für nicht aufgeschlossene, getrocknete *Phaeodactylum*-Biomasse nicht durchgeführt werden. Die hierzu durchgeführten Versuche ergab die Erfordernis einer gründlichen Durchmischung mit einem porösen inerten Material (z.B. Kieselgur), um eine Verstopfung des Extraktionskammerinhaltes zu vermeiden. Trotz allem konnte aber kein Extrakt - weder ohne noch mit Modifier [Ethanol, bis 50% (w/w)] - gewonnen werden.

## Literaturverzeichnis:

**Arao T, Kawaguchi A., Yamada M.** (1987). Positional distribution of fatty acids in lipids of the marine diatom *phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* 26, 9, 2573-2576

**Chen Y., Cheng J.J., Creamer K.S.** (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Biore-source Technology* 99, 4044-4064

**Fraunhofer IGB** (2011). <http://www.igb.fraunhofer.de/www/gf/ppt/trocknung/start.html> am 21.02.2011

**Knez, Z.** (2009). Enzymatic reactions in dense gases. *Journal of supercritical fluids* 47, 357-372

**Laudani C.G., Habulin M., Knez Z., Porta G.D.P., Reverchon E.** (2007). Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench scale packed-bed reactor study. *Journal of supercritical fluids* 41, 74-81

**Lepage G., Roy C.C** (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction of purification. *J.Lipid Res.*25, 1391-1396

**Meiser, A.** (2004). Produktion von Eicosapentaensäure mit *Phaeodactylum tricornutum* im Flat Panel Airlift Reaktor. In: Dissertation Universität Hohenheim, Hohenheim (2004)

## **Innerhalb des Projekts erstellte Veröffentlichungen, Präsentationen und Patente**

**Ripplinger P.** (2009). „Produktion von Omega-3-EPA mittels Mikroalgen“ Vortrag im ChemBioTec-Slot auf der Biotechnika am 06.10.2009 um 17.00 Uhr

**Schmid-Staiger U., Seibert A.,** (2009). "Stoffliche und energetische Nutzung von Algenlipiden", Jahresbericht 08/09 Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik

**Seibert A., Mathias J., Schmid-Staiger U., Hirth T., Trösch W.,** (2009). "Process development for the production of Omega-3-eicosapentaenoic acid (EPA) as dietary supplement out of micro algae"; Poster Green Talents Symposium BMBF, Berlin 05.09.09

**Seibert A., Schmid-Staiger U., Trösch W., Hirth T.** (2009) "CO<sub>2</sub>-Killer und Rohstofflieferanten - Kultivierung und Nutzung von Mikroalgen" CAV, 2/2009, 36-37

**Seibert A., Schmid-Staiger U.,** (2011) "Gewinnung von EPA-Ethylester aus Mikroalgen mit überkritischen Fluiden", Jahresbericht 2011 Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik

**Seibert A., Mathias J., Schmid-Staiger U., Hirth T., Trösch W.** (2010). "Process development for the production of Omega-3-eicosapentaenoic acid (EPA) as dietary supplement from micro algae"; Poster „Industrielle Nutzung nachwachsender Rohstoffe - Chemie, Biotechnologie, Verfahrenstechnik“, Dechema, 20.01-21.01. 2010, Frankfurt am Main

**Seibert A., Kimyonsen D., Schmid-Staiger U., Hirth T., Trösch W.**(2010). "Process development for the production of Omega-3-eicosapentaenoic acid (EPA) as dietary supplement from micro algae"; Poster 8th European Workshop Biotechnology of Microalgae, 7.06-10.06.2010, Nuthetal

**Seibert A., Kimyonsen D., Unkelbach G., Schmid-Staiger U., Hirth T., Trösch W.** (2010). "Enzymatic production of EPA-ethylesters from microalgae with supercritical fluids"; Poster 28. Dechema Jahrestagung, 21.09-23.09.2010, Aachen

**Seibert A., Unkelbach G., Schmid-Staiger U., Hirth T., Trösch W.** (2010). "Enzymatic production of Eicosapentaenoic acid (EPA) ethyl esters from microalgae with supercritical fluids"; Poster Green solvents Conference, 10.10-13.10.2010 Berchtesgaden

**Seibert A., Unkelbach G., Knez Z., Schmid-Staiger U., Hirth T., Trösch W.** (2011). "Process integration of extraction and transesterification of omega-3-EPA ethyl esters from microalgae with supercritical fluids"; Vortrag Jahrestreffen des Fachausschusses Hochdruckverfahrenstechnik, 10.03-11.03.2011 Maribor, Slowenien

## Anhang 1

### Arbeitspakete laut Antragstellung:

AP	Arbeitspaketbeschreibung	Beteiligte Partner
<b>AP 1</b>	<b>Auswahl und Test von EPA-Produzenten</b>	
	Auswahl und Anzucht von EPA-Produzenten im Labormaßstab.	IGVT Universität Stuttgart (3 MM) Subitec GmbH (3 MM) Soliance (0 MM) KD Pharma (2 MM)
<b>AP 2</b>	<b>Entwicklung und Optimierung der Prozesstechnik</b>	
<b>AP 2.1</b>	Optimierung der Prozessparameter Lichtintensität, CO <sub>2</sub> -Konzentration, Temperatur, Betriebsweise für <i>Nannochloropsis spec.</i>	<b>Subitec GmbH</b> (8 MM)
<b>AP 2.2</b>	Optimierung der Prozessparameter Lichtintensität, CO <sub>2</sub> -Konzentration, Temperatur, Betriebsweise für zwei verschiedene Algenstämme N.N und Analyse der Lipidspektren unter verschiedenen Prozessparametern.	<b>Subitec GmbH</b> (10 MM)
<b>AP 3</b>	<b>Algenproduktion für die Versuchsmuster-herstellung</b>	
<b>AP 3.1</b>	Umrüstung und Inbetriebnahme der Pilotanlage	<b>Subitec GmbH</b> (2 MM)
<b>AP 3.2</b>	Herstellung von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> -Chargen	<b>Subitec GmbH</b> (4 MM)
<b>AP 3.3</b>	Herstellung von <i>Nannochloropsis</i> -Chargen	<b>Subitec GmbH</b> (4 MM)
<b>AP 3.4</b>	Herstellung von zwei weiteren Pilot-Chargen der in AP 1.1 und 2.2 untersuchten Algenstämme	<b>Subitec GmbH</b> (8 MM)
<b>AP 4</b>	<b>Entwicklung und Optimierung des Zellaufschlusses</b>	
<b>AP 4.1</b>	Austestung verschiedener Zellaufschlussmethoden für einen produktschonenden Aufschluss von <i>Phaeodactylum</i> und <i>Nannochloropsis</i>	<b>IGVT Universität Stuttgart</b> (7 MM) KD Pharma (7 MM)

<b>AP 4.2</b>	Austestung verschiedener Zellaufschlussmethoden für einen produktschonenden Aufschluss von zwei weiteren Algenstämmen (Methoden wie AP4.1)	<b>IGVT Universität Stuttgart</b> (7 MM) KD Pharma (1 MM)
<b>AP 5</b>	<b>Entwicklung und Optimierung der Extraktion mit CO<sub>2</sub></b>	
	Versuche zur Extraktion von EPA-reichem Algenöl aus aufgeschlossenen Algenzellen mittels SFE im Pilot- und Produktionsmaßstab	<b>KD-Pharma</b> (24 MM)
<b>AP 6</b>	<b>Projektkoordination und –dokumentation</b>	
<b>AP 6.1</b>	Projektkoordination	Subitec GmbH (2 MM)
<b>AP 6.2</b>	Projektdokumentation	alle (3 MM)
<b>AP 7</b>	<b>Ergebnis/Know-how-Transfer und Realisierung</b>	
	Produktentwicklung und Vermarktung	<b>KD-Pharma</b> (4 MM) Soliance, Minami Nutrition

**Fettgedruckt** die federführende Firma / Institut

### Arbeitspakete nach Statusseminar:

<b>AP</b>	<b>Arbeitspaketbeschreibung</b>	<b>Beteiligte Partner</b>
<b>AP 1</b>	<b>Auswahl und Test von EPA-Produzenten</b>	
	Auswahl und Anzucht von EPA-Produzenten im Labormaßstab.	IGVT Universität Stuttgart <b>Subitec GmbH</b> KD Pharma
<b>AP 2</b>	<b>Entwicklung und Optimierung der Prozesstechnik</b>	
<b>AP 2.1</b>	Optimierung der Prozessparameter Lichtintensität, CO <sub>2</sub> -Konzentration, Temperatur, Betriebsweise für <i>Nannochloropsis spec.</i>	<b>Subitec GmbH</b>
<b>AP 2.2</b>	Optimierung der Prozessparameter Lichtintensität, CO <sub>2</sub> -Konzentration, Temperatur, Betriebsweise für zwei verschiedene Algenstämme N.N und Analyse der Lipidspektren unter verschiedenen Prozessparametern.	<b>Subitec GmbH</b>
<b>AP 3</b>	<b>Algenproduktion für die Versuchsmusterherstellung</b>	
<b>AP 3.1</b>	Umrüstung und Inbetriebnahme der Pilotanlage	<b>Subitec GmbH</b>
<b>AP 3.2</b>	Herstellung von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> -Chargen	<b>Subitec GmbH</b>
<b>AP 3.3</b>	Herstellung von <i>Nannochloropsis</i> -Chargen	<b>Subitec GmbH</b>
<b>AP 3.4</b>	Herstellung von <i>Monodus</i> -Chargen	<b>Subitec GmbH</b>
<b>AP 4</b>	<b>Trocknung der Algenbiomasse</b>	
	Trocknung von <i>Phaeodactylum</i> -Biomasse mittels Lyophylle und Dampftrockner	<b>Subitec GmbH</b>
<b>AP 5</b>	<b>Entwicklung und Optimierung des Zellaufschlusses</b>	
	Austestung verschiedener Zellaufschlussmethoden für einen produktschonenden Aufschluss von <i>Phaeodactylum</i>	IGVT Universität Stuttgart KD Pharma
<b>AP 6</b>	<b>Entwicklung und Optimierung der Extraktion mit scCO<sub>2</sub></b>	

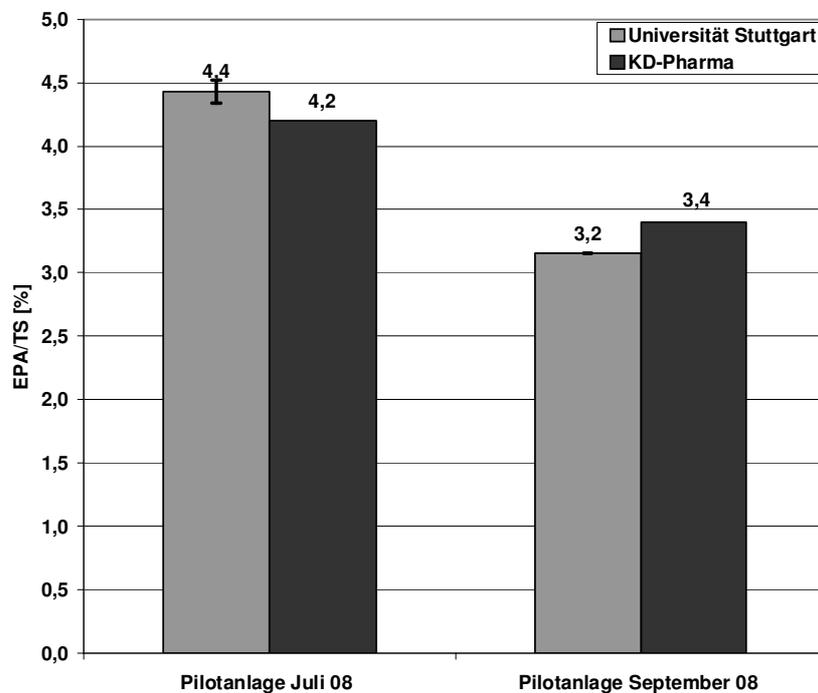
<b>AP 6.1</b>	Optimierung der Extraktion der Galactolipide im Festbett mittels scCO <sub>2</sub> und Ethanol als Modifier für <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<b>IGVT Universität Stuttgart</b>
<b>AP 6.2</b>	Optimierung des Enzymfestbettreaktors mit scCO <sub>2</sub> als Lösungsmittel in Abhängigkeit der EPA-Konzentration im scCO <sub>2</sub> -Extrakt aus AP 4.1 (Prozessintegration)	<b>IGVT Universität Stuttgart</b> KD Pharma
<b>AP 6.3</b>	Direkte Umesterung und Extraktion der Galactolipide zu EPA-Ethylestern mit Säure und Ethanol	<b>KD Pharma</b>
<b>AP 7</b>	<b>Entwicklung und Optimierung der Aufreinigung mit scCO<sub>2</sub></b>	
	Auftrennung der Fettsäure-Ethylester mittels SFC	<b>KD Pharma</b>
<b>AP 8</b>	<b>Bilanzierung des gesamten Aufarbeitungsprozesses</b>	
	Vergleichende Bilanzierung der zwei erarbeiteten Prozesse	alle

**Fettgedruckt** die federführende Firma / Institut

## Anhang 2

Ringversuch:

Da EPA in den Algenzellen als Monogalactosyldiglycerid in der Chloroplastenmembran vorliegt, ist es notwendig, die Fettsäure als EPA-Ethylester von dem Ursprungsmolekül abzutrennen. Aufgrund unterschiedlicher Analysemethoden zur Bestimmung des absoluten EPA-Gehalts in der Algenbiomasse wurde zunächst ein Ringversuch zwischen KD-Pharma und der Universität Stuttgart durchgeführt. Hierzu wurde der EPA-Gehalt zweier unterschiedlicher Biomassechargen aus der Pilotanlage (Subitec) von beiden Projektpartnern bestimmt.



**Abbildung 43:** Ringversuch (KD-Pharma und Universität Stuttgart) zur Bestimmung des prozentualen EPA-Gehalts lyophilisierter Algenbiomasse in zwei unterschiedlichen Chargen (*Phaeodactylum tricornutum*; Pilotanlage Juli 2008 und Pilotanlage September 2008) mit den jeweiligen Bestimmungsmethoden.

In Abbildung 43 ist der prozentuale EPA-Gehalt von zwei *Phaeodactylum tricornutum* Chargen (Pilotanlage Juli, September 2008) nach den unterschiedlichen Methoden der Projektpartner dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass beide Methoden eine maximale Abweichung von ca. 6 % aufweisen und folglich beide Methoden vergleichbar sind.