

Entwicklung eines Plasma-Aufschluss-Verfahrens zur effizienten und schonenden Extraktion bioaktiver Inhaltsstoffe aus Mikroalgen

Kurztitel Plasma-ALgen-ExtrAktion (**PALEA**)

AZ DBU 35257

Projektpartner IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH



Arthur-Scheunert-Allee 40/41

14558 Nuthetal



Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP)

Felix-Hausdorff-Straße 2

17489 Greifswald

Beginn 01.05.2020

Laufzeit 01.05.2020 bis 31.12.2021

Berichtszeitraum 01.05.2020 bis 31.12.2021

gefördert durch



Deutsche Bundesstiftung Umwelt

Verfasser Dipl. Biochem. Elke Kurth IGV

Dr. rer. nat. Katja Zocher INP

Dipl. Chem. Petra Sandau IGV

M. Sc. Marco Kreische IGV

Nuthetal, 17.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis-----	2
Abkürzungsverzeichnis -----	3
Kurzfassung-----	4
1. Anlass und Zielsetzung des Projekts -----	6
2. Darstellung und Ergebnisse der Arbeitspakete -----	7
AP 1 IGV: Labscale Kultivierung der Rotalge <i>Cyanidium caldarium</i> -----	7
AP 2 IGV: Detaillierte Analysen der kultivierten Biomasse -----	8
AP 3 IGV: Scale-up Kultivierung zur Gewinnung von Biomasse -----	9
AP 4 IGV: Extraktionsversuche zur Gewinnung der favorisierten Wirkstoffe (1L-Maßstab) -----	16
AP 5 IGV: Charakterisierung der Wirkstoffextrakte (chemisch-analytisch)-----	17
AP 6/9 IGV: Charakterisierung der Wirkstoffextrakte (Bioaktive Wirkung/Mikrobiologie)-----	18
AP 8 IGV: Verfahrensoptimierung und Scale-up: Extraktion nach Plasma-Aufschluss im 10 L Maßstab-----	19
AP 10 IGV: Erstellung von Verfahrens- und Produktdokumentationen -----	19
AP 11 IGV/INP: Dokumentation und Präsentation der Ergebnisse -----	19
Ergebnisse IGV-----	20
AP 1 INP: Modifikation Laborverfahren zur Behandlung von Algenbiomasse -----	36
AP 2 INP: Quantifizierung des Algenaufschlusses im Testreaktor für aus AP1 abgeleiteten Betriebsparameterbereiches -----	36
AP 3 und AP 4 INP: Entwicklung Laborreaktor, Aufbau & Inbetriebnahme -----	38
AP 5 bis 8 INP: Scale-up des Laborverfahrens -----	39
Konzeption 5-Liter Modul-----	40
AP 9 bis 11 INP: Konzeption weiterer Module-----	43
Ergebnisse INP-----	44
3. Diskussion -----	55
4. Öffentlichkeitsarbeit-----	57
5. Fazit-----	57

Anlagen

Anlage 1: Extraktionsergebnisse unter Variation der Funkenfrequenz

Anlage 2: Extraktionsergebnisse unter Variation des Durchflussvolumens im 1L Reaktor

Anlage 3: Analysenzertifikat zu plasmabasiertem Cyanidium Extrakt

Anlage 4: Flow-Chart zum Herstellungsverfahren

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
AP	Arbeitspaket
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
EA	Enzymatischer Aufschluss durch Alkalase
EX	Extraktion
DAD	Dioden-Array-Detektoren
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GT	Gefrier/Tau
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HWE	Heißwasserextraktion
PP	Polyphenole
PA	Plasmaaufschluss
TM	Trockenmasse
TOF/MS	Time-of-flight/ Massenspektrometrie
Z	Zentrifugation

Kurzfassung

Die Mikroalgenart *Cyanidium caldarium* wurde im Verlauf der Projektbearbeitung vom 1 Liter bis zum 1500 Liter-Maßstab kultiviert und die gewonnene Biomasse bezüglich ihrer Zusammensetzung analysiert. Auf Basis dieser kultivierten Mikroalgenbiomasse wurden beim INP und im IGV Versuche zur Entwicklung einer effizienten Aufschlusstechnologie auf Basis von **Atmosphärendruckplasma** durchgeführt. Die Suspensionen der aufgeschlossenen Mikroalgenbiomasse wurden im IGV aufgearbeitet und die Effizienz des Plasmaaufschlusses über die Trockenmasse und die Leitsubstanzen im Extrakt bewertet. Im Rahmen des Projektes war es möglich, ein 1-Liter Modul, sowie ein 5-Liter Modul zum Plasmaaufschluss der Modellalge erfolgreich zu entwickeln. Durch Bauteil- und Parametervariationen konnte ein System entwickelt werden, welches für den industriellen Einsatz bei einem niedrigen Energieeintrag geeignet ist.

Folgende Erkenntnisse/Ergebnisse wurden dabei erzielt:

- Durch den Plasmaaufschluss wird eine deutliche Steigerung des Extraktionsergebnisses bezüglich der geprüften Leitsubstanzen im Vergleich zur Extraktion unaufgeschlossener Biomasse erreicht. Die Extrakt-Trockenmasse konnte um 60%, Polyphenole um 275%, Protein um 168% sowie Gamma-Aminobuttersäure (GABA) um 147% im Algenextrakt erhöht werden (Abb. 32-35, Tab. 9).
- Im Vergleich zum Originalverfahren wurde durch Anwendung des Plasmaaufschlusses eine Steigerung der Extrakt-Trockenmasse um 12%, von Polyphenolen um 3% und von Protein um 9% verzeichnet (Labor-Plasmaaufschluss). Der Plasmaaufschluss mittels 1-Liter- und 5-Liter-Reaktor erbrachte in Kombination mit dem biologischen Aufschluss die derzeit bestmöglichen Extraktionsergebnisse.
- Der Plasmaaufschluss bewirkt in Kombination mit den originalen Aufschlusstechniken eine deutliche Steigerung der Extrakt-Trockenmasse sowie der freigesetzten Leitsubstanzen Polyphenole, Protein und Gamma-Aminobuttersäure (GABA) im Vergleich zum Basisverfahren ohne Zellaufschluss. Wird der Plasmaaufschluss als zusätzlicher Schritt im Originalverfahren integriert, erhöht sich die Extrakt-Trockenmasse um 103%, der Gehalt an Polyphenolen um 375% und der Proteingehalt um 261% sowie der GABA-Gehalt um 47% im Algenextrakt (Abb. 37-40, Tab. 10). Ein großer Vorteil des kombinierten Aufschlussverfahrens (PA/EA) zeigt sich insbesondere in der Erhöhung der Aktivsubstanz (Extrakt-Trockenmasse). Der in der Produktspezifikation des Markenproduktes festgelegte Wert für die Extrakt-Trockenmasse von > 2,9 % wird deutlich überschritten.
- Die Integration der Plasma-Technologie im Herstellungsverfahren bietet sowohl die Möglichkeit zur Optimierung der Gehalte an bioaktiven Leitsubstanzen als auch zur Energieeinsparung. Energie intensive Konzentrierungsschritte, die im Originalverfahren zur Einhaltung der Spezifikation benötigt werden, könnten durch Einsatz des Plasmaverfahrens ggf. entfallen.
- Im Rahmen des Projektes wurde ein effizientes Verfahren zum schonenden Aufschluss von Mikroalgenbiomasse mittels Atmosphärendruckplasma in Kombination mit anschließender Extraktion, Aufarbeitung und Gewinnung bioaktiver Algenwirkstoffe erarbeitet.
- Durch Einsatz der Plasma-Technologie hergestellte Algenextrakte enthalten höhere Gehalte an Aktivsubstanzen und ein breiteres Spektrum an bioaktiven Wirkstoffen. Es konnte gezeigt werden, dass durch den Plasmaaufschluss weitere kosmetisch relevante Metaboliten wie bioaktive Peptide und wertvolle B Vitamine freigesetzt werden.
- Mittels Plasmaverfahren gewonnene *Cyanidium* Algenextrakte bieten humanen Hautzellen Schutz und verleihen Regenerationsvermögen gegenüber UV-induzierten oxidativen Stress und

damit verbundenen Zellschäden. Die wirkstoffreichen plasmabasierten *Cyanidium* Algenextrakte sind sowohl in der Lage, die durch UVA-Strahlung induzierten freien Radikale (ROS) abzufangen und ihrer zellschädigenden Wirkung entgegenzuwirken als auch bereits geschädigte Fibroblasten wieder zu regenerieren.

- Plasmabasierte *Cyanidium* Algenextrakte bewirken eine dosisabhängige Stimulierung der Kollagensynthese in humanen Fibroblasten. Die Algenextrakte weisen eine deutlich stärkere Stimulierung der Kollagensynthese in Hautzellen auf als Algenextrakte, die ohne Zellaufschluss gewonnen wurden.
- Zusammenfassend zeigen mittels Plasma-Technologie hergestellte Algenextrakte interessante kosmetische Effekte und vielfältige bioaktive Wirkungen wie Stimulierung der Kollagensynthese in Hautzellen, ausgeprägte photoprotektive und regenerierende Aktivitäten, hautaufhellende Eigenschaften sowie eine starke antioxidative radikalabfangende Aktivität.
- Nach ausführlicher Testung der realen Biomasse konnte anhand der ermittelten Parameter ein 1 Liter System konzipiert und entwickelt werden. Das 1 Liter System wurde so konzipiert, dass es eine große Spannweite an physikochemischen Eigenschaften der Realbiomasse des IGVs abdecken kann. Dies war insofern wichtig, als dass zusätzliche Schritte zur Aufschlussvorbereitung aus ökonomischen und ökologischen und ökologischen Aspekten vermieden werden sollten. So wurde die Plasmazündung optimiert, dass ein Plasma auch bei höheren Leitwerten zündet, wie sie bei der Kultivierung durch das Medium der Projektalge entstehen.
- Für die Konstruktion des 5-Liter Systems konnten gleichwertige Ergebnisse wie für das 1-Liter System erzielt werden, was eindeutig für die Skalierbarkeit des Verfahrens spricht. Die Energieversorgung für dieses Skalingmodul wurde neu konzipiert und an die Realbedürfnisse angepasst. Durch eine Neuauslegung der Energieversorgung ist es möglich, die Investitionskosten der Spannungsversorgung um ca. 90% zu senken. Zudem eignet es sich für jedwede weitere modulare Erweiterung des Aufschlussystems. Das 5-Liter Modul wurde insofern auch verbessert, als dass eine modulare Erweiterung problemlos hinsichtlich Schrittmotorenansteuerung und Energieversorgung möglich ist. Zu diesem Zweck wurden Schaltpläne und Betriebsanweisungen dem IGV zur weiteren Verwendung übersandt.
- Die zu verarbeitenden Biomassedichten stellten kein Problem dar, da der Plasmareaktor insofern verändert wurde, als dass der Innenraum des Reaktors eine sphärische Form bekam. Dies hat zur Folge, dass die zum Aufschluss benötigten Schockwellen reflektiert und somit verstärkt werden. Der Aufschluss ist damit unabhängig von der Biomassedichte.
- Es hat sich gezeigt, dass eine kontinuierliche Behandlung im Durchflusssystem bei Beachtung der maximal anwendbaren Pulsfrequenz sich am besten eignet, da somit eine Umwälzung und damit Kühlung der Suspension ohne externe Kühlung möglich ist. Dies ist im Hinblick auf ökonomische Faktoren wichtig
- Elektrodenmaterial und -geometrien wurden in verschiedenen Konstellation getestet um den bestmöglichen Betrieb des Systems zu gewährleisten. Als am stabilsten hat sich die Kombination aus zwei planaren Elektroden aus einem Wolfram ergeben, was auch für die einzusetzenden Kosten des Aufbaus vorteilig ist, da es sich um handelsübliche Schweißelektroden handelt, welche günstig einzukaufen sind.
- Eine Skalierung des Verfahrens auf 5 Liter konnte erfolgreich umgesetzt werden, ohne Einbuße der Aufschlussquantität. Zudem wurde die Energieversorgung des Systems so optimiert, dass trotz fünffacher Volumenvergrößerung sich die einzusetzende Energie lediglich verdoppelt.

- Vorversuche im Rahmen des Projektes mit einer anderen Mikroalgenpezies haben überzeugende Ergebnisse hinsichtlich extrahierbarer Leitsubstanzen ergeben. Ein Folgeprojekt unter Anwendung der gewonnenen technischen Erkenntnisse und einer weiteren Skalierung des Systems wäre sehr wünschenswert, um auch die Anwendung von Mikroalgen im industriellen Maßstab weiter in den Fokus der Öffentlichkeit zu stellen.

1. Anlass und Zielsetzung des Projekts

Die organische Biomasse von Mikroalgen enthält neben der Vielzahl von essentiellen Vitalstoffen Wirkstoffe mit funktionellen Eigenschaften, die von großem Interesse für die Pharmazie, Kosmetik und Lebensmittelindustrie sind. Von den zirka 30.000 Mikroalgenarten werden bislang nur zirka 20 Spezies zur Gewinnung von Biowertstoffen verwertet, obwohl der Markt für Extrakte/Wirkstoffe aus Algen beständig wächst. Zurückzuführen ist dies darauf, dass sich Algen neben den optimalen Anpassungsmechanismen an unterschiedliche Wachstumsbedingungen sehr effektiv funktionierende Mechanismen zum Selbstschutz zugelegt haben - stabile, kompakte Zellwände.

Damit können viele Spezies/Wirkstoffe für eine Produktentwicklung gegenwärtig nicht verwertet werden, weil resultierende Extrakte zu geringe Gehalte an den gewünschten Inhaltsstoffen aufweisen. Wirkungsspektren sowie Produktausbeuten sind häufig unzureichend, wodurch die Konkurrenz zu preislich günstigeren chemisch-synthetischen Wirkstoffen auf dem Markt erschwert wird.

Das Kernziel des Vorhabens ist deshalb die Entwicklung eines innovativen, effektiven und umweltgerechten Aufschlussverfahrens mittels Plasma-Technologie zur wirkstoffschonenden Extraktion von bioaktiven, antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen aus Mikroalgenbiomasse. Das zu entwickelnde Verfahren soll durch den innovativen Einsatz von Atmosphärendruckplasma zum Zellaufschluss die Wirtschaftlichkeit der Wirkstoffgewinnung signifikant erhöhen sowie neue Wirkungsspektren aus Algen erschließen.

2. Darstellung und Ergebnisse der Arbeitspakete

AP 1 IGV: Labscale Kultivierung der Rotalge *Cyanidium caldarium*

Der extremophile Rotalgenstamm *Cyanidium caldarium* wurde ausgehend von Erhaltungskulturen der IGV-eigenen Mikroalgenstammsammlung erfolgreich im 0,1 L-Labormaßstab und anschließend im 2 L-Labormaßstab unter definierten Wachstumsbedingungen kultiviert. Dabei kamen Schüttelkolben sowie CO₂-begaste und beheizte Blasensäulenreaktoren zum Einsatz (Abbildung 1).



Abbildung 1: Phototrophe Laborkulturen in Zellkulturflaschen (links), in Schüttelkolben (mittig) und in Blasensäulenreaktoren (rechts).

Kulturbegleitend wurden mikroskopische Qualitätskontrollen durchgeführt (Abbildung 2). Im 2 L-Maßstab wurden Trockenmassekonzentrationen bis ca. 5 Gramm pro Liter bei einem Wachstum von 0,09 Gramm pro Liter und Tag erreicht. *Cyanidium* zeigte sich im Vergleich zu anderen Mikroalgen als empfindlich gegenüber starker Verdünnung bei Inokulationsvorgängen, weshalb Kulturen nie mehr als fünffach mit frischer Nährlösung verdünnt wurden und eine initiale Trockenmassekonzentration von 0,5 g/L nicht unterschritten wurde. Inokulationsvorgänge und phototrophes Wachstum wurden mehrfach erfolgreich reproduziert. Frische *Cyanidium* Biomasse aus der Labscale-Kultivierung wurde zur Inokulation von Glasröhrenphotobioreaktoren im Technikumsmaßstab (AP 3) eingesetzt.

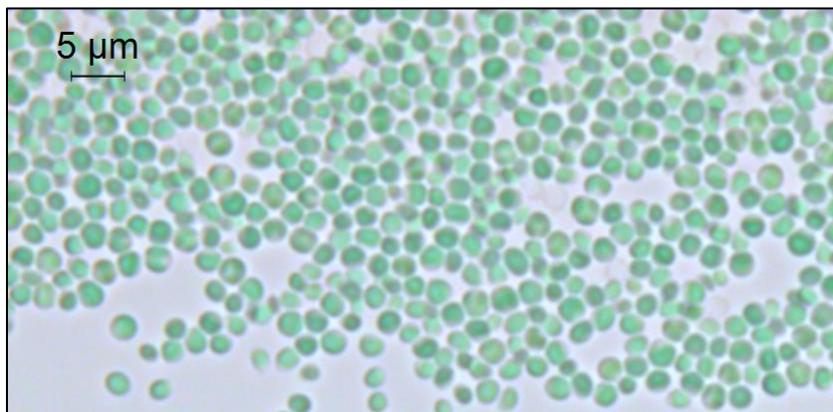


Abbildung 2: Zellen einer Laborkultur von *Cyanidium caldarium* im Lichtmikroskop.

AP 2 IGV: Detaillierte Analysen der kultivierten Biomasse

Die qualitative und quantitative Analyse der Biomasse ist erforderlich, um die reproduzierbare inhaltsstoffliche Zusammensetzung der Biomasse verschiedener Chargen belegen sowie die Effizienz von Aufschlussversuchen anhand des Vergleiches der Konzentration ausgewählter Leitsubstanzen in der Biomasse mit der im Extrakt beurteilen zu können.

In Tabelle 1 sind die Daten bezüglich der Inhaltsstoffe dreier ausgewählter LOTs der *Cyanidium* Biomassen zusammengestellt. Beschreibungen verwendeter Methoden und Messprotokolle liegen im IGV zur Einsicht vor. Die Werte in Tabelle 1 zeigen die inhaltsstoffliche Zusammensetzung der analysierten Biomassen bezüglich der in der Extrakt Spezifikation festgeschriebenen Leitsubstanzen. Exemplarisch wurden die freien Zucker (Tabelle 2) und die Monosaccharide nach saurer Hydrolyse (Tabelle 3) sowie die in Proteinen gebundenen Aminosäuren (AS) nach Hydrolyse (Tabelle 4) zweier LOTs analysiert. Vergleichend sind Messwerte mixotropher *Cyanidium*-Kultur eines Laborversuchs dargestellt (siehe Abbildung 9).

Tabelle 1: Inhaltsstoffliche Zusammensetzung *Cyanidium* Biomassen, LOT 090620, LOT 080121, LOT041121.

Parameter	Proben LOT			
	090620	080121	041121	mixotr.
Feuchte	3,00	2,97	4,4	nb
Mineralstoffe (g/100g)	3,32	nb	4,31	nb
Protein (N x 6,25) (g/100g)	66,50	54,1	61,3	40,6
GABA (g/100g)	1,23	1,12	0,31	0,57
Polyphenole (mg/100g)	144	140	223	128
Photometrie Chlorophyll- und Carotinoidgehalte				
Gesamtchlorophylle (mg/100g)	1575	955	891	212
Gesamtcarotinoide (mg/100g)	332	369	399	130
HPLC/DAD Chlorophyll- und Carotinoidgehalte				
Zeaxanthin (mg/100 g)	1575	955	374	106
Chlorophyll a (mg/100 g)	332	369	722	207
β-Carotin (mg/100 g)	87	123	122	45
∑ Carotinoide (mg/100 g)	395	492	496	151
Phycocyanin				
c-Phycocyanin (g/100 g)	10,96	6,18	7,71	1,3
Allophycocyanin (g/100 g)	2,53	1,76	1,81	0,30
∑ CPC +APC (g/100 g)	13,49	7,93	9,52	1,6

Tabelle 2: Freie Zucker *Cyanidium* Biomasse, LOT 080121 und LOT 041121.

	Glucose g/100 g	Maltose g/100 g	Fructose g/100 g	Saccharose g/100 g	∑ Mono- u. Disaccharide g/100 g
LOT 080120	0,124	<0,05	<0,05	<0,05	0,124
LOT 041121	1,23	5,14	0,14	0,08	6,59
mixotroph	0,08	1,93	<0,05	<0,05	2,01

Tabelle 3: Monosaccharide nach Hydrolyse, *Cyanidium* Biomasse, LOT 080121 und LOT 041121.

	Fucose g/100 g	Rhamnose g/100 g	Galactose g/100 g	Glucose g/100 g	Xylose g/100 g	Fructose g/100 g	Polysaccharide g/100 g
LOT 080120	<0,05	2,42	4,52	13,1	1,18	nb	19,0
LOT 041121	nb	2,30	4,54	8,34	3,12	0,32	10,83
mixotroph	<0,05	1,25	3,42	24,9	1,5	nb	26,1

Tabelle 4: Gebundene Aminosäuren nach Hydrolyse in *Cyanidium* Biomasse, LOT 090620 und LOT 041121.

Gebundene Aminosäuren	LOT 090620 g/100g	LOT 041121 g/100g	gebundene Aminosäuren	LOT 090620 g/100g	LOT 041121 g/100g
Asparaginsäure	6,56	5,7	Phenylalanin	2,24	3,1
Glutaminsäure	11,31	9,6	Isoleucin	2,21	3,9
Serin	3,26	4,1	Leucin	3,56	5,2
Histidin	1,53	1,1	Lysin	2,14	3,6
Glycin	2,26	2,7	Prolin	2,69	2,9
Threonin	2,14	3,3	Hydroxyprolin	nb	< 0,1
Arginin	6,90	4,1	Methionin	1,01	1,5
Alanin	2,47	4,2	Cystein	nb	1,4
Tyrosin	1,61	4,7	Tryptophan	0,52	0,61
Valin	2,75	3,9			

AP 3 IGV: Scale-up Kultivierung zur Gewinnung von Biomasse

Mehrere 2 L-Laborkulturen wurde zur Inokulation eines pumpendurchmischten 30 L-Glasröhrenphotobioreaktors eingesetzt (Abbildung 3 links), der wiederum zur Inokulation zweier pumpendurchmischter Glasröhrenphotobioreaktoren im 100 L-Maßstab genutzt wurde. Einer dieser 100 L-Photobioreaktoren wurde unter reproduzierbaren, eng definierten Kulturbedingungen ausschließlich unter Kunstlicht in einem temperierten Technikumsraum betrieben (Abbildung 3 mittig), während ein zweiter 100 L-Photobioreaktor in einem Gewächshaus unter Witterungseinfluss bei Tageslicht und stärker schwankenden Temperaturen betrieben wurde (Abbildung 3 rechts).

Das Wachstum von *Cyanidium* unter kontrollierten Bedingungen ohne Witterungseinfluss war gut reproduzierbar (Abbildung 4). Im 30 L-Maßstab wurde im Mittel ein Wachstum von 0,0992 Gramm Trockenmasse pro Liter Kultur und Tag erreicht, was auch im 100 L-Maßstab reproduziert werden konnte (obere Kurve in Abbildung 5). Das Wachstum dieser phototrophen Kulturen ist hauptsächlich durch die Lichtintensität der Reaktorbeleuchtung limitiert (ca. 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ bei 24 Stunden Beleuchtungsdauer pro Tag).



Abbildung 3: Kulturen der Mikroalge *Cyanidium caldarium* in 3 Glasröhren-Photobioreaktoren der IGV GmbH: 30 L unter Kunstlicht (links), 100 L unter Kunstlicht (mittig) und ca. 100 L unter Witterungseinfluss in einem Gewächshaus (rechts).

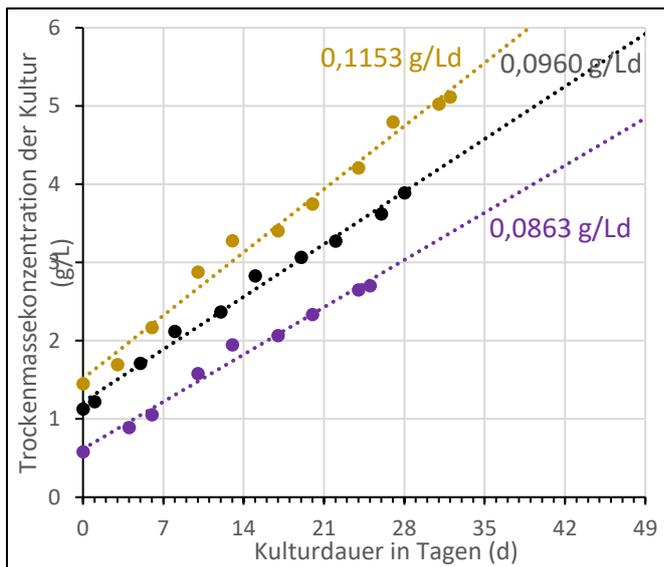


Abbildung 4: Wachstum von phototrophen Kulturen der Mikroalge *Cyanidium caldarium* im 30 L-Maßstab unter kontrollierten Licht- und Temperaturbedingungen. Die abgebildeten Kultivierungen wurden im selben Photobioreaktor (Abbildung 3 links) unter Nutzung desselben Kulturmediums durchgeführt.

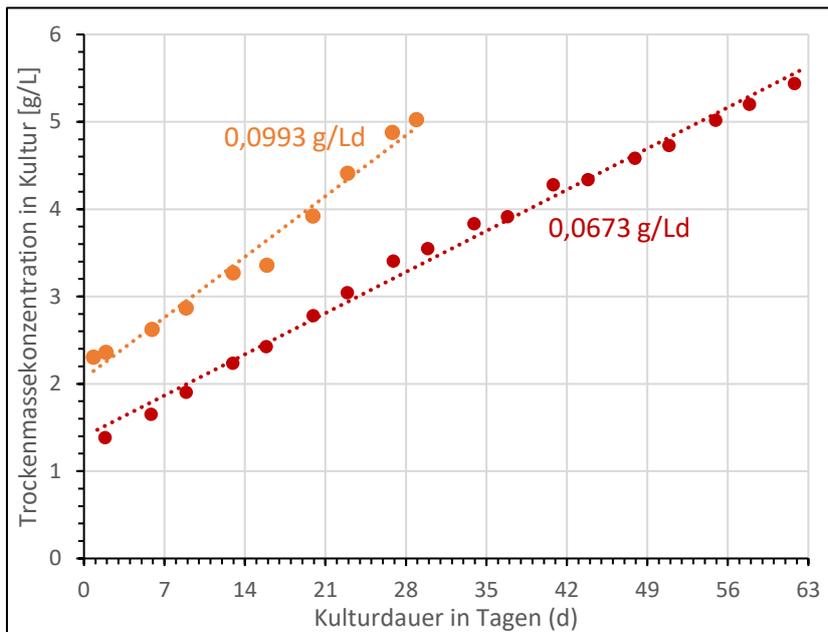


Abbildung 5: Wachstum von phototrophen Kulturen der Mikroalge *Cyanidium caldarium* im 100 L-Maßstab unter kontrollierten Licht- und Temperaturbedingungen. Genutzter Photobioreaktor: Abbildung 3 mittig.

Diese Lichtlimitation war Motivation zur Durchführung von Kultivierungen unter Sonneneinstrahlung mit wesentlich höherer Lichtintensität (bis zu $1000 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, bei tageszeitlich und jahreszeitlich schwankender Tageslänge und Sonnenintensität). Das Wachstum unter Witterungseinfluss war in den Sommermonaten aufgrund der besseren Lichtverfügbarkeit wesentlich stärker (Abbildung 6) als in künstlich beleuchteten Vergleichskulturen gleichen Maßstabs (Abbildung 5). Das bislang stärkste phototrophe Wachstum wurde im Monat Juli mit $0,2088 \text{ g}/\text{Ld}$ Gramm *Cyanidium* trockenmasse pro Liter Kultur und Tag gemessen ohne dabei Energie zur Beheizung des Gewächshauses zu benötigen.

Die Produktion von *Cyanidium* ist folglich im Hochsommer am wirtschaftlichsten und umweltschonendsten. In Herbst, Winter und Frühjahr war das Wachstum unter Witterungseinfluss hingegen deutlich geringer als in der Vergleichskultur mit definierten Bedingungen. Bei Kultivierung unter Witterungseinfluss traten in Herbst und Winter vermehrt Kontaminationen durch Schimmelpilze auf.

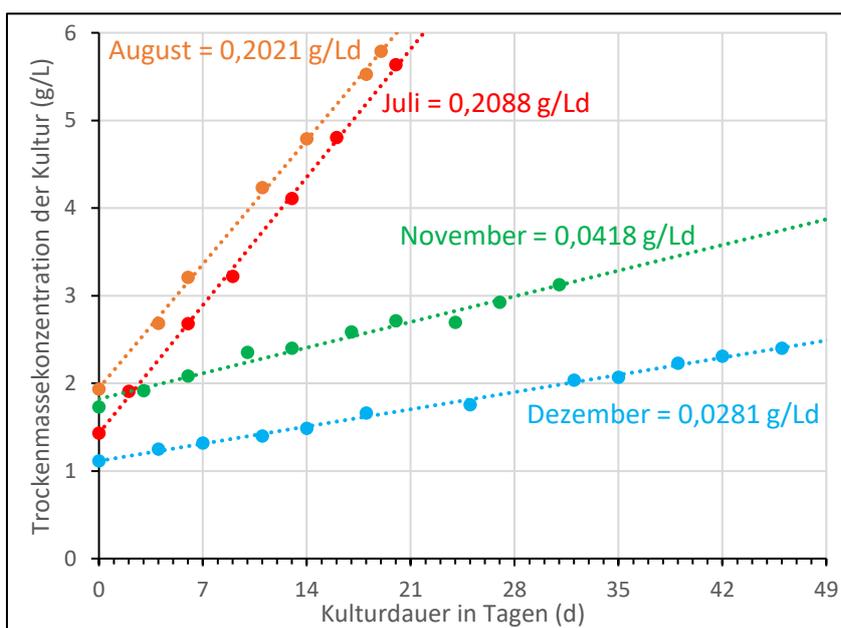


Abbildung 6: Jahreszeitliche Abhängigkeit des Wachstums von *Cyanidium caldarium* unter Witterungseinfluss in einem Gewächshaus. Die abgebildeten Kultivierungen wurden im selben Photobioreaktor (Abbildung 3 rechts) unter Nutzung desselben Kulturmediums durchgeführt. Unterschiede der Wachstumsgeschwindigkeit sind auf Stärke und Dauer der Sonneneinstrahlung sowie auf Schwankungen der Umgebungstemperatur zurück zu führen.

Der Vorgang von Inokulation und phototrophen Wachstum in 30 L- und 100 L-Reaktoren wurde mehrfach reproduziert. Während aller Kultivierungen wurden wachstumsrelevante Parameter mittels Online-Sensoren sowie mittels Labormessungen erfasst. Diese Messungen erlaubten gezielte Anpassungen von pH-Wert, Temperatur, CO₂-Begasung und Pumpgeschwindigkeit sowie die bedarfsabhängige Nachdüngung von Mediumbestandteilen wie Phosphat und Ammonium. Erntezeitpunkte wurden anhand von Messwerten der Trockenmassekonzentration sowie der optischen Dichte der Kultur festgelegt. Eine Kontaminationskontrolle der Kultur erfolgte regelmäßig mikroskopisch. Zudem wurde die elektrische Leitfähigkeit gemessen, die für den Plasmaaufschluss technisch relevant ist.

Diese elektrische Leitfähigkeit unverarbeiteter *Cyanidium*kultur ist bestimmt durch den Mineralstoffgehalt des frischen Kulturmediums, der während der Kultivierung zusätzlich durch Stoffwechselprodukte der Algen sowie durch bedarfsabhängige Nachdüngung erhöht wird (Abbildung 7). Die Leitfähigkeit unverarbeiteter, phototropher *Cyanidium*kultur lag nach IGV-Messungen zum Zeitpunkt der Ernte gewöhnlich im Bereich von 6 bis 13 mS/cm. Im Zuge der Aufkonzentrierung der Kultursuspension mittels Tellerseparator konnte die Leitfähigkeit des *Cyanidium*konzentrats in einem einzigen Separationslauf gewöhnlich auf unter 2,5 mS/cm gesenkt werden, indem Frischwasser zum Entleeren der Separatortrommel verwendet wurde.

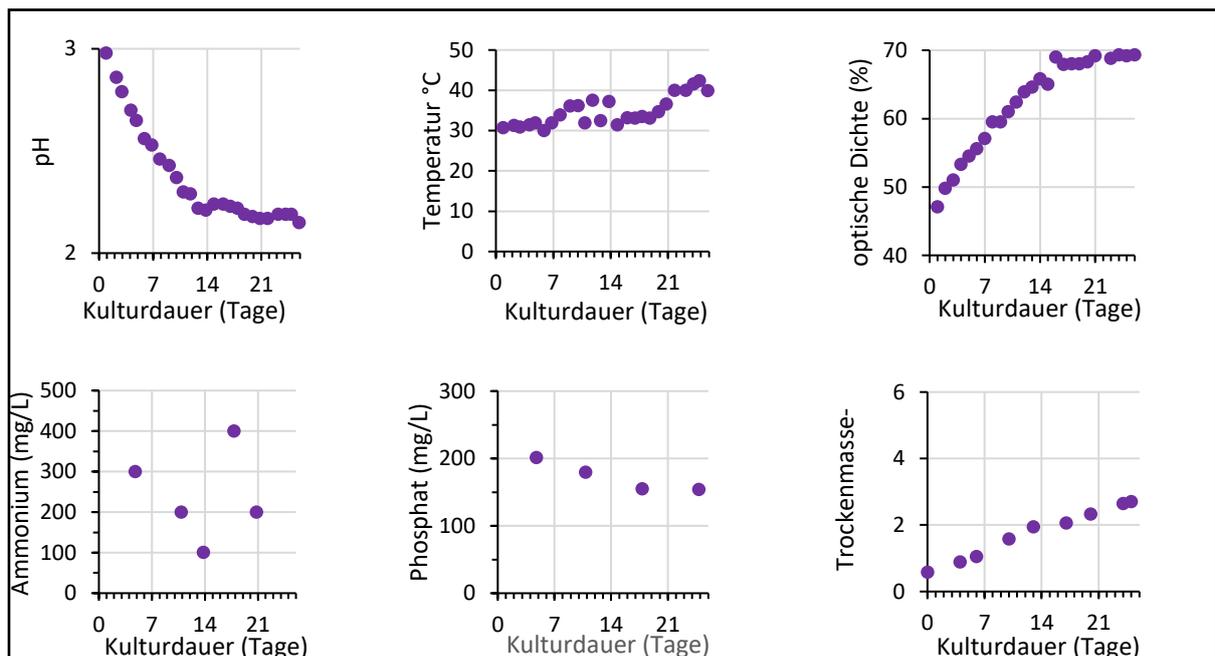


Abbildung 7: Auswahl kulturbegleitend erfasster Parameter einer *Cyanidium*kultur am Beispiel der untersten Kurve aus Abbildung 4. Als obligat acidophile und fakultativ thermophile Alge benötigt *Cyanidium* einen pH-Wert unter 3 und wächst optimal bei ca. 45 °C. Die für den Plasmaaufschluss technisch relevante elektrische Leitfähigkeit ist nicht allein durch die Zusammensetzung der frischen Nährlösung bestimmt, sondern auch durch Säurebildung der Zellen während der Kultivierung, durch Aufnahme von Ionen aus dem Kulturüberstand in die Zellen, durch bedarfsabhängige Nachdüngung (hier Ammoniumzugabe nach Tag 14) sowie durch Frischwassereintrag bei der Aufkonzentrierung geernteter Kultur mittels Tellerseparator.

Aus den durchgeführten Kultivierungen wurde frisches Probenmaterial gewonnen und regelmäßig für Aufschlussversuche an den Projektpartner INP übersendet. Im Jahr 2020 wurden im Rahmen des

Projekts insgesamt 14 Lieferungen von Algenbiomasseproben des IGV an den Projektpartner INP übersendet. Bis zum Projektende erfolgten insgesamt 22 Lieferungen von *Cyanidium*-Material an den Projektpartner INP in Form von Kultur, aufkonzentrierter Suspension vitaler Zellen sowie gefrostedem Konzentrat.

Es wurde die Möglichkeit einer Wachstumssteigerung durch mixotrophe Kultivierung unter Zugabe von Glucose experimentell getestet. Das Wachstum konnte dabei deutlich gesteigert werden. Im Laborversuch wurde durch Zugabe von 1 % Glucose zur Nährlösung ein Algenwachstum von 0,47 g/Ld gemessen. Das ist mehr als doppelt so schnell wie das schnellste im Projekt gemessene photoautotrophe Wachstum einer Kultur von *Cyanidium*. Die dabei erhaltene Biomasse zeigte jedoch unter dem Mikroskop auffällige morphologische Veränderungen sowie einen veränderten Farbton (Abbildung 8 und 9). Um Kontaminationen mit anderen heterotrophen oder mixotrophen Mikroorganismen zu vermeiden, wurden Mixotrophieversuche steril und zudem bei niedrigem pH und hoher Temperatur durchgeführt. Die verwendete Nährlösung wurde mit Schwefelsäure auf einen initialen pH von 1,5 eingestellt, der im Kultivierungsverlauf auf 1,0 sank. Die Kultivierung erfolgte bei 40 °C und durchgehender Beleuchtung mit Leuchtstoffröhren zu 180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ an der Kulturoberfläche.



Abbildung 8: Farbunterschied durch geringeren Chlorophyllgehalt mixotropher *Cyanidium*kultur (rechts) gegenüber photoautotropher *Cyanidium*kultur (links)

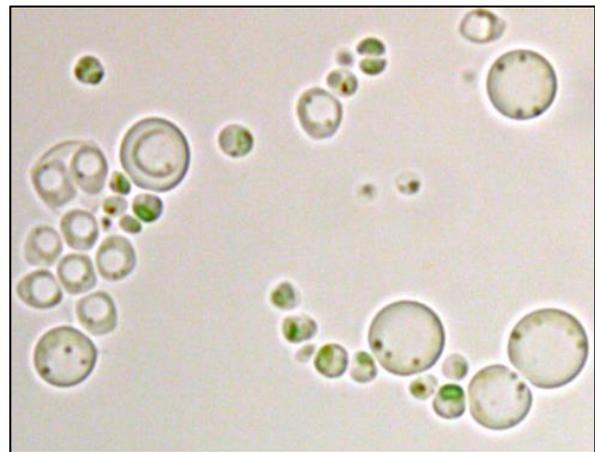


Abbildung 9: Hellfeldmikroskopische Aufnahme von mixotroph 40 °C kultivierter *Cyanidium*kultur (phototrophe Kultur zum Vergleich in Abbildung 2).

Analysen der erhatenen Biomasse zeigten leider einen geringen Gehalt des Zielwertstoffs 4-Aminobuttersäure (GABA), einen generell geringeren Proteingehalt (Tabelle 1-3), einen sehr geringen Chlorophyllgehalt sowie einen stark erhöhten Polysaccharidgehalt. Die Biomassequalität wurde vom IGV als ungeeignet für die Herstellung des aktuellen Zielextraktes Tego® Stemplastin befunden. Von mixotropher Kultivierung wurde im weiteren Projektverlauf daher abgesehen, sie kann jedoch für zukünftige andere Extrakte von wirtschaftlichem Nutzen sein.

In einem Langzeitkultivierungsversuch wurde die mit der verwendeten Nährlösung maximal in Röhrenphotobioreaktoren erreichbare Erntetrockenmassekonzentration bestimmt. Es wurde eine Endkonzentration von 11 g/L in der stationären Phase erreicht (Abbildung 10). Vergleichbar hohe Werte werden mit anderen Algen bei rein phototropher Kultivierung nur selten erreicht. Da oberhalb von 8 g/L ein deutliches Abflachen der Wachstumskurve beobachtetet wurde, ist dieser Bereich für die industrielle Produktion von *Cyanidium* voraussichtlich nicht nutzbar. Bei passendem pH von 1,2 liefern

Kultivierungen kontaminationsfrei über eine Dauer von bis zu 11 Monaten im selben Reaktor ohne Zwischenreinigung des Reaktors. Bei keinem Versuch traten Biomasseimmobilisierungen an Glasbauteilen auf, die bei vielen anderen Algen engere Reinigungszyklen der Reaktoren und eine hohe Pumpenleistung erfordern. Auf den bei anderen Algen üblichen Einsatz von Kunststoffgranulat zum mechanischen Abrieb der Rohrrinnenseiten während der Kultivierung konnte verzichtet werden.

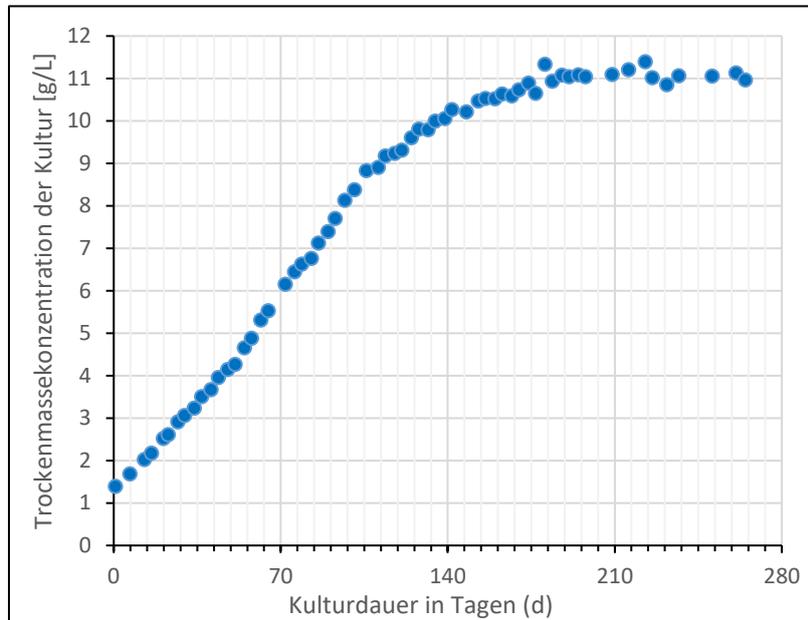


Abbildung 10: Langzeitkultivierung von *Cyanidium caldarium*. Es wurde eine maximale Trockenmassekonzentration von 11 g/L erreicht bevor die Kultur in eine mikrobiell stabile stationäre Phase eintrat. Einziger Mediumbestandteil der während der Kultivierung zugegeben wurde ist Ammoniumsulfat, Volumenverluste aufgrund von Verdunstung und Probenentnahme wurden durch Frischwasserzugabe ausgeglichen. Der Versuch erfolgte im 100L-Maßstab. Die elektrische Leitfähigkeit der Kultur stieg proportional zum Wachstum der Kultur von 9,5 auf 24 mS/cm.

Aus dem 100 Liter-Maßstab erfolgte am IGV die schrittweise Aufskalierung der Kultivierung in den 250 Liter-Maßstab und weiter in den 1500 Liter-Maßstab (Abbildung 11). Kultur aus dem 1500 Liter-Maßstab wurde schließlich zur Inokulation eines größeren industriellen Glasröhrenphotobioreaktors bei einem Zulieferbetrieb der IGV GmbH verwendet.



Abbildung 11: Photobioreaktoren der IGV GmbH, die für das Projekt PALEA zur weiteren Aufskalierung der Kultivierung von *Cyanidium caldarium* eingesetzt wurden: 250 Liter-Röhrenreaktor (links) und 1500 Liter-Röhrenreaktor (rechts).

Cyanidium tolerierte während Sommerkultivierungen im 250 Liter-Maßstab am Mittag gemessene Spitzentemperaturen der Zellsuspension von 45 °C ohne Schädigung der Kultur. Im Gegensatz zu anderen Algen konnte im 1500 Liter-Maßstab auf den Einsatz einer aktiven Wasserkühlung sowie auf Beschattung zur Kühlung weitgehend verzichtet werden. Unterschreitungen des

Temperaturtoleranzbereichs nachts und bei kühler Witterung konnten in diesem Maßstab leider aus technischen Gründen ungenügend kompensiert werden. Zusammen mit der geringeren Lichtverfügbarkeit im verwendeten 1500 Liter-Reaktor führte dies zu deutlich verlangsamtem Wachstum beim Aufskalieren in den 1500 Liter-Maßstab (Vergleich Abbildung 12 und 13). Die elektrische Leitfähigkeit geernteter *Cyanidium*-Kultur in diesem Maßstab lag vor dem Separieren bei 9,7 mS/cm (Endpunkt blaue Kurve in Abbildung 13) und nach dem Separieren bei 1,6 mS/cm im frischen Konzentrat.

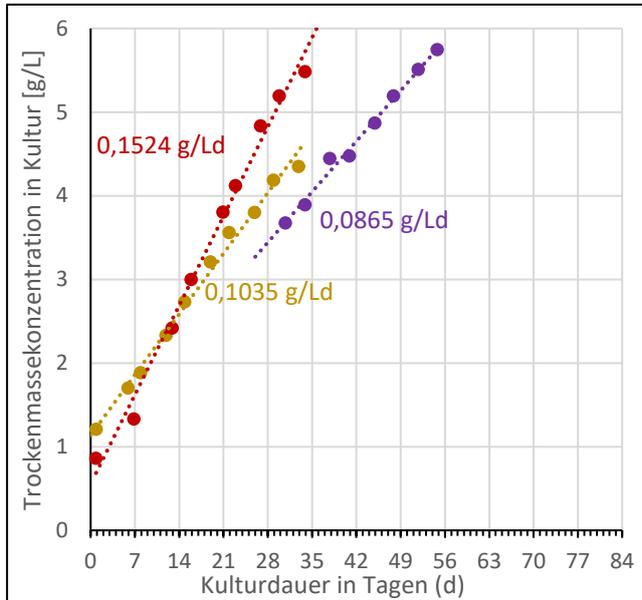


Abbildung 12: Kultivierungen von *Cyanidium caldarium* im 250-Liter-Maßstab unter Witterungseinfluss in einem Gewächshaus zwischen Mai und Juni. Dank guter technischer Möglichkeiten zur Regulierung wichtiger Prozessparameter war das Wachstum im 250 Liter-Maßstab generell vergleichbar mit dem Wachstum im 100 Liter-Maßstab.

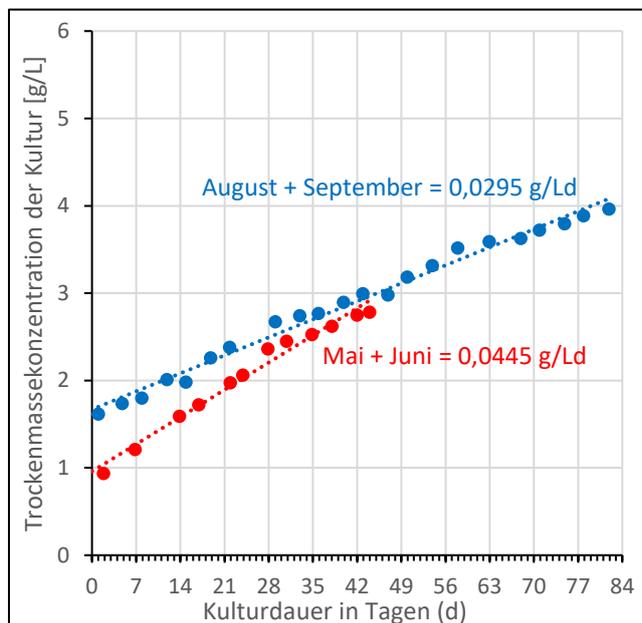


Abbildung 13: Kultivierungen von *Cyanidium caldarium* im 1500-Liter-Maßstab unter Witterungseinfluss in einem Gewächshaus. Obwohl klimatisch passende Monate für die Kultivierungen ausgewählt wurden (Jahreszeiteinfluss in Abbildung 6) war das Wachstum deutlich langsamer als bei Versuchen in kleinem Maßstab. Ursache war der geringere Lichteintrag in den genutzten Reaktor (dickere Glasrohre, Beschattung durch Bäume) sowie eine zu niedrige Kulturtemperatur mit starken tageszeitlichen Schwankungen.

Lebendkultur aus dem 1500 L Maßstab wurde vom IGV-Standort Nuthetal an einen deutschen Zulieferbetrieb der IGV GmbH im Rahmen einer Auftragskultivierung übergeben und im industriellen Maßstab unter vom IGV vorgegebenen Kultivierungsbedingungen weiterkultiviert. Durch den

Zulieferbetrieb wurde mit dünneren Glasröhrenphotobioreaktoren in einem Gewächshaus ein Wachstum von bis zu 0,1 g/Ld erzielt (Abbildung 14). Gefrostenes *Cyanidium*-Konzentrat wurde vom Zulieferbetrieb an die IGV GmbH übergeben.

Für Plasmabehandlungsversuche wurde *Cyanidium*-Konzentrat des Zulieferbetriebs sowie aus IGV-eigener Produktion eingesetzt, das zur besseren Vergleichbarkeit vor der Plasmabehandlung auf eine konstante Trockenmassekonzentration von 10 % eingestellt wurde. Mit einem vom INP ans IGV übergebenen 1L-Plasmabehandlungsgerät wurden am IGV mehrere Behandlungsversuche unter reproduzierbaren Versuchsbedingungen durchgeführt, nachdem IGV-Mitarbeiter durch das INP in die Bedienung des Plasmabehandlungsgeräts eingewiesen wurden.

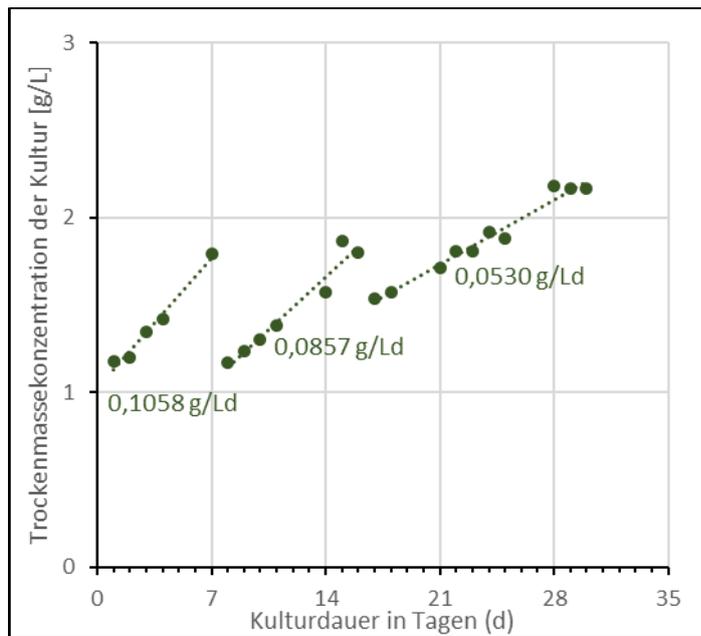


Abbildung 14: Wachstum von *Cyanidium caldarium* in einem Glasröhrenreaktor eines IGV-Zulieferbetriebs im industriellen Maßstab. Die Inokulation erfolgte mit Kultur aus dem 1500 Liter-Maßstab.

AP 4 IGV: Extraktionsversuche zur Gewinnung der favorisierten Wirkstoffe (1L-Maßstab)

Die kleinzellige, 1-3 µm große Mikroalge *Cyanidium caldarium* besitzt zum Schutz ihrer Zellinhaltsstoffe sehr robuste, stabile Zellwände. Zur Gewinnung ihrer intrazellulären bioaktiven Wirkstoffe wird deshalb im ersten Verfahrensschritt ein Zellaufschlussverfahren angewendet. Das angestrebte Ziel der Aufschlusstechnik ist, die Zellwände möglichst ohne Schädigung der spezifizierten Leitsubstanzen zu desintegrieren. Im etablierten Verfahren zur Herstellung von Markenprodukt Tego®Stemlastin wird dies durch einen kombinierten mechanisch / biologischen Zellaufschluss bewirkt.

Die aufkonzentrierte Biomasse wird nach der Ernte tiefgefroren und vor der Extraktion wieder aufgetaut. Durch den Prozess des Einfrierens und Auftauens (Gefrier/Tau = GT) werden die Zellen durch Ausbildung von Eiskristallen und der damit verbundenen Volumenvergrößerung des Wassers mechanisch aufgeschlossen. Diesem mechanischen Aufschlussprozess schließt sich ein enzymatischer Aufschluss (EA) der Zellwand an. Enzymatische Verfahren sind die schonendsten Methoden zum Aufschluss von Algenzellwänden, da sie selektiv angreifen können, Zellwandmoleküle abbauen und gewünschte Substanzen freisetzen.

In AP4 wurde zur definierten Wirkstoffgewinnung ein vereinfachtes Labor-Extraktionsverfahren (1L - Extraktionsversuch) eingesetzt, welches an die Extraktionstechnologie zur Herstellung von Tego-Stemlastin angepasst ist. In Tabelle 5 sind die durchgeführten Versuche inklusive der einzelnen Verfahrensschritte zusammengestellt, Herstellungsprotokolle mit detaillierten Parameter-Angaben liegen im IGV zur Einsicht vor.

Tabelle 5: Zusammenstellung der Verfahrensschritte der Extraktionsversuche AP4.

Versuch	Verfahrensschritte					
	Aufschlussverfahren				Extraktion	
	Gefrier/Tau	Plasma aufschluss	Gefrier/Tau	Enzym aufschluss	Heißwasser extraktion	Zentri - fugation
1	-	-	x	x	x	x
2	-	-	-	x	x	x
3 Ü	-	x	-	-	-	x
4 Ü	-	x	-	-	-	x
5	-	x	x	-	x	x
6	-	x	-	x	x	x
7	-	-	-	-	x	x
8*	-	x	-	-	x	x
8A*	-	x	-	-	x	x
9	x	x	-	-	x	x
10	x	x	-	x	x	x

* technische Probleme beim Plasmaaufschluss

Das anvisierte Ziel der aufgeführten 1L-Extraktionsversuche war, die Wirksamkeit des Plasmaverfahrens (PA) bezüglich der Freisetzung der ausgelobten Leitsubstanzen im Vergleich

- zu unaufgeschlossener Biomasse,
- zum Originalverfahren,
- zu den Einzelschritten wie Gefrier/Tau und Enzymbehandlung sowie
- additiv zu den vorhandenen Techniken

darzustellen. Dazu wurde wie beschrieben, aus den durchgeführten Kultivierungen vitale Biomasse gewonnen, diese regelmäßig für Aufschlussversuche an den Projektpartner INP versendet und parallel als Vergleichsbiomasse in den Extraktionsversuchen im IGV verwendet. Die Proben wurden nach der Behandlung im Laborreaktor am INP per Express verschickt und am IGV sofort entsprechend dem Versuchsprogramm in Tabelle 5 bearbeitet.

Nach der Desintegration der Zellwände durch das jeweilige Aufschlussverfahren erfolgt im zweiten Verfahrensschritt die Extraktion der anvisierten Zielmoleküle/Leitsubstanzen durch eine Heißwasserextraktion im vorgegebenen Zeitregime: die 10%ige vorbehandelte Biomasse-Suspension wurde auf eine bestimmte Temperatur erhitzt und eine definierte Zeitdauer unter ständigem Rühren extrahiert. Bei Temperaturen > 80°C werden infolge intensiver Extraktion durch das Lösungsmittel Wasser die hochwirksamen biologisch aktiven hydrophilen Inhaltsstoffe aus der Algenzelle herausgelöst. Durch ein Separationsverfahren wird der wirkstoffangereicherte Rohextrakt von der extrahierten Biomasse getrennt. In diesem Rohextrakt erfolgte die Bestimmung von

Extraktparametern wie Trockenmasse (TM) und pH-Wert sowie auch die Analyse der Leitsubstanzen. In nachfolgenden Versuchen wurden in enger Zusammenarbeit mit dem INP verschiedene Parameter des Plasmaaufschlusses variiert und deren Einfluss auf die Aufschlussgrad und die Freisetzung der Leitsubstanzen im Algenextrakt untersucht. Im Rahmen der Optimierungsversuche erfolgten Untersuchungen zur Variation der Funkenfrequenz, des Behandlungsvolumens, der Durchflussrate und der Behandlungsdauer mittels Plasma (siehe Abbildungen 24 bis 35).

AP 5 IGV: Charakterisierung der Wirkstoffextrakte (chemisch-analytisch)

Derzeit spezifizierte wertgebende Parameter und Leitsubstanzen des Mikroalgenextraktes sind die Extrakt-Trockenmasse, Protein, Gamma-Aminobuttersäure (GABA) sowie Polyphenole (PP). Diese Parameter/Leitsubstanzen wurden quantitativ in allen resultierenden Rohextrakten analysiert und in nachfolgenden Abbildungen sowie den Anlagen 1 und 2 dargestellt. Sie dienen als Diskussionsgrundlage für die Bewertung der Effizienz der im Laborreaktor am INP getesteten neuen Aufschlusstechnik. Die Prüfberichte zu allen Analysen liegen im IGV vor. In ausgewählten Extrakten wurden kosmetisch relevante Vitamine, bioaktive Zucker sowie freie Aminosäuren analysiert. Die Molekularcharakteristik von Proteinen erfolgte mittels Proteomics-Technik.

AP 6/9 IGV: Charakterisierung der Wirkstoffextrakte (Bioaktive Wirkung/Mikrobiologie)

Die hergestellten Wirkstoffextrakte wurden mikrobiologisch untersucht und nach den Richtlinien der EU Kosmetikverordnung Nr. 1223/2009 bewertet. Es wurden Spezifikationen erstellt, in denen Grenzwerte für die Gesamtkeimzahl, Hefen und Schimmelpilze sowie für spezifische Keime festgelegt sind. Die Bewertung der mikrobiologischen Stabilität der mittels Plasmaaufschluss gewonnenen Algenextrakte erfolgte im institutseigenen mikrobiologischen Prüflabor mittels Konservierungsmittelbelastungstest nach DIN EN ISO 11930.

Die bioaktive Wirkung der mittels Plasmaaufschluss hergestellten Algenextrakte wurde mit verschiedenen biologisch-chemischen Testmodellen wie Zellkultur-Bestrahlungsmodell, Kollagen-Assay, Tyrosinase-Test sowie durch Messung der antioxidativen Aktivität untersucht.

In einem *in vitro*-Zellmodell mit UV-bestrahlten humanen Fibroblasten (NHDF-Zellen) wurde der Einfluss der Algenextrakte auf die Zellvitalität unter UVA-Bestrahlung untersucht und mittels einer Farbreaktion im MTT-Test bewertet. Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Als Strahlungsquelle diente das UV/PUVA 180 Bestrahlungsgerät der Firma Waldmann Lichttechnik (Villingen/Schwenningen). Durch die Bestrahlung der Hautzellen mit UVA-Licht wurden zunächst gezielt Schäden gesetzt, um im Anschluss den Einfluss der Algenextrakte auf die Stoffwechselaktivität bestrahlter Fibroblastenzellen zu prüfen. Die Abbildungen 41 und 42 enthalten die Ergebnisse.

Die menschliche Haut besteht zu 75 % aus dem Strukturprotein Kollagen, welches der Haut Festigkeit und Elastizität verleiht. In alternder Haut wird zum einen weniger Kollagen synthetisiert und zum anderen Kollagen verstärkt abgebaut. Wirkstoffe, die die Kollagensynthese stimulieren, fördern die Restrukturierung und Regeneration der Haut. Mittels des Sircol Collagen Assays (Bicolor, Belfast) wurde der Einfluss von *Cyanidium* Algenextrakt auf die Kollagenbildung in normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 und 44 dargestellt.

Wirkstoffe, die nachweislich die Bildung des braunen Farbstoffes Melanin in der Haut hemmen mit dem Ziel einen hellen ebenmäßigen Teint zu erreichen oder Pigmentstörungen und Altersflecken zu vermeiden sind von kosmetischem Interesse. Die chemische Reaktion zur Bildung von Melanin (Melanogenese) beginnt mit der Aktivierung des Schlüsselenzyms, der Tyrosinase, durch UV-Strahlen. Das Enzym Tyrosinase katalysiert die Umsetzungen von Tyrosin zu Dopachrom. Eine Enzyminhibierung und damit eine Hemmung der Melaninbildung wird durch eine verminderte Dopachrom-Bildung im Tyrosinase-Test photometrisch messbar. Die Ergebnisse zum Einfluss von plasmabasierten *Cyanidium* Extrakten auf die Tyrosinaseaktivität sind in Abbildung 45 dargestellt.

AP 8 IGV: Verfahrensoptimierung und Scale-up: Extraktion nach Plasma-Aufschluss im 10 L Maßstab

Das im IGV etablierte Originalverfahren zur Herstellung des Markenproduktes mittels Heißwasserextraktion von *Cyanidium* Algenbiomasse wurde mit einem zusätzlich vorgeschalteten Schritt des Plasmaaufschlusses von Algenbiomasse versehen und im kleintechnischen Maßstab durchgeführt (siehe Flow-Chart, Anlage 4). Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 enthalten. Durchgeführt wurde der Plasmaaufschluss im 5L-Reaktor.

AP 10 IGV: Erstellung von Verfahrens- und Produktdokumentationen

Im Rahmen des Projektes wurde ein effizientes Verfahren zum schonenden Aufschluss von Mikroalgenbiomasse mittels Atmosphärendruckplasma in Kombination mit anschließender Extraktion, Aufarbeitung und Gewinnung bioaktiver Algenwirkstoffe erarbeitet (Flow-Chart Anlage 4). Es wurden umfangreiche Verfahrensdokumentationen, Fließbilder, Spezifikationen und chargenbezogene Analysenzertifikate zum entwickelten Verfahren mittels Plasmaaufschluss erstellt, die im IGV zur Einsicht vorliegen.

AP 11 IGV/INP: Dokumentation und Präsentation der Ergebnisse

In enger Kooperation mit dem Projektpartner wurden die Projektergebnisse in fünf Online Meetings präsentiert und diskutiert. Die gewonnenen Erkenntnisse und Daten wurden in einem Zwischenbericht sowie dem Abschlussbericht zusammengefasst, dargestellt und bewertet.

Ergebnisse IGV

In enger Kooperation mit dem Projektpartner wurden die Projektergebnisse in fünf Online Meetings präsentiert und diskutiert. Die gewonnenen Erkenntnisse und Daten wurden in einem Zwischenbericht sowie dem Abschlussbericht zusammengefasst, dargestellt und bewertet.

Tabelle 6: Analysenergebnisse zu Leitsubstanzen der Extraktionsversuche AP4.

Probe	Analysierte Parameter/Leitsubstanzen im Extrakt						
	TM g/100ml	Polyphenole mg/100ml % i.TM		GABA mg/100ml % i.TM		Protein mg/100ml % i.TM	
1	1,88	23,7	1,26	53,4	2,84	652	34,68
2	2,01	32,3	1,61	29,6	1,47	823	40,94
3 Ü	0,35	2,7	0,77	3,91	1,10	70	20,00
4 Ü	0,04	0,5	1,25	-	-	17	42,50 ?
5	1,60	23,9	1,49	28,5	1,78	598	37,80
6	2,10	34,9	1,66	22,4	1,07	867	41,29
7	1,38	14,5	1,05	19,5	1,41	443	32,10
8*	2,04	24,1	1,19	44,4	2,18	692	33,92
8A*	1,95	21,8	1,12	41,3	2,12	642	32,92
9	1,80	15,8	0,88	41,2	2,29	470	26,11
10	2,22	39,0	1,76	47,1	2,12	1080	48,65

* technische Probleme beim Plasmaaufschluss

TM: Trockenmasse

GABA: Gamma-Aminobuttersäure

Probe 1,2,5,6: Cyanidium-Suspension 10%ig in Nährlösung

Probe 3 Ü: Cyanidium-Suspension 10%ig in Nährlösung, Überstand

Probe 4 Ü: Cyanidium-Suspension 10%ig in Aqua dest., Überstand

Zunächst wurde die Wirksamkeit des Plasmaverfahrens zum Aufschluss der *Cyanidium* Zellen im Vergleich zu nach Originaltechnologie aufgeschlossener und zu nicht aufgeschlossener Biomasse evaluiert.

Versuch 7: **Basisversuch** ohne Aufschluss der Biomasse

Versuch 1: **Gefrier/Tau + enzymatischer Aufschluss (GT/EA)**

Versuch 8: **Plasmaaufschluss (PA)**

Dazu werden die im Extrakt erzielten Trockenmassen, die Gehalte an Protein, Gamma-Aminobuttersäure sowie von Polyphenolen verglichen. In Tabelle 7 sind zudem die Steigerungsraten der Leitsubstanzen und der Trockenmasse des durch Plasma bewirkten Aufschlusses im Vergleich zum Basisversuch und gegenüber dem Originalverfahren zusammengestellt.

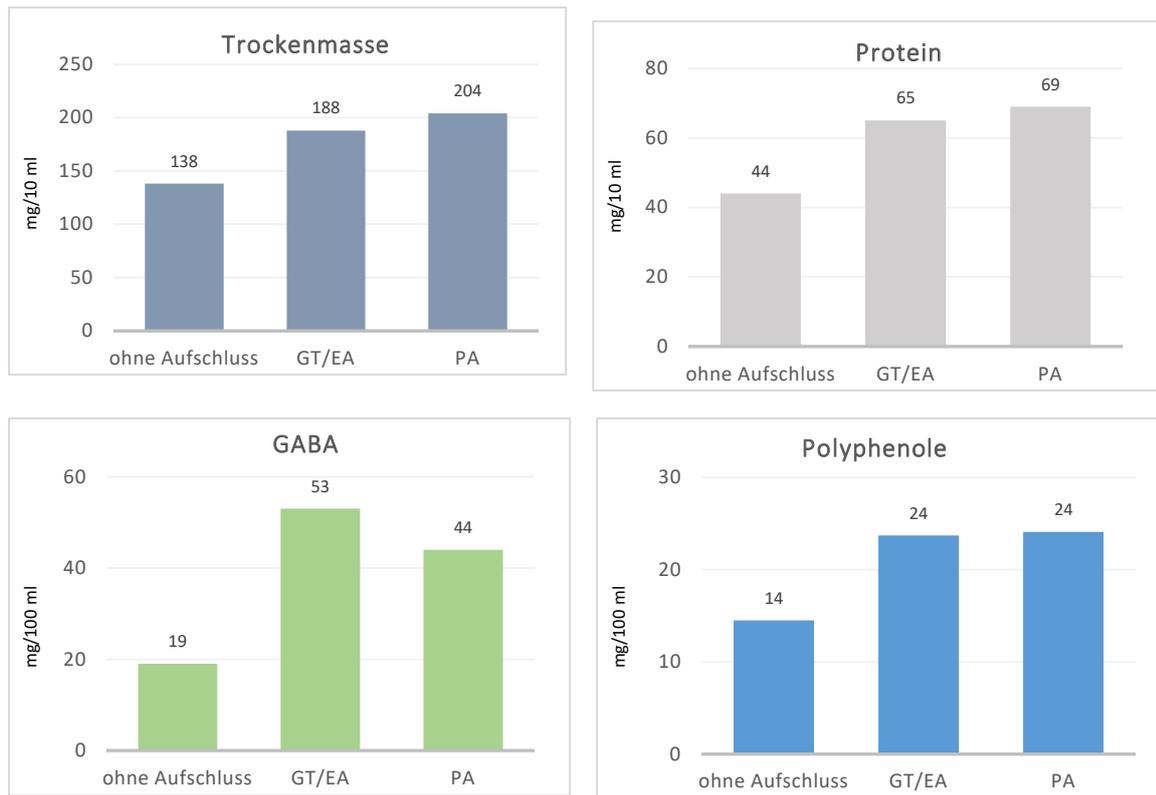


Abbildung 15-18: Vergleich der *Cyanidium*-Extraktgehalte von Trockenmasse, Protein, GABA und Polyphenolen ohne Aufschluss, nach Originalaufschluss (GT/EA) und nach Plasmaaufschluss (PA).

Tabelle 7: Steigerungsraten im Extraktionsergebnis Versuch 8 zu Versuch 7 und 1.

Parameter	Steigerungsraten im Extraktionsergebnis nach Plasmaaufschluss in %	
	PA : Basisversuch	PA : GT/EA (Original)
Trockenmasse	48	12
Polyphenole	71	3
GABA	132	0
Protein	57	9

Es ist ersichtlich, dass der Plasmaaufschluss eine signifikante Steigerung des Extraktionsergebnisses bezüglich der geprüften Leitsubstanzen im Vergleich zur Extraktion unaufgeschlossener Biomasse erzielt. Zudem wurde festgestellt, dass der Plasmaaufschluss unterschiedlich auf die Freisetzung von Protein, GABA und Polyphenolen wirkt.

Im Vergleich zum Originalverfahren konnte durch den Labor-Plasmaaufschluss eine Steigerung der Trockenmasse von 12% und von Protein um 9% verzeichnet werden. Insbesondere die Erhöhung der Extrakt-Trockenmasse steht im Fokus der angestrebten Verfahrensentwicklung. Der in der Produktspezifikation des Markenproduktes festgelegte Wert von >2,9% wird im Originalverfahren durch einen zusätzlichen energieintensiven Aufkonzentrierungsschritt nach der Heißwasserextraktion erzielt. Eine Erhöhung der Trockenmasse um 12% ist deshalb ein erfolgversprechender Ausgangswert für weitere Optimierungsversuche.

In weiteren Versuchen wurde die Wirkung des Plasmaaufschlusses in Kombination mit den Aufschlusstechniken Gefrier/Tau und dem enzymatischen Aufschluss ermittelt. Die Analyseergebnisse dieser Versuche 6 (PA/EA) und 10 (GT/PA/EA) sind wieder im Vergleich mit

Versuch 1 (GT/EA) in Abbildung 19-22 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass der Plasmaaufschluss insbesondere in Kombination mit den aufgeführten Techniken eine Steigerung von Trockenmasse, Polyphenolen und Protein im Vergleich zum Originalverfahren erzielt.

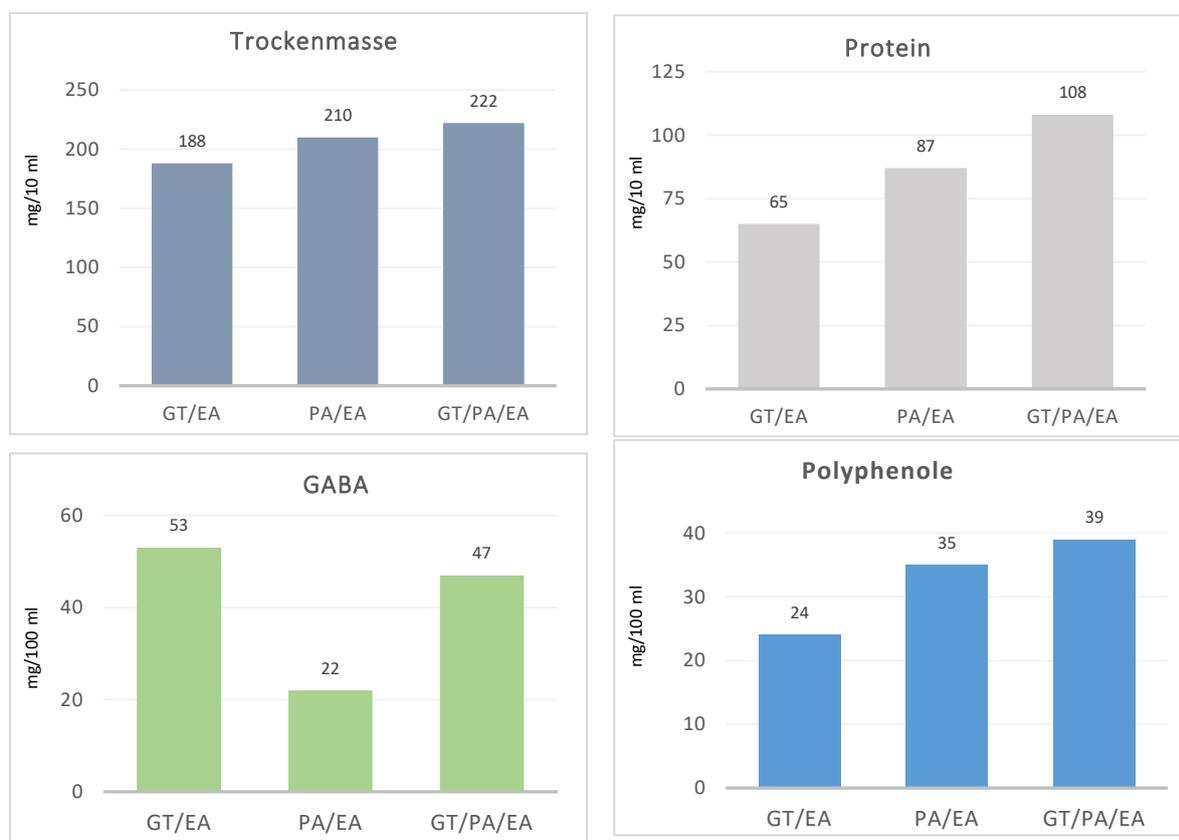


Abbildung 19-22: Vergleich der *Cyanidium*-Extraktparameter: Trockenmasse, Protein, GABA und Polyphenole nach Originalaufschluss, nach PA + EA, sowie nach GT+PA+EA.

Wird der Plasmaaufschluss als additiver Aufschluss zum Originalverfahren eingefügt (Vers. 10) sind folgende Effekte zu verzeichnen:

Tabelle 8: Steigerungsraten im Extraktionsergebnis Versuch 10 (Plasmaaufschluss) zu Versuch 1 (Originalverfahren).

Parameter	Steigerungsraten im Extraktionsergebnis in % GT/PA/EA zu GT/EA
Trockenmasse	18
Polyphenole	63
GABA	0
Protein	49

In Abbildung 23 ist das Extraktionsergebnis der Versuche 1, 6 und 10 bezogen auf die Anteile der Leitsubstanzen in der Extrakt-Trockenmasse dargestellt. Es ist ersichtlich, dass der Plasmaaufschluss nicht gleichmäßig auf die Freisetzung von Protein, GABA und Polyphenole wirkt. Eine Steigerung der Trockenmasse im Extrakt zieht nicht gleichzeitig die Erhöhung der Leitsubstanzen in entsprechender Relation nach sich. Durch Anwendung eines vorgeschalteten Gefrier-Tau-Schrittes im Verfahren konnten die Extrakt-Trockenmasse um 5,7 % sowie die Leitsubstanzen im Extrakt um 6 % bis 98 % erhöht werden.

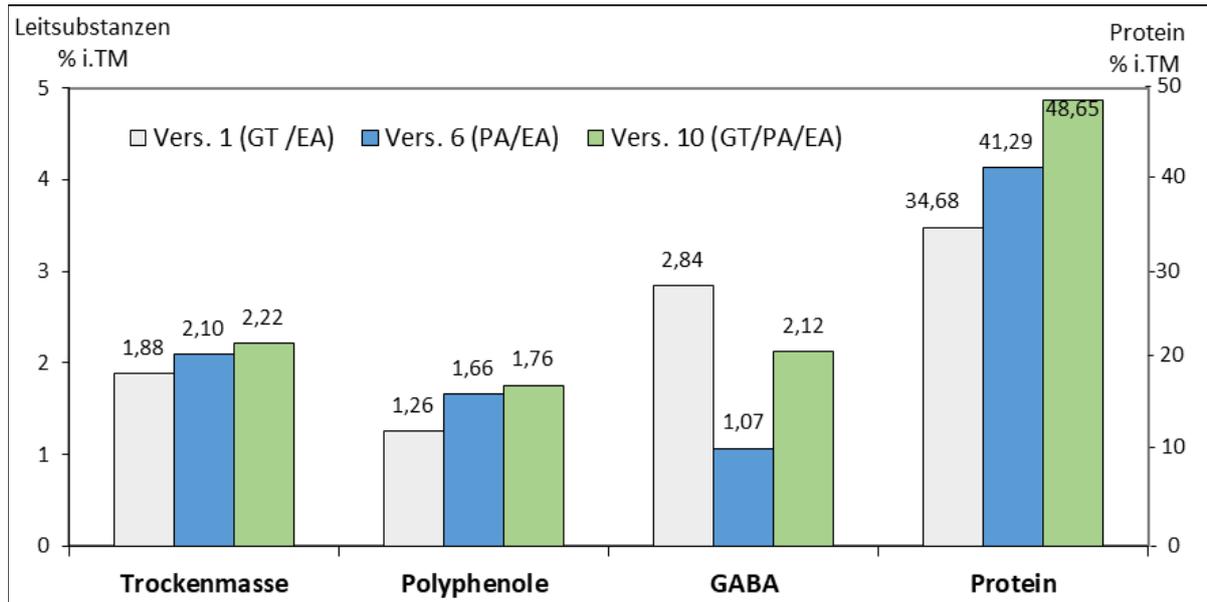


Abbildung 23: Einfluss des Aufschlussverfahrens auf die Extrakt-Trockenmasse und den Gehalt an Leitsubstanzen im *Cyanidium* Algenextrakt.

Im Rahmen von Optimierungsversuchen erfolgten Untersuchungen zur Variation der Funkenfrequenz, des Behandlungsvolumens, der Durchflussrate und der Behandlungsdauer mittels Plasma. Die Ergebnisse des Laborverfahrens werden im Folgenden in den Abbildungen 24 bis 35 dargestellt und bewertet.

Die Daten zur **Variation der Funkenfrequenz** sind in Anlage 1 enthalten. Der Plasmaaufschluss wurde vom Projektpartner INP bei den Frequenzen 11 und 20 Hertz durchgeführt. In Abbildung 24 bis 27 sind die Ergebnisse zum Einfluss der Frequenz auf die Extrakt-Trockenmasse und den Gehalt an Leitsubstanzen (Protein, GABA, Polyphenole) im Algenextrakt graphisch dargestellt.

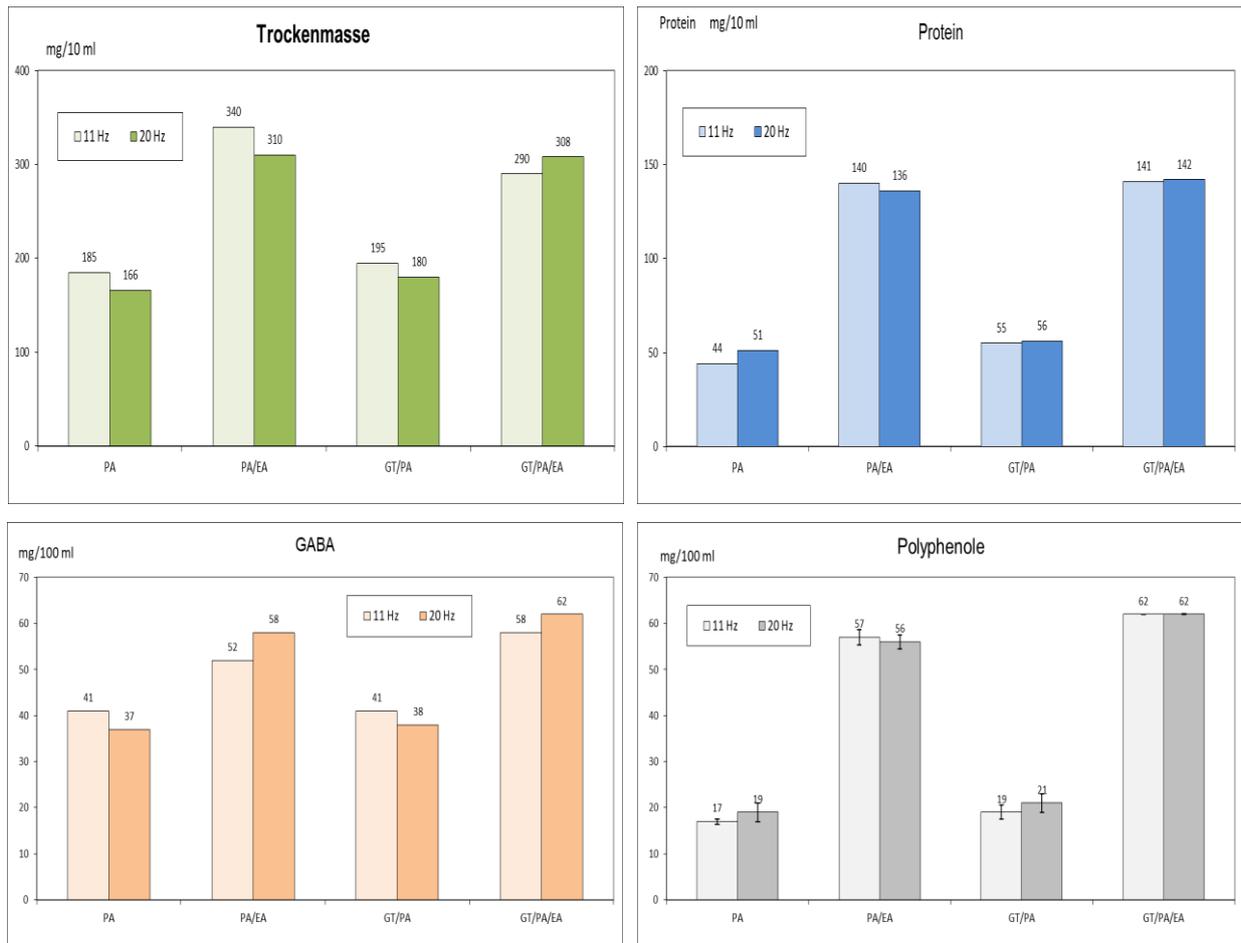


Abbildung 24-27: Einfluss der Frequenz auf die Extrakt-Trockenmasse und den Gehalt an Leitsubstanzen Im *Cyanidium*-Algenextrakt.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei den Frequenzen von 11 und 20 Hertz bei allen untersuchten Extraktionsvarianten PA, PA/EA, GT/PA und GT/PA/EA keine wesentlichen Unterschiede in den Gehalten an Leitsubstanzen festgestellt werden kann. Da die Pulsfrequenz 11 Hz im Vergleich zu 20 Hz geringfügig bessere Ergebnisse zeigte, wurde bei allen nachfolgenden Versuchen mit 11 Hz gearbeitet. Die Bewertung zur Effizienz des Plasmaaufschlusses ergab, dass eine Kombination von Plasmaaufschluss und enzymatischem Aufschluss die besten Effekte bei der Freisetzung der Leitsubstanzen erzielt. Dabei hat die Kombination von Plasmaaufschluss mit einem vorgeschalteten Gefrier-Tau-Schritt (GT) einen positiven Einfluss auf das Extraktionsergebnis. Durch Behandlung der Algenbiomasse mittels Gefrier-Tau-Schritt konnten sowohl die Extrakt-Trockenmasse als auch die Leitsubstanzen im Extrakt zwischen 4% und 25% erhöht werden. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde die Algenbiomasse in nachfolgenden Versuchen entsprechend dem Originalverfahren im Frost gelagert und einer Präparation mittels Gefrier-Tau unterzogen.

Die Verfahrensschritte und Analysenergebnisse zur **Variation des Behandlungsvolumens** sind in Anlage 1 enthalten. Der Plasmaaufschluss wurde vom Projektpartner im Laborversuch unter Einsatz verschiedener Volumina an Algensuspension bei einer gleichbleibenden Durchflussrate von 300 ml/min durchgeführt. Die Abbildungen 28 bis 31 enthalten die graphische Darstellung der Ergebnisse zum Einfluss des Behandlungsvolumens von 300 ml, 600 ml und 1000 ml Algensuspension auf die Extraktausbeute (TM) und den Gehalt an Leitsubstanzen im Algenextrakt.

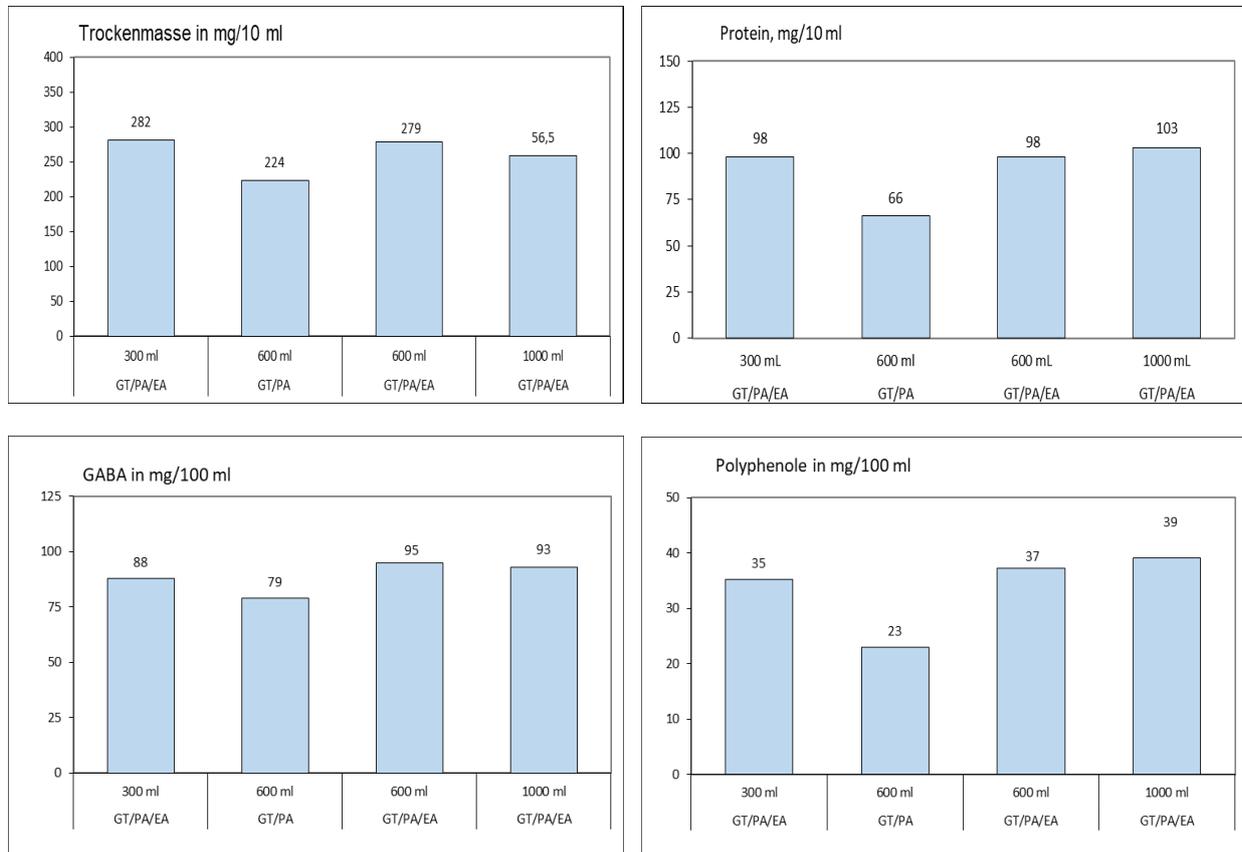


Abbildung 28-31: Einfluss des Behandlungsvolumens auf die Extrakt-Trockenmasse und den Gehalt an Leitsubstanzen im Algenextrakt.

Aus der Graphik wird deutlich, dass das Volumen der eingesetzten Algensuspension einen geringfügigen Einfluss auf den Aufschlussgrad und die Freisetzung der untersuchten Leitsubstanzen im Extrakt aufweist. Es ist ein minimaler Anstieg von 5% bis 8% hinsichtlich der Gehalte an Protein, GABA und Polyphenolen im Vergleich von 300 ml zu 1000 ml Behandlungsvolumen zu verzeichnen. Nachfolgende Versuche wurden mit einem Behandlungsvolumen von 500 ml und/oder 1000 ml Algensuspension durchgeführt. Dieses Ergebnis stellt einen positiven Aspekt für die spätere Automatisierung der Prozesse dar.

Die Analyseergebnisse zur **Variation der Durchflussrate** bei gleichbleibendem Volumen sind in Anlage 2 enthalten. Der Plasmaaufschluss wurde vom Projektpartner im 1L-Reaktor mit einem Durchflussvolumen an Algensuspension von 300 ml/min, 600 ml/min und 1000 ml/min durchgeführt. In Abbildung 32 bis 35 sind die Ergebnisse der analysierten Leitsubstanzen im Extrakt im Vergleich zum Basisversuch ohne Aufschluss sowie im Vergleich zum Originalverfahren mit Enzymaufschluss graphisch dargestellt. Ein Gefrier-Tau-Schritt wurde bei allen Versuchsreihen vorgeschaltet.

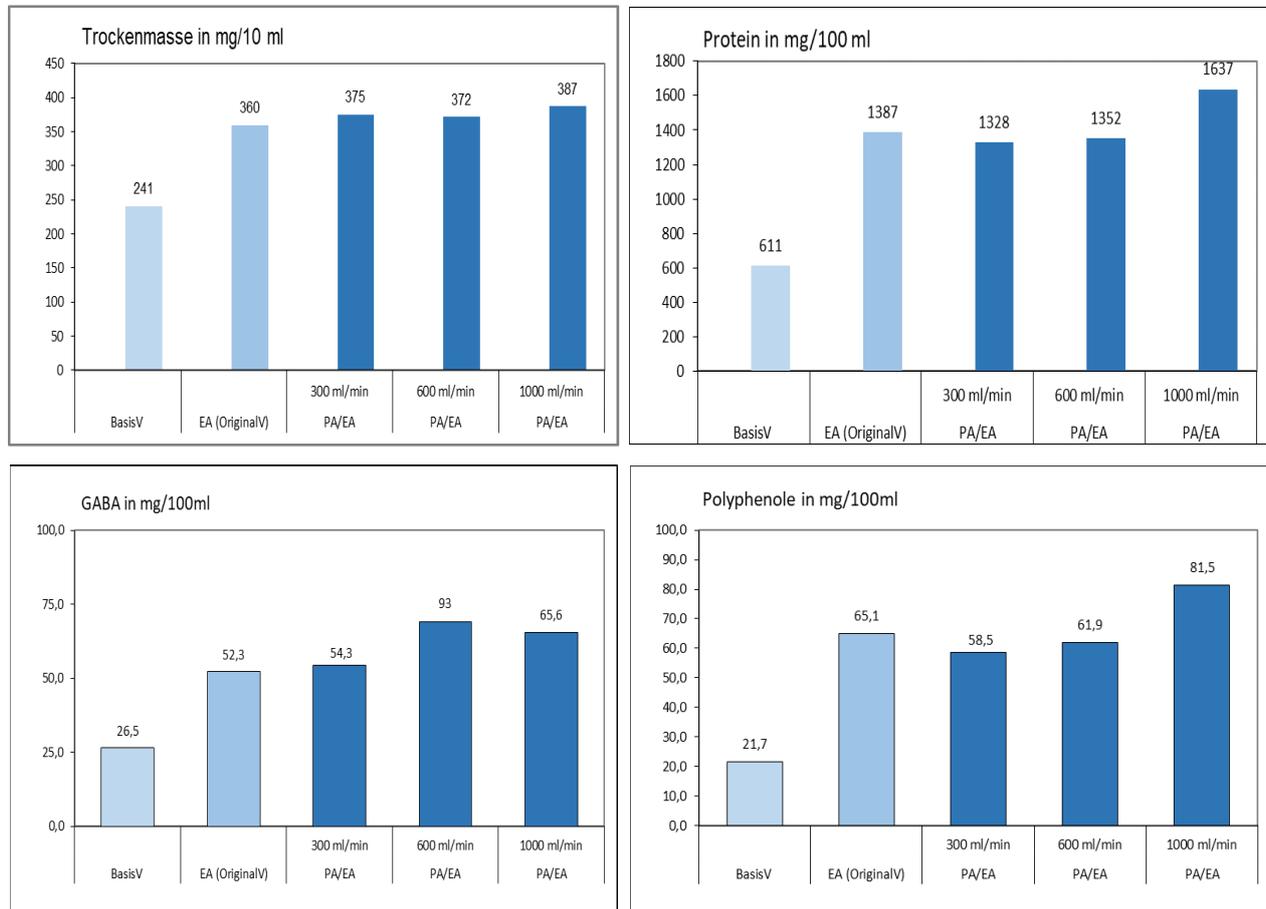


Abbildung 32-35: Einfluss der Durchflussrate auf die Extrakt-Trockenmasse und den Gehalt an Leitsubstanzen im *Cyanidium*-Algenextrakt.

Die Daten zeigen, dass die besten Ergebnisse sowohl hinsichtlich der Extrakt-Trockenmassen als auch bei den freigesetzten Leitsubstanzen mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1000 ml/min erreicht werden. Je höher die Durchflussrate umso besser sind die Effekte. Aus der im Plasmareaktor mit einer Durchflussrate von 1000 ml/min aufgeschlossenen Algenbiomasse wurden im Anschluss Algenextrakte mit einer Trockenmasse von 387 mg/10 ml (3,87%) hergestellt. Der Gehalt an Protein beträgt in diesem Extrakt 1.637 mg/100ml (1,6%). Die Leitsubstanzen GABA und Polyphenole sind in Konzentrationen von 65,6 und 81,5 mg/100ml im Extrakt nachweisbar. Zusammengefasst wurden im **Vergleich der Durchflussraten von 300 ml und 1000 ml pro Minute** folgende Steigerungsraten bei den Analyten erreicht:

- 3-4% bei Extrakt-Trockenmassen
- 39% bei Polyphenolen
- 21% bei GABA
- 51% bei Protein

Tabelle 9 enthält die Steigerungsraten, die durch Anwendung des Plasmaaufschlussverfahrens im Vergleich zu den Kontrollverfahren erreicht wurden. Der Plasmaaufschluss erbrachte im Vergleich zum Originalverfahren sowohl im Laborversuch als auch in nachfolgenden Versuchen im 1L- und 5L-Reaktor ausschließlich in Kombination mit dem biologischen Aufschluss eine Verbesserung im Extraktionsergebnis.

Tabelle 9: Steigerungsraten im Extraktionsergebnis im Vergleich zum Basisversuch und zum Originalverfahren.

Parameter	Steigerungsraten des Extraktionsergebnisses durch Plasmaaufschluss in %	
	im Vergleich zum Basisverfahren ohne Aufschluss PA/EA : BasisV	im Vergleich zum Originalverfahren mit biologischem Aufschluss PA/EA : EA
Trockenmasse	60	7,5
Polyphenole	275	25
GABA	147	25
Protein	168	18

Es ist ersichtlich, dass der **Plasmaaufschluss eine deutliche Steigerung aller relevanten Parameter im Extrakt bewirkt**. In Bezug zum Basisextrakt ohne Aufschluss wurden durch Einsatz von Plasma eine **Steigerung der Extrakt-Trockenmasse um 60%** sowie eine **Erhöhung der Gehalte an den Leitsubstanzen GABA, Protein und Polyphenole um jeweils 147%, 168% und 275%** erreicht. Im Vergleich zum Originalverfahren liegen die **Steigerungsraten infolge kombiniertem Plasma-/Enzymaufschluss** für die Extrakt-Trockenmasse bei 7,5% sowie bei den Leitsubstanzen zwischen 18 und 25%. In dieser Versuchsdurchführung wird deutlich, dass der Plasmaaufschluss gekoppelt mit dem biologisch-enzymatischem Aufschluss die besten Ergebnisse erzielt.

Ein großer Vorteil des kombinierten PA/EA Verfahrens zeigt sich insbesondere in der Erhöhung der Aktivsubstanz (Extrakt-Trockenmasse) um bis zu 8%, von 2,41% auf 3,87%. Der in der Produktspezifikation des Markenproduktes festgelegte Wert von > 2,9% wird damit um 33% überschritten. **Damit wird die Möglichkeit aufgezeigt, durch Einsatz der Plasma-Technologie bisher benötigte Energie intensive Aufkonzentrierungsschritte im Originalverfahren einzusparen.**

Der 1Liter-Plasmaaufschluss (PA)-Reaktor wurde am 11.08.2021 von Mitarbeitern des Projektpartners INP im IGV aufgestellt und nach ausführlicher Unterweisung in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern vom IGV-Projektteam in Betrieb genommen. Der Plasmaaufschluss wurde mit einer Durchflussrate von 1000 ml/min durchgeführt. Die Ergebnisse der am IGV durchgeführten Aufschlussversuche sind in Anlage 2 enthalten und in Abbildungen 37 bis 40 graphisch dargestellt. Tabelle 10 enthält die Steigerungsraten im Extraktionsergebnis, die durch Anwendung des Plasmaaufschlusses erzielt wurden. Abbildung 36 zeigt ein Foto des mittels Plasmaaufschluss gewonnenen Algenextraktes im Vergleich zum Basisextrakt ohne Aufschluss und zum Extrakt, mit kombiniertem Aufschlussverfahren (PA/EA).



Abbildung 36: *Cyanidium*-Algenextrakte: links: Basisversuch ohne Aufschluss, mittig: Extrakt mit Plasmaaufschluss (PA), rechts: Originalverfahren mit enzymatischem Aufschluss und Plasmaaufschluss (PA/EA).

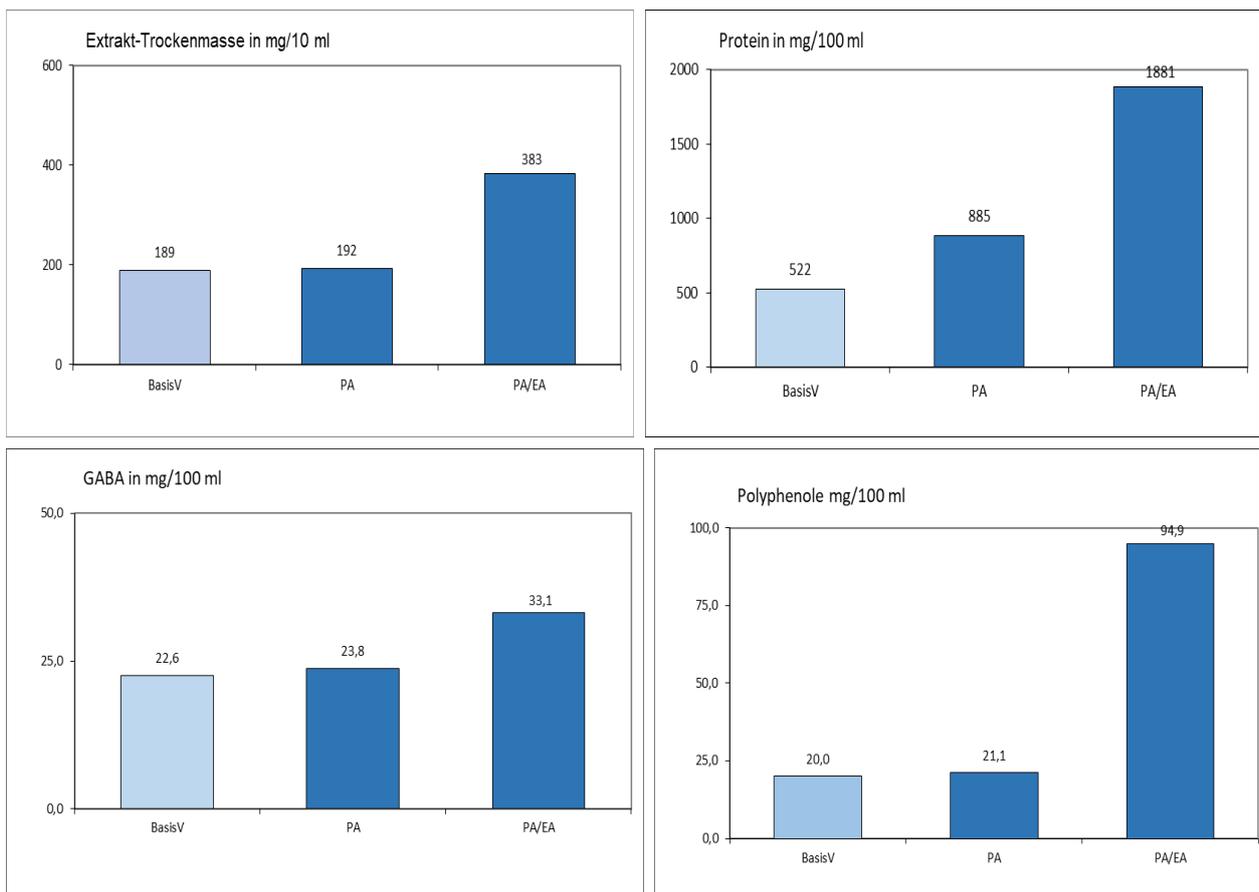


Abbildung 37-40: Gehalte an Leitsubstanzen im *Cyanidium*-Extrakt nach Plasmaaufschluss der Algenbiomasse im 1L-Reaktor.

Tabelle 10: Steigerungsraten des Extraktionsergebnisses im Vergleich zum Basisversuch ohne Aufschluss (1L-Reaktor).

Parameter	Steigerungsraten in %	
	PA im Vergleich zum Basisversuch	PA/EA im Vergleich zum Basisversuch
Trockenmasse	1,6	103
Polyphenole	5,5	375
GABA	5,3	47
Protein	70,0	261

Der Plasmaaufschluss bewirkt wie in den vorangegangenen Labor-Experimenten eine deutliche Steigerung des Extraktionsergebnisses. Auf dem Foto in Abbildung 36 ist die Wirkstoffanreicherung im Extrakt infolge Plasmaaufschluss bereits visuell durch eine intensivere Farbgebung sichtbar. Durch Einsatz der Plasmaaufschluss-Technologie wurde in Bezug zum Basisextrakt ohne Zellaufschluss eine Steigerung der Extrakt-Trockenmasse um bis zu 2% erreicht. Die Proteingehalte im Extrakt konnten durch den Plasmaaufschluss um 70 %, die Gehalte an GABA und Polyphenolen um bis zu 5,5% erhöht werden. **Im Vergleich zum Originalverfahren wurde durch den additiven Einsatz von Plasma eine weitere deutliche Steigerung der Leitsubstanzen im Extrakt erreicht (siehe Tab. 10). Die Steigerungsraten für Extrakt-Trockenmasse liegen bei 103%. Der Gehalt an Polyphenolen konnte im Algenextrakt durch den kombinierten Plasma-/Enzymaufschluss um 375% gesteigert werden, während die Konzentration von GABA um 47 % und die von Protein um 261% erhöht wurde. Damit bestätigt sich zum einen die Erkenntnis, dass der Plasmaaufschluss gekoppelt mit dem biologisch-enzymatischem Aufschluss die besten Extraktionsergebnisse erzielt** und zum anderen die Feststellung, dass die Leitsubstanzen durch den Plasmaaufschluss in unterschiedlicher Höhe freigesetzt werden. Eine verbesserte Effizienz einer ausschließlichen Anwendung des Plasmaaufschlusses im Vergleich zum Originalverfahren konnte in diesem Versuchskomplex nicht bestätigt werden.

Im Rahmen der Optimierungsversuche erfolgten auch Untersuchungen zum **Einfluss der Plasma-Behandlungsdauer auf den Zellaufschluss**. Der Plasmaaufschluss wurde im 1L-Reaktor mit gleichbleibendem Volumen von 1000 ml Algensuspension unter Variation der Behandlungszeiten durchgeführt. Nach einer Plasma-Behandlungszeit von 30 Minuten, 45 Minuten und 60 Minuten wurden die Leitsubstanzen im Algenextrakt analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlungsdauer nur einen geringfügigen Einfluss auf den Aufschlussgrad und die Freisetzung der untersuchten Leitsubstanzen aufweist. Es ist ein minimaler Anstieg von 2% bis 6% hinsichtlich der Gehalte an Protein, GABA und Polyphenolen zu verzeichnen, wenn die Algensuspension 60 Minuten anstatt 30 Minuten mittels Plasma behandelt wird (Ergebnisse nicht gezeigt). Nachfolgende Versuche wurden mit einer Plasma-Behandlungszeit von 30 Minuten durchgeführt.

In Absprache mit dem Projektpartner wurden zusammenfassend folgende Parameter für den Plasmaaufschluss im 1L-Reaktor favorisiert:

- 11 Hz Funkenfrequenz
- 500 ml Behandlungsvolumen
- 1000 ml/min Durchflussrate
- 30 min Plasma-Behandlungszeit pro 1L-Algensuspension
- 40 kV Spannung

Die mikrobiologische Stabilität der plasmabasierten Algenextrakte wurde nach Ph. Eur. 2.6.12, COLIPA-„Guidelines on Microbial Quality Management“ untersucht und in chargenbezogenen Analysenzertifikaten dokumentiert (siehe Anlage 3). Die Ergebnisse belegen, dass die in der Spezifikation festgelegten mikrobiologischen Grenzwerte eingehalten werden und den Vorgaben der EU Kosmetikverordnung 1223/2009 entsprechen. Der Konservierungsmittel-Belastungstest wurde nach Ph. Eur. 10.8, 5.1.3 durchgeführt und zeigt, dass die Extrakte auch unter Belastungsbedingungen vor mikrobieller Vermehrung geschützt sind und die Akzeptanzkriterien entsprechend DIN EN ISO 11930 erfüllt werden (Prüfbericht im IGV einsehbar).

Umfangreiche projektbegleitende Analysen der gewonnenen Extrakte zeigten, dass hydrophile Extrakte aus der Mikroalge *Cyanidium caldarium* hohe Gehalte an hautidentischen Aminosäuren und Algenzuckern, Mineralstoffen sowie den bioaktiven Wirkstoff Gamma-Aminobuttersäure (GABA) enthalten, die an zellulären Signaltransduktionen beteiligt ist. Der Gehalt an GABA beträgt durchschnittlich 50 mg/100ml und macht somit ca. 25% der Summe aller freien Aminosäuren aus. In ausgewählten Extrakten wurden projektbegleitend kosmetisch relevante Vitamine, freie Zucker sowie bioaktive Aminosäuren analysiert und evaluiert. Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass die mittels Plasmaaufschluss gewonnene Algenextrakte höhere Gehalte an wertvollen bioaktiven Wirkstoffen als die ohne Aufschluss hergestellten Extrakte enthalten, und zum anderen, dass die Spektren dieser Wirkstoffe variieren. Die Vitamingehalte von plasmaaufgeschlossener Biomasse liegen in ausgewählten Algenextrakten deutlich höher als im Basisextrakt ohne Aufschluss. Für die kosmetisch relevanten B Vitamine B3 (Niacin), Vitamin B1 (Thiamin) und Vitamin B6 (Pyridoxin) wurden im *Cyanidium* Extrakt Gehalte von 0,1 bis 2,2 mg/100ml nachgewiesen. Die im Algenextrakt frei vorliegenden bioaktiven Aminosäuren umfassen ein breites Spektrum von kosmetisch wirksamen Strukturen. Der Gesamtgehalt an freien Aminosäuren im Extrakt beträgt bis zu 750 mg/100 ml. Die Prüfberichte liegen im IGV zur Einsicht vor.

Die Molekularcharakteristik ausgewählter relevanter Proteine erfolgte im *Cyanidium* Extrakt durch Proteomics-Technik. Zur Charakterisierung der Proteine wurden zwei unterschiedliche massenspektrometrische Ansätze gewählt:

- A) untargeted approach
- B) targeted approach

Beide Ansätze erfordern einen enzymatischen Verdau der Probe mit Trypsin, der zu Generierung von vorhersagbaren Peptiden führt.

Für die untargeted Analyse (A) wird die Technologie der hochauflösenden Massenspektrometrie angewandt. Durch sie werden ungerichtet alle in der Probe enthaltenden Peptide erfasst und anhand von Datenbanken Zuordnungen zu den entsprechenden Proteinen ermöglicht.

In Tabelle 11 sind die 8 intensivsten Proteine des Organismus *Cyanidium caldarium* aufgelistet, die im Extrakt nachgewiesen wurden:

Tabelle 11: Die acht intensivsten Proteine (höchste unused Scores) ermittelt mit der Protein-Pilot-Software im tryptisch verdauten Cyanidium Extrakt (LOT: 130820) und die zugehörigen Peptide; kursiv: akzessorische Pigmente

Proteinname	UniProt ID	Zugehörige Peptide
<i>C-phycoyanin alpha subunit</i>	O19910	AGASLDAAR, ASHGLSGAAASEANAY, MKTPITEAIATADSQGR
<i>C-phycoyanin beta chain</i>	O19909	AATIVTNAAR, GEFLSNTQLD, ISANAATIVTNAAR
Cytochrome c-550	Q9TLW2	DGSESIAEIHPSIK, EIHPSIK, LELNEEAR
<i>Allophycoyanin alpha chain</i>	Q9TLS7	EMYNSLGTPLSGVAEGIR, FDYAIGAMQ, GTPLSGVAEGIR
Ribulose biphosphate carboxylase large chain	P37393	AQSVQER, DFBVETPTANV, DYVNEGPQILK
Cytochrome c6	Q9TLW1	AEALEANNIK, ANLEHGEQIF, ISAIANQVK
<i>Allophycoyanin beta chain</i>	Q9TLS8	AITAVINAADVQGK, DAITAVINAADVQGK, YLDNNSIEK
<i>Phycobiliprotein ApcE</i>	Q9TLS6	GLGNGNIFQNFFK, NANLIISR, NIVVPSFSGLLNTV

In der *targeted* Analyse (B) wird ebenfalls eine Datenbank genutzt, aus der gezielt Proteine gewählt werden, deren Anwesenheit geprüft wurde. Nach in-silico Verdau der Proteinsequenzen mit der Skyline-Software, wurde eine MRM-Methode generiert, die die Q1 und Q3-Massen der zugehörigen Peptide enthält. Der enzymatisch verdaute *Cyanidium* Extrakt wird mit einem Triple-Quad-MS/MS gemessen und so gegebenenfalls vorhandene Peptide im Chromatogramm nachgewiesen.

In Tabelle 12 sind die nach Ansatz B ausgewählten Proteine und zugehörigen nachgewiesenen Peptide dargestellt:

Tabelle 12: Selektive Proteine aus der UniProt-Datenbank und dazugehörige Peptide, die im tryptisch verdauten Extrakt mittels MRM-Methode nachgewiesen wurden

Proteinname	UniProt ID	Zugehörige Peptide
Thioredoxin	P37395	STLTNALK
Actin	A9CAY2	TEYDEFGPSVVHR
Tubulin alpha chain	Q7XYS1	LIAQVISSLTASLR
Chaperone protein dnaK (HSP70)	Q9TLT1	IVDWLVDFEK, IAGLDVLR, QAVINPSNTFYSVK, IINEPTAASLAYGLDK, IPAIQNLVK, SDINEIVLVGGSTR

Mittels Proteomics-Technik wurden kosmetisch relevante Proteine im Cyanidium Algenextrakt charakterisiert.

Die bioaktive Wirkung der durch Plasmaaufschluss hergestellten Algenextrakte wurde mit verschiedenen biologischen und chemischen Testsystemen wie Zellkultur-Bestrahlungsmodell, Kollagen- Assay, Tyrosinaseaktivitäts-Test sowie mittels Messung der antioxidativen Aktivität untersucht.

Zunächst wurden die Algenextrakte im MTT-Vitalitätstest auf potentielle zelltoxische Eigenschaften untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die getesteten Cyanidium Extrakte in einem breiten Konzentrationsbereich nicht zytotoxisch auf humane Fibroblasten wirken.

Die Daten zur Wirkung der Algenextrakte auf die Vitalität UV bestrahlter Hautzellen sind in Abbildung 41 und 42 dargestellt. Im Testsystem E + UVA (Abb. 41) wurden die Algenextrakte bereits eine Stunde vor der Bestrahlung, im Testsystem UVA + E (Abb. 42) eine Stunde nach der Bestrahlung mit einer UVA-Strahlendosis von 10 J/cm² den Zellkulturen zugesetzt.

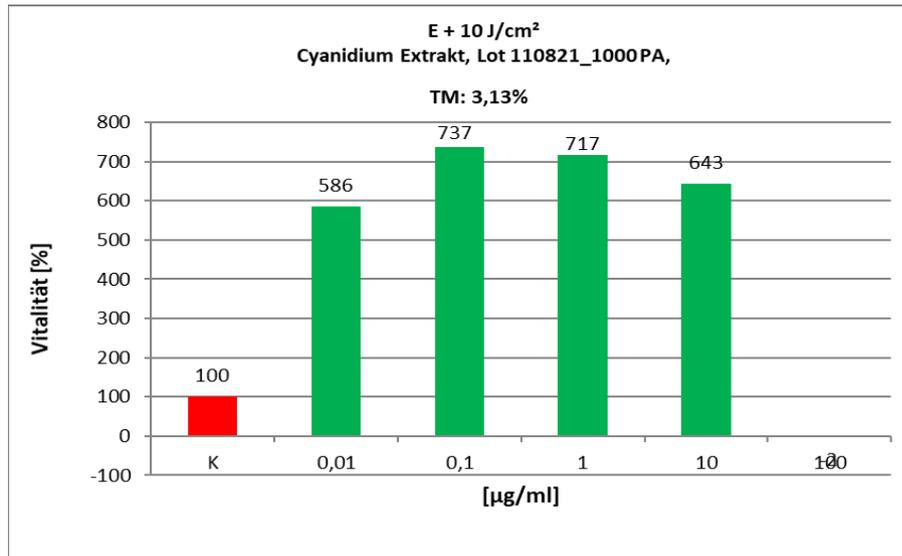


Abbildung 41: Vitalität UVA-bestrahlter humaner Fibroblasten (NHDF) unter Extraktzusatz (vor Bestrahlung)

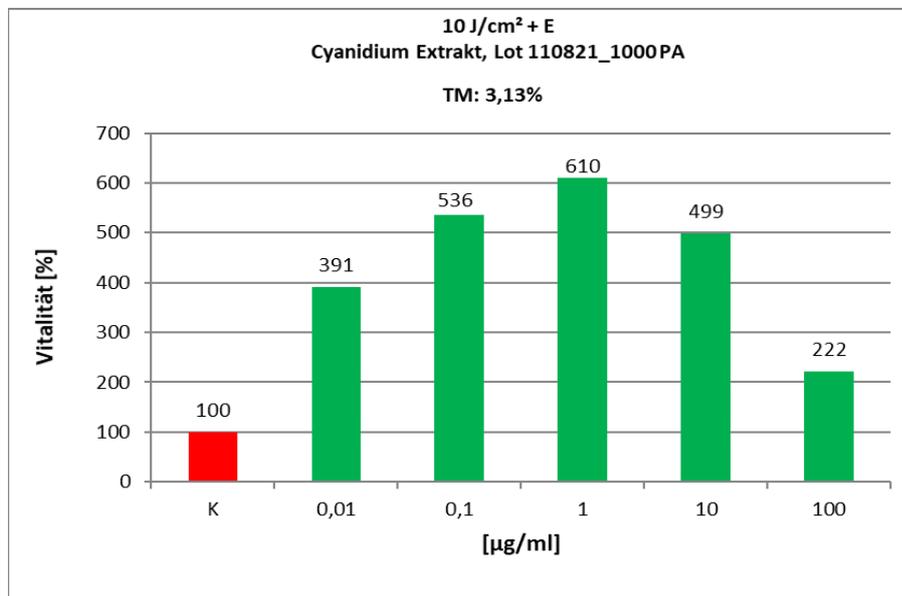


Abbildung 42: Vitalität UVA-bestrahlter humaner Fibroblasten (NHDF) unter Extraktzusatz (nach Bestrahlung)

Mikroalgenextrakte aus plasmaaufgeschlossener *Cyanidium*-Biomasse erhöhen die Zellvitalität UVA-bestrahlter humaner Fibroblasten um bis zu 637% im Vergleich zur bestrahlten Zellkontrolle ohne Extraktzusatz (Abb. 41). Dieser beachtliche Schutzeffekt zeigt sich bereits bei geringen Einsatzkonzentrationen von 0,01 bis 10 µg/ml. Die mittels Plasmaaufschluss hergestellten Algenextrakte zeigten höhere Wirksamkeiten im Vergleich zu den Extrakten, die ohne Aufschluss gewonnen wurden.

Bei Extraktzugabe nach der Bestrahlung der Zellen mit UVA-Licht (Abb. 42) konnte eine deutliche Minimierung der UVA-induzierten Zellschäden beobachtet werden. Die Zellvitalität bereits geschädigter Fibroblasten wurde durch Zusatz von Algenextrakt wieder erhöht. Der *Cyanidium* Extrakt bewirkt dosisabhängig eine Erhöhung der Zellvitalität und somit der Regenerationskraft bereits geschädigter Hautzellen um bis zu 510% und belegt somit die hervorragende zellregenerierende Wirkung der enthaltenen Algenwirkstoffe.

Mittels Plasmaaufschluss gewonnene *Cyanidium* Extrakte bieten humanen Hautzellen Schutz und verleihen Regenerationsvermögen gegenüber UV-induzierten oxidativen Stress und damit verbundenen Zellschäden. Der wirkstoffreiche *Cyanidium* Algenextrakt ist sowohl in der Lage, die durch UVA-Strahlung induzierten freien Radikale und ROS abzufangen und ihrer zellschädigenden Wirkung entgegenzuwirken als auch bereits geschädigte Fibroblasten wieder zu regenerieren.

Darüber hinaus machen die Daten deutlich, dass die mittels Plasmaaufschluss gewonnenen Algenextrakte im Vergleich zum Basisversuch ohne Aufschluss deutlich stärkere Effekte im Zellkulturmodell mit humanen Hautzellen bewirken.

Die Ergebnisse zum Einfluss der *Cyanidium* Extrakte auf den Kollagengehalt in humanen Fibroblasten sind in Abbildung 43 und 44 dargestellt. Dabei wurde der Kollagengehalt in Fibroblasten unter Zusatz von Algenextrakten untersucht, die durch Einsatz des Plasmaaufschlusses hergestellt wurden und mit Algenextrakten verglichen, die ohne Aufschluss gewonnenen wurden (Basisversuch).

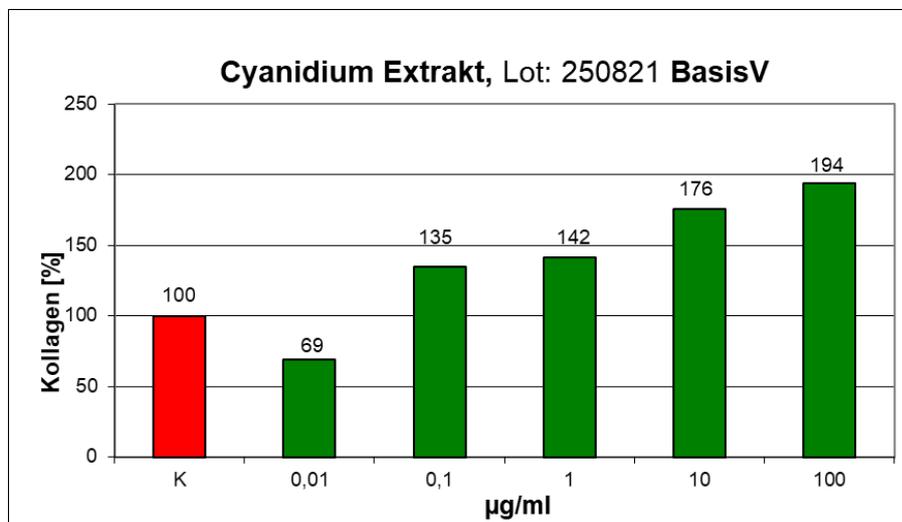


Abbildung 43: Kollagengehalt in humanen Fibroblasten unter Extraktzugabe (Basisversuch ohne PA)

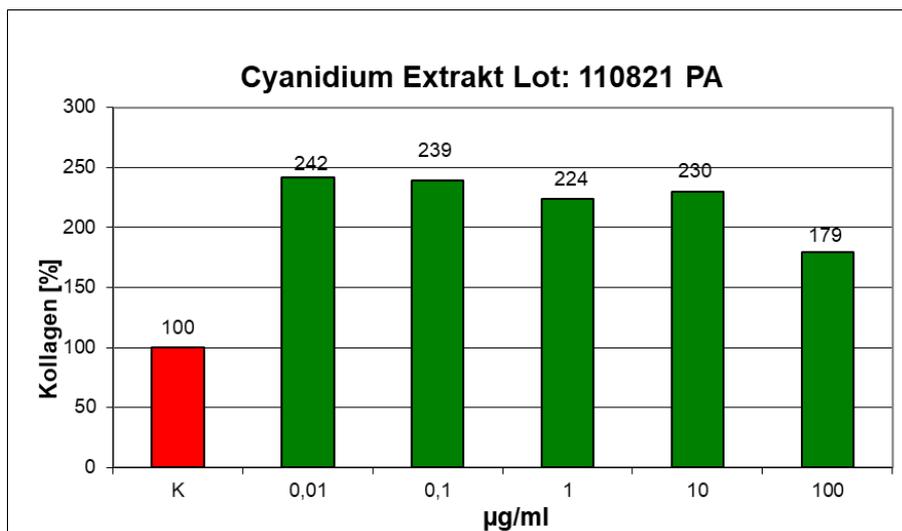


Abbildung 44: Kollagengehalt in humanen Fibroblasten unter Extraktzugabe (hergestellt mit PA)

Es konnte gezeigt werden, dass mittels Plasma hergestellte *Cyanidium* Algenextrakte eine dosisabhängige Stimulierung der Kollagensynthese in humanen Fibroblasten um bis zu 142%

bewirken (Abb. 44). Der Algenextrakt führt bereits in Einsatzkonzentrationen von 0,01 µg/ml bis 10 µg/ml zu einer Erhöhung des Kollagengehaltes um 142% bzw. um 130%. Die Graphiken machen deutlich, dass die mittels Plasmaaufschluss gewonnenen Algenextrakte eine deutlich stärkere Stimulierung der Kollagensynthese in Hautzellen bewirken als der Algenextrakt ohne Aufschluss (Basisversuch).

Der Einfluss von *Cyanidium* Extrakten auf die Tyrosinaseaktivität wurde photometrisch mittels Tyrosinase-Test durch Messung der Dopachrom-Bildung in Abhängigkeit von verschiedenen Extraktkonzentrationen untersucht. Eine Reduzierung der Tyrosinaseaktivität entspricht der prozentualen Abnahme der Dopachrom-Absorption bei 475 nm bei Extraktzugabe im Vergleich zur Kontrolle ohne Extrakt, die 100% gesetzt wurde.

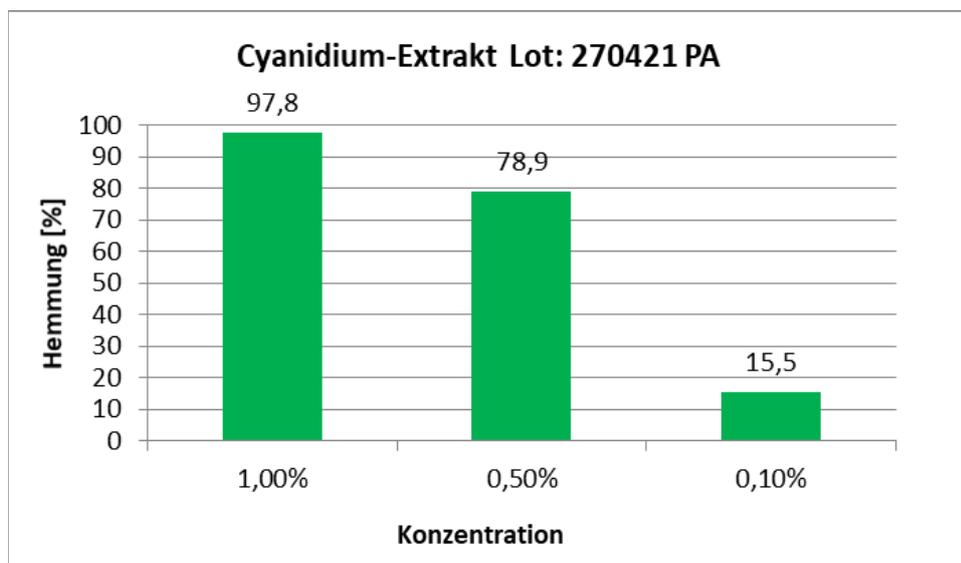


Abbildung 45: Hemmung der Tyrosinase-Aktivität durch Cyanidium Algenextrakt

Die Ergebnisse in Abbildung 45 zeigen, dass plasmaaufgeschlossener *Cyanidium* Extrakt das Enzym Tyrosinase wirksam hemmt und somit in der Lage sein sollte, die Melaninbildung in Hautzellen zu verzögern. Bei einer Extraktkonzentration von 1 % beträgt die Hemmwirkung 98 %; bei einer Extraktzugabe von 0,5 % im Testansatz wird das Enzym Tyrosinase zu 79 % gehemmt.

Eine potentiell hautaufhellende Wirkung von *Cyanidium* Extrakt wurde durch seine Fähigkeit zur Hemmung der Tyrosinaseaktivität, als ersten Schritt der Melanogenese, nachgewiesen. Das Ergebnis liefert erste Anhaltspunkte, dass der mittels Plasmaaufschluss gewonnene algenbasierte Wirkstoffextrakt auch als kosmetischer Wirkstoff zur Verminderung bzw. Reduzierung von Altersflecken und Pigmentstörungen sowie zur Erhaltung eines ebenmäßigen hellen Teints geeignet ist.

Reaktive Oxygen Species (ROS) können in kaskadenartig verlaufenden Reaktionsabläufen zu Schäden an wichtigen Zellmolekülen wie Proteinen, Membranlipiden, und DNA-Strukturen führen sowie strukturbildende Protein- und Lipid- Verbindungen der Haut wie Kollagen, elastische Fasern und Keratin angreifen und schädigen. Die antioxidative Kapazität der Algenextrakte wurde mit der

Photochemolumineszenz-Methode mit dem dazugehörigen Gerätesystem PHOTOCHEM® der Firma Analytik Jena AG und standardisierten Testkits untersucht.

Die antioxidative Kapazität des plasmabasiertem *Cyanidium* Extraktes beträgt im wässrigen Testsystem (ACW) 245,2 µmol Ascorbinsäure-Äquivalente pro 100 g Extrakttrockenmasse (4,78 µmol/100 ml Extrakt) und ist vergleichbar mit 840 µg Ascorbinsäure-Äquivalente pro 100 ml Extrakt bzw. 43,2 mg/100g Extrakttrockenmasse.

Der plasmabasierte *Cyanidium* Extrakt weist Radikalfängeraktivitäten gegenüber den vorrangig im Testsystem erzeugten zelltoxisch wirkenden Superoxidationradikalen auf und besitzt eine antioxidative Schutzwirkungen gegenüber oxidativen Stressoren.

Im Rahmen von Arbeitspaket 8 wurde das im IGV etablierte Originalverfahren der Heißwasserextraktion mit einem additiv vorgeschalteten Schritt des Plasmaaufschlusses von Algenbiomasse versehen und im 10L-Maßstab durchgeführt (siehe Flow Chart, Anlage 4). Tabelle 13 enthält die Extraktparameter von *Cyanidium* Extrakt, welcher mittels Plasmaaufschluss im 5L-Reaktor hergestellt wurde.

Tabelle 13: Ergebnisse des Scale up Versuches im 5L-Reaktor (GT: Gefrier/Tau, PA: Plasmaaufschluss, EA: Enzymaufschluss, EX: Extraktion, Z: Zentrifugiert).

Probe	Verfahrensschritte						Analysierte Parameter							
							TM	Polyphenole		GABA		Protein		
	GT	PA	GT	EA	EX	Z	g/100ml	mg/100ml	% i.T.	mg/100ml	% i.T.	mg/100ml	% i.T.	
1 Lot: 250122 Basis 500 ml	x	-	-	-	x	x	2,16	28,3	1,3	28	1,3	629	29,1	
2 Lot: 010222_5000 PA	x	x	-	x	x	x	2,6	41,8	1,5	38,6	1,48	1.255	48,3	

Die Ergebnisse bestätigen die Daten, die bereits im Labormaßstab und mit dem 1L-Reaktor erzielt wurden. Der mittels 5L-Reaktor durchgeführte Plasmaaufschluss bewirkt eine deutliche Steigerung des Extraktionsergebnisses. Im Vergleich zum Basisextrakt ohne Aufschluss wird eine Steigerung der Extrakt-Trockenmasse von 2,16 auf 2,60 g/100ml um bis zu 20% erreicht. Durch Integration des Plasmaaufschlusses konnten die Gehalte an Proteinen im Extrakt um fast 100%, die Konzentrationen an GABA und Polyphenolen um bis zu 48% erhöht werden. Mit den Ergebnissen dieses Versuchskomplexes wurde das Plasmaaufschluss-Verfahren erfolgreich in den kleintechnischen Maßstab überführt und somit die Voraussetzungen für eine Weiterentwicklung des Reaktors in den Industriemaßstab geschaffen.

AP 1 INP: Modifikation Laborverfahren zur Behandlung von Algenbiomasse

Im ersten Schritt wurden die vom IGV gelieferten Biomassen hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften untersucht, um daraus Schlüsse ziehen zu können, wie ein Plasma innerhalb der Biomasse gezündet werden kann. Die Biomassen wurden hinsichtlich optischer Dichte, Leitwert, Proteingehalt, Temperatur und des pH-Wertes untersucht. Für die Bestimmung des Proteingehaltes wurde zunächst ein Standard-Assay angewendet (Bradford), welcher als Marker für einen erfolgreichen Zellwandaufschluss zur Anwendung kommen sollte.

Für die ersten Aufschlussversuche wurde dafür der Aufbau aus Zocher et al. 2020¹, sowie die darin angegebenen Parameter verwendet, welcher auch weiterhin als Referenzexperiment in jedem Aufschlussversuch verwendet wird. Bei den ersten Aufschlussversuchen wurden verschiedene Verdünnungsreihen der Biomasse überprüft um zu untersuchen, ob und welchen Einfluss die Dichte der Biomasse auf die Plasmawirkung hatte. Ebenso wurden die Biomassen in verschiedenen Medium behandelt, d.h. in destilliertem Wasser, in destillierten Wasser und mit Natriumchlorid eingestellten Leitwerten, sowie dem originalen Kultiviermedium. Auch dieses Vorgehen sollte dazu dienen, eine optimale Plasmaausbreitung erzeugen zu können.

Mit den hieraus gewonnenen Erkenntnissen wurden Testreaktoren mit verschiedenen Geometrien, Rauminhalten und Materialien angefertigt (siehe Abbildung 46). Des Weiteren wurden verschiedene Elektrodenmaterialien (Wolfram, Edelstahl, Wolfram-Legierungen) und Elektrodenradii untersucht, um das beständigste Material mit dem geringsten Elektrodenabrieb für die Parameterstudien gewonnen Werte einsetzen zu können.

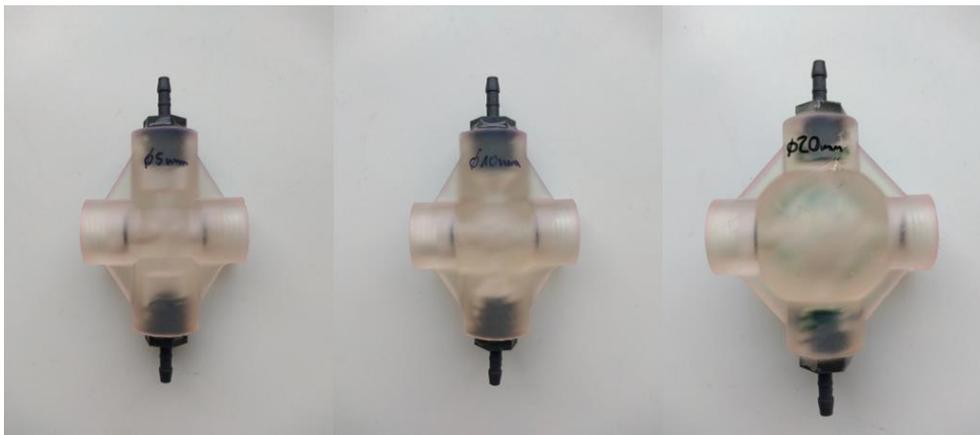


Abbildung 46: Verschiedene Reaktorgeometrien und -volumina.

AP 2 INP: Quantifizierung des Algenaufschlusses im Testreaktor für aus AP1 abgeleiteten Betriebsparameterbereiches

Nach Bestimmung der in AP1 genannten Parameter, wurde mit der Modifizierung des Laboraufbaus begonnen. Alle Versuche wurden zudem in der tatsächlich am IGV weiter zu verarbeiteten Biomasse durchgeführt, um so die korrekten Rückschlüsse auf die Ergebnisse ziehen zu können.

Der in AP1 beschriebene Proteinnachweis, Bradford, wurde aufgrund schlechter Reproduzierbarkeit in der Realbiomasse als Marker für Zellwandbruch verworfen. Als alternative Methoden wurden zum

¹ Zocher, K., Rataj, R., Steuer, A., Weltmann, K. D., & Kolb, J. F. (2020). Mechanism of microalgae disintegration by spark discharge treatment for compound extraction. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 53(21), 215402.

einen die spektroskopische Bestimmung des Proteingehaltes bei 280nm versucht und zum anderen ein Ninhydrin-Assay, welcher ebenfalls spektroskopisch bei 575nm vermessen wird. Alternativ wurde über eine Proteinbestimmung nach Kjeldahl, wie sie am IGV durchgeführt wird, diskutiert. Um zu eruieren, ob die reaktiven Spezies, welche im Plasma gebildet werden, den Proteinnachweis stören, wurde die Wasserstoffperoxidkonzentration bestimmt.

Nach Rücksprache mit dem IGV wurden als Ausweichparameter die Bestimmung des Trockenmassegehaltes im Überstand und die photometrische Bestimmung des Phycocyanin- bzw. des Chlorophyllgehaltes etabliert. Mikroskopische Untersuchung der aufgeschlossenen Algen wurden durchgeführt um einen erfolgreichen Aufschluss visualisieren zu können.

Im nächsten Schritt wurde mit der Variation von verschiedenen Behandlungsparametern begonnen, vor allem wurden verschiedene Durchflussgeschwindigkeiten bei gleichbleibendem Volumen, verschieden hohe Spannungen, sowie verschiedene Pulsfrequenzen untersucht um die bestmöglichen Aufschlussparameter bestimmen zu können.

Im Hinblick auf das Monitoring des Energieeintrages wurde bei jeder einzelnen Messung sowohl eingetragene Spannung als auch Stromstärke mittels Oszilloskop aufgenommen, um im Anschluss daraus die eingetragene Energie pro Spannungspuls berechnen zu können. So können Rückschlüsse auf die Energieeffizienz des Aufschlussverfahrens gezogen werden, was beispielhaft in Abbildung 47: dargestellt ist.

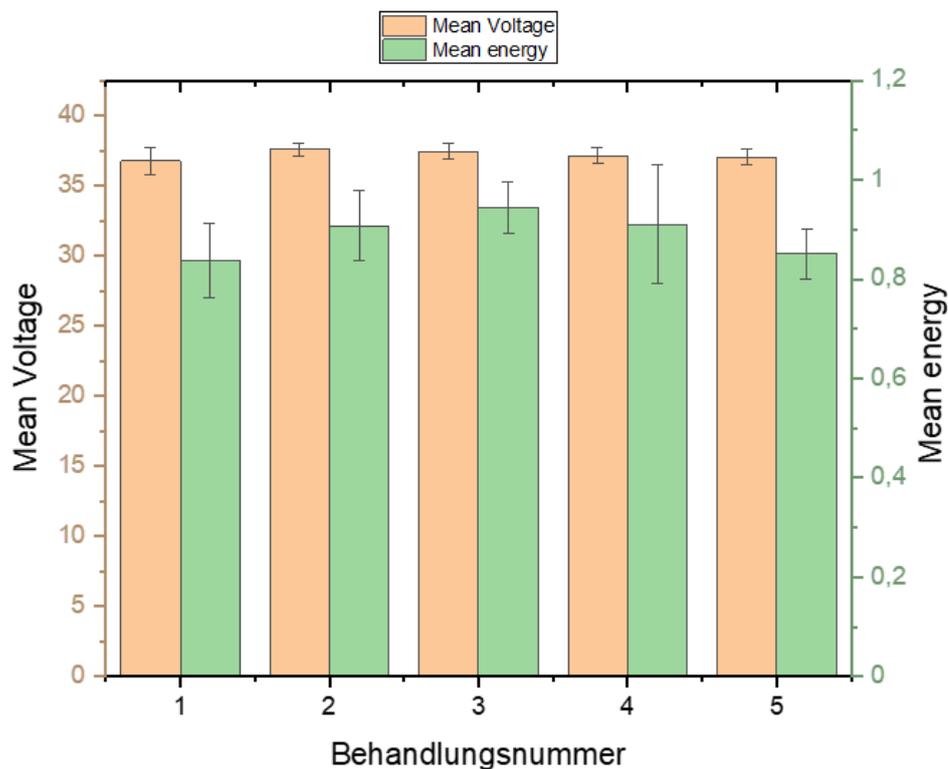


Abbildung 47: Beispielhafte graphische Darstellung der eingetragenen Spannung und der daraus resultierenden eingetragenen Energie für einzelne Behandlungszyklen.

AP 3 und AP 4 INP: Entwicklung Laborreaktor, Aufbau & Inbetriebnahme

Durch Bestimmung der idealen Behandlungsparameter in AP 1 und 2 konnten in AP 3 die Konzeption und der Bau des 1 Liter-Systems begonnen werden. Im Gegensatz zum Laboraufbau wurde für das neue System ein sphärischer Innenraum gewählt, welcher eine Reflexion und damit größere Verstärkung der Schockwellen erlaubt, welche für den Algenaufschluss essentiell sind. Als Elektrodenmaterial hat sich Wolfram als beständigstes Material etabliert. Für die Einstellung des Elektrodenabstands wurden zudem eine automatische Abstandssteuerung mittels Schrittmotoren konzipiert, welche den Abstand der Elektroden zueinander während der gesamten Aufschlusszeit konstant hält. Dies ist notwendig um eine kontinuierliche Plasmazündung zu gewährleisten. Mittels Peristaltikpumpe wird die Biomasse weiterhin durch den Reaktor bewegt, wie bereits in den Laborversuchen. Hierfür wurden auch elektronisch einige Versuche zur notwendigen Schirmung der Schrittmotoren durchgeführt, da vom Pulsgenerator elektromagnetische Strahlung ausgehen kann, welche die empfindliche Elektronik stört. Eine Querschnittsansicht ist in Abbildung 48 dargestellt.

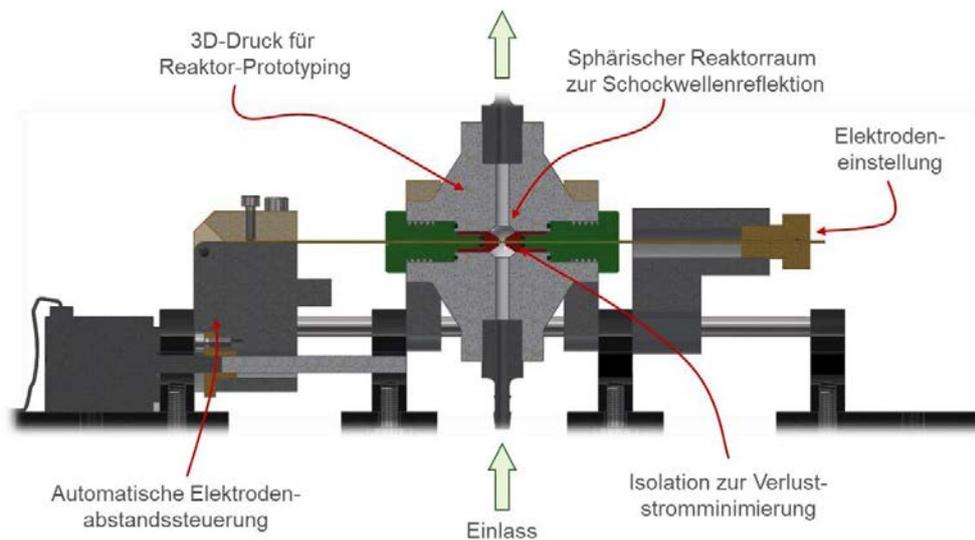


Abbildung 48: Querschnitt durch den Gesamtaufbau des 1 Liter Systems.

Zur Optimierung des Energieeintrages in das System wurden diverse Pulslängen getestet, indem verschieden lange Kupferspulen für die Verbindung der Kondensatoren verwendet wurden. Kürzere Pulse benötigen in der Regel weniger Energie, dies sollte überprüft werden. Ob mit kürzeren Pulsen ein gleichwertiger Aufschluss im Vergleich zur Pulslänge in den Laboraufbauten verwendeteten Pulslänge erzielt werden kann, wurde ebenfalls überprüft. Ein Monitoring des Energieeintrages wie in AP 2 beschrieben wurde weiterhin durchgeführt.

Darüber hinaus wurden größere Volumina an Biomasse am INP aufgeschlossen und an das IGV zu einer tiefergehenden Analyse übersendet. Es sollte geprüft werden, ob der aufgeschlossene Extrakt die geforderten Zielparameter enthält. Auch hier wurden Variationen hinsichtlich Pulsfrequenz, Vorbehandlung mittels eines Gefrier-Tau-Schrittes und Durchflussvolumen vorgenommen.

Das entwickelte System konnte nach erfolgreicher Inbetriebnahme am INP etabliert werden. Zur sicheren Bedienung wurde das gesamte System in einen Schaltschrank verbaut, welcher den Aufbau sofort stromlos schaltet, sobald die Tür vorsätzlich oder versehentlich geöffnet wird (siehe Abbildung 49).



Abbildung 49: Realaufbau, sowie eine schematische Darstellung des im Sicherheitsschrank eingebauten 1-Liter Systems. Links oben: Draufsicht auf das System; rechts oben: Reaktor mit Pulsgenerator (rechte Seite des Bildes) daneben; rechts unten: geöffneter Sicherheitsschrank mit Bedienungsmodul; links unten: schematische Gesamtansicht.

AP 5 bis 8 INP: Scale-up des Laborverfahrens

Im Laufe der vorangegangenen Arbeitspakete wurde festgestellt, dass eine Skalierung des Systems auf 5 Liter nicht ohne technische Überprüfung diverser Parameter möglich ist. Aus diesem Grund wurden mehrere Faktoren auf den Prüfstand gestellt.

Zuerst musste die Durchflussgeschwindigkeit der Algenmasse während der Behandlungszeit angehoben werden, um auch weiterhin rationale Behandlungszeiten gewährleisten zu können. Zu diesem Zweck wurden drei Volumina (300ml, 600ml, 1l) mit der jeweils angepassten Durchflussrate untersucht. Am INP wurde als Marker der Chlorophyllgehalt herangezogen. Parallel wurden die behandelten Proben ans das IGV versandt und dort auf die gewünschten Leitsubstanzen untersucht.

Ein weiterer zu untersuchender Faktor war die Auswahl des Elektrodenmaterials, sowie der Elektrodengeometrien. Bei den eingesetzten Elektroden handelt es sich jeweils um handelsübliche

Schweißelektroden, da sie besonders temperaturbeständig sind und während der Plasmazündung am Elektrodenkopf sehr hohe Temperaturen entstehen. Es musste überprüft werden, ob das derzeit eingesetzte reine Wolfram (als *grün* in den Grafiken bezeichnet) sich durch Wolframlegierungen ersetzen lässt und ob damit ein geringeres Abrieb- bzw. Zerstörungsverhalten erreicht werden kann. Getestet wurden u.a. Wolfram-Lanthan (*gold*) und Wolfram-Zirkon (*silber*). Die Elektroden wurden hinsichtlich Abrieb, d.h. Masseverlust während der Behandlung, Temperaturanstieg und Energieverbrauch untersucht.

Des Weiteren wurden zwei verschiedene Elektrodengeometrien, d.h. planare und angespitzte Elektroden untersucht. Außerdem wurden verschiedene Elektrodendurchmesser getestet: 1-3 mm in verschiedenen Konstellationen, z.B. 2 mm und 3 mm Durchmesser in Kombination miteinander und in den zwei Geometrien. Eine Kombination von Hohlelektrode (\varnothing 4mm) und Vollelektrode (\varnothing 2 bzw. 4mm) wurde ebenfalls untersucht. In diesen Fällen wurde die Algensuspension direkt durch die Hohlelektrode geleitet, was zum Ziel hatte, den Elektrodenkopf mit der Flüssigkeit zu kühlen, dadurch die Plasmatemperatur zu senken und damit die Abnutzung der Elektrode zu minimieren, die auch längerem Gebrauch standhält.

Konzeption 5-Liter Modul

Parallel zu den Materialuntersuchungen wurde die Konzeption des 5-Liter Moduls vorangetrieben. Basierend auf den aus Meilenstein 1 wurde festgelegt, das Modul um einen Plasmareaktor zu erweitern, um damit die das zu behandelnde Volumen erhöhen bzw. die Behandlungszeit herabsetzen zu können. Eine Innenansicht in das System ist in Abbildung dargestellt. Das System ist so ausgelegt, dass die Algensuspension erst einen Reaktor durchströmt und dann in den zweiten Reaktor geleitet wird. Damit erhöht sich die Dauer, in derer die Algen dem Plasma ausgesetzt sind und damit die Aufschlussquantität heraufgesetzt wird.

Für das Modul wurden die Pulsgeneratoren insofern neu konzipiert, dass die Kondensatoren vertikal gestapelt sind, um den verfügbaren Platz in der Metallschutzumhausung nicht noch weiter einzuschränken (siehe Abbildung 51). Nebenbei hat sich die Metallumhausung als besonders arbeitssicher und mobil erwiesen, so dass dies bei der Neuauslegung des Systems beibehalten werden konnte. Das System ist wie bei dem 1-Liter Modul so konzipiert, dass es sich bei Öffnung im laufenden Betrieb sofort stromlos schaltet. Darüber hinaus wurde ein Erdungsstab am Gerät befestigt, um damit alle spannungsführenden Teile vor Berührung (etwa bei Elektrodenwechsel) sachgemäß und sicher geerdet werden können. Das System wurde mobil beibehalten um eine möglichst einfache und ortsunabhängige Verwendung weiterhin gewährleisten zu können.

Die Programmierung stellte eine technische Herausforderung dar. Zum einen musste die Programmierung gewährleisten, dass beider Pulsgeneratoren simultan angesteuert werden müssen, damit ein zeitgleicher Aufschluss der Algenmasse stattfindet. Die zweite Herausforderung bestand darin, dass naturgemäß bei einer Plasmafunkentladung hohe Spannungen und Ströme, und somit starke elektrische Felder entstehen, welche elektronische Bauteile massiv stören und sogar zerstören können. Eine aufwändige Schirmung der Schrittmotoren, der Ansteuerung und anderer elektronischen Komponenten war daher unumgänglich. Die Störungen konnten durch Einbau diverser Filter, auch auf der Platine der Ansteuerungseinheit, und ausreichender Erdung stromführender Bauteile erreicht werden.

Die eingesetzten Schrittmotoren, welche den Elektrodenabstand in einem frei wählbaren Zeitintervall neu einstellen, wurden ebenfalls geschirmt. Zudem wurden die Schienen, auf denen sich die Motoren vor- und zurückbewegen ausgetauscht. Sie bestehen nunmehr aus Aluminium um auch hier eine möglichst geringe Angriffsfläche für die elektrischen Felder zu schaffen und damit auch die Motoren

zu schützen. Des Weiteren ist damit die Bewegung auf den Aluminiumschienen reibungsfreier und damit weniger anfällig für technische Störungen.

Die Schaltpläne werden dem IGV zu ihrer weiteren Verwendung übersandt und sind als Supplement zum Abschlussbericht zu finden, ebenso die Betriebsanweisung, Verfahrensdokumentation, sowie das Handbuch für das 1-Liter Modul. Ein Handbuch für das 5-Liter Modul ist nicht notwendig, da sich an der Handhabung des Systems nichts geändert hat.

Damit mehr als ein Plasmamodul gleichzeitig betrieben werden kann, musste die Gleichspannungsversorgung der Pulsgeneratoren erweitert werden. Da die kommerzielle Gleichspannungsquelle aus dem 1L-Modul einen erheblichen Teil der Kosten des Gesamtaufbaus ausmacht, wurde im gleichen Zuge eine modulare Gleichspannungsversorgung konzipiert und konstruiert, welche kostengünstiger, eine höhere Leistung für die Plasmamodule bereitstellen kann (Abbildung 52). Eine 24V-Gleichspannungsquelle versorgt bis zu acht Hochspannungstransformatoren, die aus der Niederspannung bis zu 35kV Hochspannung erzeugen. Dabei können einzelne Transformatoren beliebig zugeschaltet werden, um ein bis vier Plasmamodule zu betreiben (zwei Transformatoren werden pro Modul benötigt). Über den Ausgang wird die Gleichspannungsversorgung mit den Pulsgeneratoren verbunden. Damit ist es möglich, die Investitionskosten der Spannungsversorgung um ca. 90% zu senken.

Zur Testung des Moduls wurde aus Gründen der derzeitigen Pandemiesituation gefrorene Algenmasse vom IGV an das INP versandt. Ursprünglich sollte die Testung direkt vor Ort am IGV stattfinden, jedoch sind in beiden Instituten Dienstreisen bis auf Weiteres untersagt. Die Algenmasse wurde deshalb am INP nach der Verfahrensdokumentation aufgeschlossen und per Expressversand zur Analyse zurückgesandt. Eine Auslieferung des Moduls hängt weiterhin an der Pandemiesituation und kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht klar benannt werden.

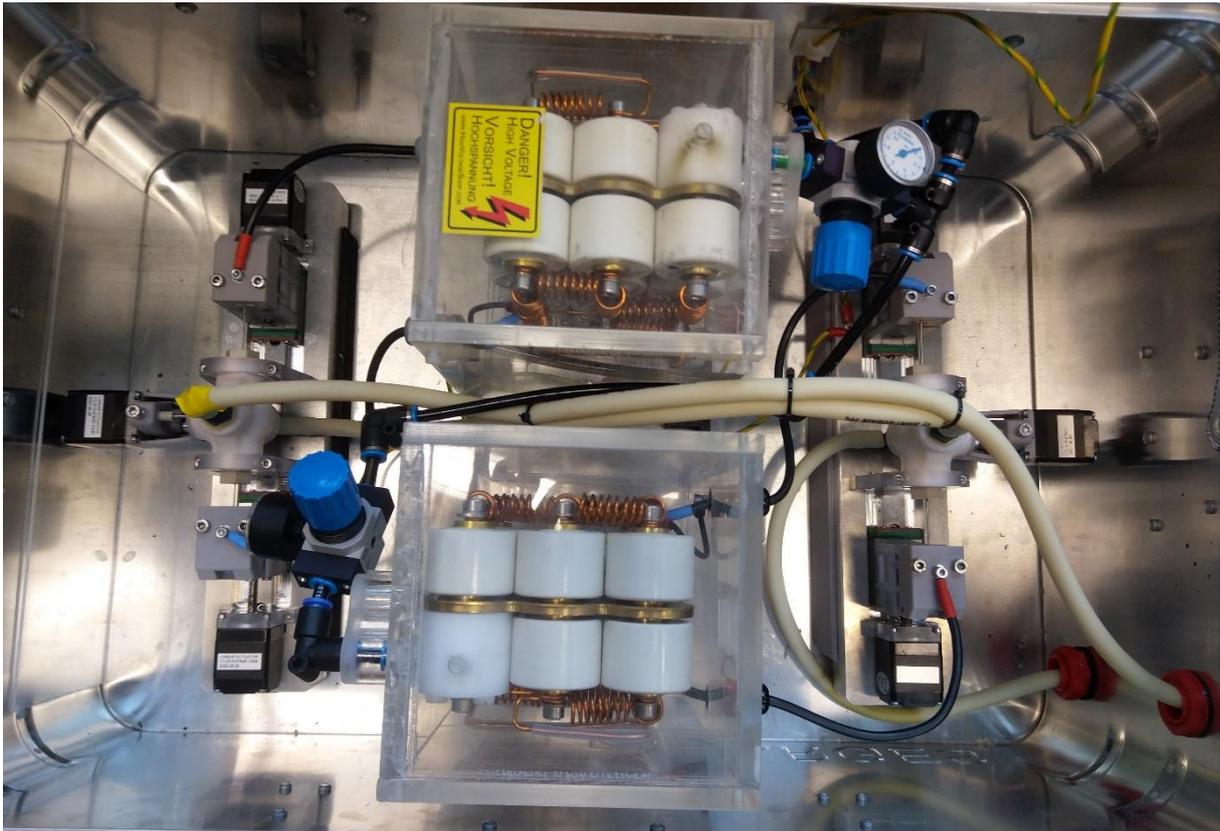


Abbildung 50: Innenansicht in das 5-Liter Modul mit zwei Plasmareaktoren und zwei Pulseneratoren, welche synchron angesteuert werden.

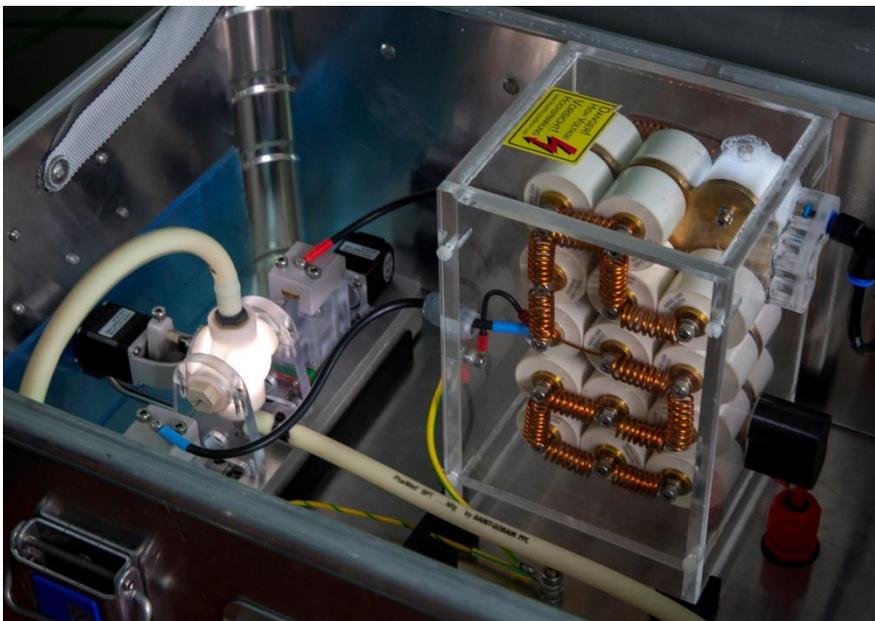


Abbildung 51: Bildausschnitt mit dem für das 5-Liter Modul überarbeitetem Pulsenerators (rechts) mit laufendem Plasmareaktor (links, hell leuchtend).

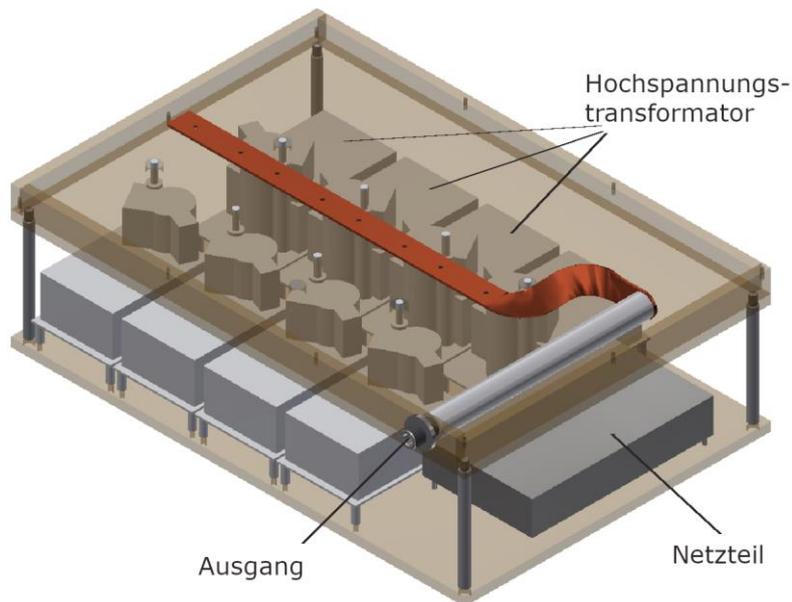


Abbildung 52 CAD-Darstellung der Gleichspannungsquelle zum Betrieb von bis zu vier Plasmamodulen.

AP 9 bis 11 INP: Konzeption weiterer Module

Die Konzeptionierung weiterer Module waren ebenfalls Bestandteil des Arbeitsplans, sofern die Konzeption des 3. Meilensteins erfolgreich wäre. Pandemiebedingt kam es gehäuft zu Lieferschwierigkeiten, so dass sich die Entwicklung des 5-Liter Moduls stark verzögerte. Besonders betroffen waren Materialien, wie Kondensatoren oder Schrittmotoren, die außerhalb von Deutschland bezogen werden mussten. Hier waren wir von Lieferzeiten von mehreren Wochen betroffen, wobei es sich um spezialisierte Anbieter handelte, welche nicht leicht austauschbar waren. Dennoch wurde darauf geachtet, das Modul so zu entwickeln, dass es sehr leicht um weitere Module erweitert werden kann. Für ein 10-Liter System würden sich beispielweise zwei weitere Plasmareaktoren, gekoppelt an zwei weitere Pulsgeneratoren, empfehlen. Für ein 20-Liter System würden dann dementsprechend weitere Module dazu gefügt werden. Generell ist die Konzeption auf eine Reihenschaltung der Plasmareaktoren ausgelegt, um eine wenig aufwendige Aufstockung zu gewährleisten. Die Metallumhausung kann dafür problemlos erweitert werden. Beispielweise ließen sich die Module entweder in die Breite oder Höhe erweitern, wobei eine vertikale Vergrößerung platzsparender wäre und die Mobilität des Systems weiterhin gegeben wäre.

Aus den o.g. Gründen wurde auch daher die Spannungsversorgung und die Hochspannungspulsgeneratoren neu ausgelegt und können leicht aus dem 5-Liter Modul in ein größeres Modul umgebaut werden. Die Spannungsversorgung wurde, wie in der Konzeption des 5-Liter Systems beschrieben, so umgebaut, dass eine Ansteuerung weiterer Module möglich ist. Zusätzlich wurde die Platine zur Ansteuerung der Schrittmotoren und der automatischen Abstandskontrolle so bestückt und programmiert, dass eine Erweiterung um mehrere Schrittmotoren möglich ist. Des Weiteren ist die Energieversorgung so konzipiert, dass sich der Energieeintrag ins System um jeweils eine Einheit pro Modul erhöht. Das bedeutet für das 5-Liter Modul sind zwei Pulsgeneratoren notwendig, so dass lediglich nur doppelt so viel Energie wie für den einen Pulsgenerator des 1-Liter Moduls notwendig ist, bei einem fünffach höheren Behandlungsvolumen. Eine beispielsweise Aufstockung um weitere 2 Reaktoren würde dann ein vierfaches an

aufzuwendender Energie bedeuten, anstelle einer zehnfachen Menge. Dies verhindert einen exponentiellen Energieverbrauch und spricht für den ökonomischen Ansatz des Plasmaverfahrens.

Aus den Erfahrungen mit dem 1-Liter und 5-Liter Modul sollte weiterhin das System im Durchfluss betrieben werden, da so die Algenmasse nicht extern gekühlt werden muss und eine gleichförmige Behandlung der Algen gewährleistet bleibt. Dies ist zudem kostensparend, da eine zusätzliche Kühlung den ökonomischen Nutzen des Verfahrens senken würde. Außerdem lassen sich Durchflusssysteme leichter in den Ernte- und Nachernteprozess einbauen, da eine Einspeisung der Algenmasse aus der Zentrifuge in das Aufschlussystem sich gut bewerkstelligen lassen. In Bezug auf die Elektrodenkonfiguration und die automatische Elektrodennachführung lassen sich in Betrachtung der Ergebnisse und Anwendungserfahrungen sagen, dass auf diesem Gebiet noch Potential zur Verbesserung gibt. Für weiterführende Projekte sind bereits eine Neukonzeption der Elektroden (z.B. Netz- oder Scheibenelektroden), sowie die Ansteuerung der Elektroden angedacht. Aus zeitlichen Gründen ist dies im derzeitigen Projekt nicht realisierbar gewesen.

Ergebnisse INP

Das 1 Liter System wurde so konzipiert, dass es eine große Spannweite an physikochemischen Eigenschaften der Realbiomasse des IGVs abdecken kann. Dies war insofern wichtig, als dass zusätzliche Schritte zur Aufschlussvorbereitung aus ökonomischen und ökologischen Aspekten vermieden werden sollten. So wurde die Plasmazündung optimiert, dass ein Plasma auch bei höheren Leitwerten zündet, wie sie bei der Kultivierung durch das Medium der Projektalge entstehen. Im Mittel besitzt die Realsuspension eine Leitfähigkeit von 2,5mS/cm; eine Plasmazündung in diesem Bereich konnte hier erzielt werden. Die optische Dichte wurde ebenfalls, wie in AP 1 beschrieben, als Störfaktor untersucht. Hier konnte kein Einfluss detektiert werden, so dass eine Verwendung der Biomasse bei 100g/l erfolgreich aufgeschlossen werden kann, so, wie sie in der Regel am IGV kultiviert wird.

Bei der Variation der Durchflussraten konnte kein Einfluss detektiert werden, so dass der Durchfluss an das zu behandelnde Probenvolumen angepasst werden kann, ohne an Aufschlussquantität einzubüßen. Als Reaktormaterial hat sich Kunststoff als besonders beständig gegenüber den Plasmaeinflüssen gezeigt, wohingegen Edelstahl zu viele parasitäre Entladungen aufwies und der Materialabtrag in das Bulkvolumen inakzeptabel hoch war. Die weitere Konzipierung mit Kunststoff wird daher beibehalten. Ähnlich verhält es sich mit den getesteten Elektrodenmaterialien. Reine Wolframschweißelektroden zeigten sich am beständigsten und am wenigsten von Materialabtrag betroffen.

Die alternativ festgelegten Parameter für einen erfolgreichen Zellwandaufschluss (Trockenmasse, Phycocyanin- und Chlorophyllgehalt) haben sich als stabile Marker erwiesen und können als Ersatz für den quantitativen Proteinnachweis eingesetzt werden. Die Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration konnten keinen erhöhten Werte detektiert werden, so dass eine Störung durch freie Radikale ausgeschlossen werden. Die Ursache für die fehlerhaften Werte der verschiedenen Assays konnte nicht gefunden werden. Eine mikroskopische Untersuchung der aufgeschlossenen Biomasse konnte aufgrund technischer Probleme am INP nicht wie geplant durchgeführt werden. Dennoch sind die o.g. Parameter aussagekräftig und belastbar und korrelieren gut mit dem vom IGV bestimmten Aufschlusskriterien.

Zur Verbesserung des Aufchlusses wurde auch die Pulsfrequenz variiert, insbesondere angehoben. Es konnte festgestellt werden, dass eine Anhebung auf 11Hz die beste Einstellung ist, um die Algen optimal aufzuschließen, ohne dabei in zu hohe Temperaturbereiche im Bulk zu erhalten, welche sich

negativ auf thermisch instabile Bestandteile des Extraktes auswirken würden. Gleichzeitig bleibt der Elektrodenabrieb in einem vertretbaren Rahmen. Behandlungen mit 20 Hz zeigten zwar eine leicht bessere Ausbeute, allerdings war hier der Temperaturanstieg zu hoch und der Elektrodenabrieb nicht mehr tolerierbar. Hervorzuheben ist der Zusammenhang zwischen Pulsfrequenz und Extrahierbarkeit von Phycocyanin. Hier ist die Ausbeute frequenzabhängig, da ab 11Hz sich der Überstand der Algensuspension blau einfärbt, ohne den Zusatz von Additiven (Abbildung 53). Dies ist insofern interessant, da Phycocyanin ein nichttoxischer Lebensmittelfarbstoff ist, dessen industrieller Absatz sich in den letzten Jahren stark erhöht hat².

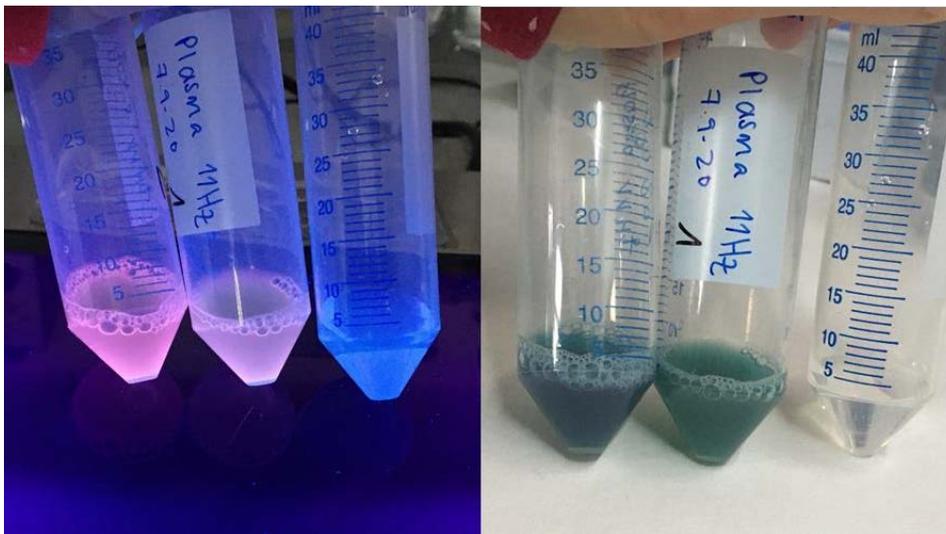


Abbildung 53: Phycocyaninrohextrakt im Vergleich zu Kontrolle unter UV-Licht (linkes Bild) und der Rohextrakt bei Taglicht im Vergleich zur Kontrolle (rechtes Bild).

Zur Energieoptimierung wurden verschiedene Hochspannungspulsweiten, welche sich durch verschieden oft gewickelte Kuperspulen zwischen den Kondensatoren des Pulsgenerators erzeugen lassen, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mit kurzen Pulsen (hier 77ns \cong 4er Wicklung) etwa gleich gute Ergebnisse für die Extraktausbeute erzielt werden konnten, wie für die im Standardexperiment gewählten 100 ns (\cong 8er Wicklung). Lediglich in der Qualität des Extraktes konnten leichte Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 54), welche sich in der Wiederholung der zwei vielversprechendsten Pulsweiten nicht bestätigt werden konnte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch sehr kurze Pulse mit weniger Energieeintrag gute Extraktionsergebnisse erzielen (Abbildung 55). Für die Konzipierung der nächstgrößeren Module flossen diese Ergebnisse mit ein.

² Die Zeit, Nr. 42/2019

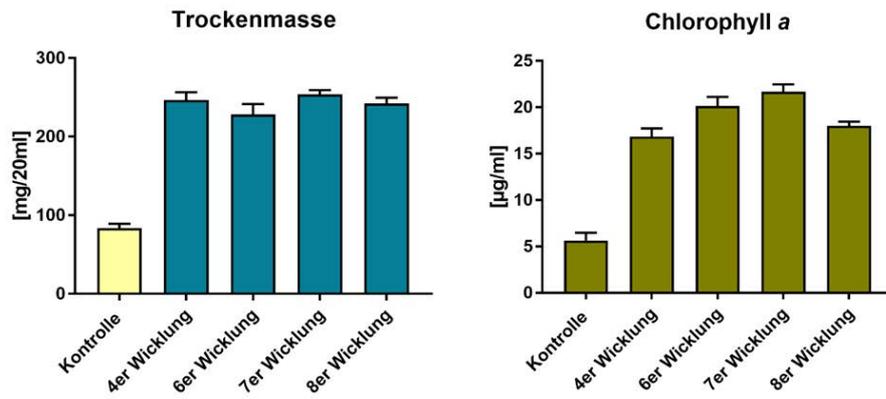


Abbildung 54: Erste Experimente zum Vergleich der Pulsängen in Bezug auf Trockenmasseausbeute, sowie den Chlorophyllgehalt.

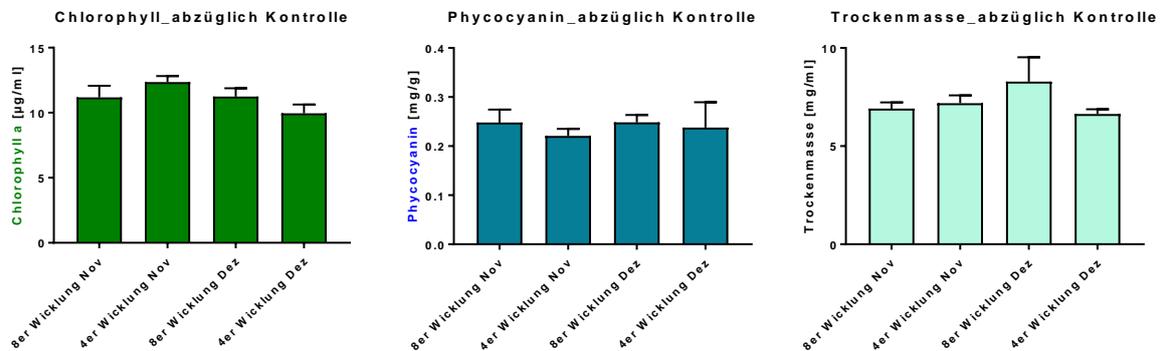


Abbildung 55: Vergleich der Parameter Chlorophyll-, Phycocyaningehalt und Trockenmasse nach Behandlung mit kurzen Hochspannungspulsen (4er Wicklung, 77ns) und längeren Hochspannungspulsen (8er Wicklung, 100ns).

Der für das konzipierte 1-Liter System bestimmbare Energieeintrag wird bei jedem Experiment aufgenommen. Mit den für dieses System optimalen Betriebsparameter in Verbindung mit den zu verwendeten realen Leitwerten und Trockenmassen, beträgt der Energieeintrag im Schnitt 0,6J/ Puls (beispielhaft in Abbildung dargestellt) bzw. ca. 12kJ pro Behandlungsdurchgang. Dies entspräche einer Behandlungsenergie von $\sim 670\text{kWh/t}$ Trockenmasse.

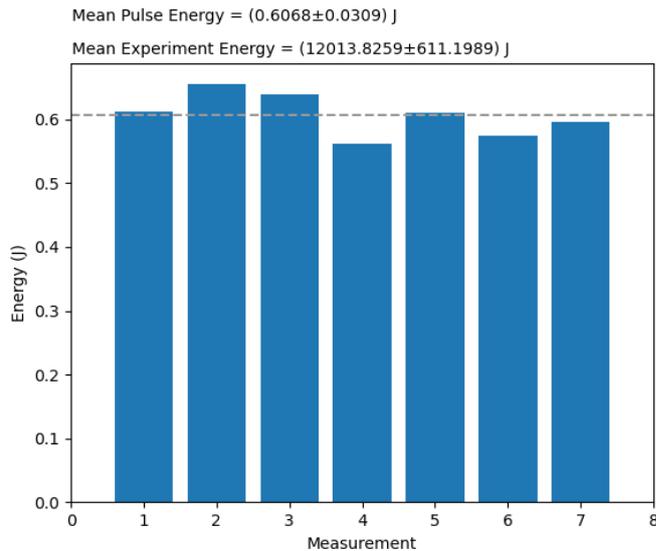


Abbildung 56: Eingetragene Energie pro Puls bzw. Gesamtenergie für 7 unabhängige Experimente.

Vor der Neuauslegung des Aufschlusssystems wurden, wie erwähnt, mehrere technische Parameter evaluiert und angepasst.

Aus mehreren Versuchen kristallisierte sich heraus, dass das Durchflussvolumen an das Volumen der Biomasse angepasst werden muss, beispielsweise sollte bei der Behandlung von 1 Liter auch ein Durchfluss von 1l/min an der Peristaltikpumpe eingestellt werden. Als optimale Behandlungsdauer hat sich eine Zeitspanne von je 30 Minuten pro Liter herausgestellt. Die Ergebnisse des INPs sind in Abbildung 57 dargestellt, sowie in Abbildung 58 die Analysenergebnisse des IGV

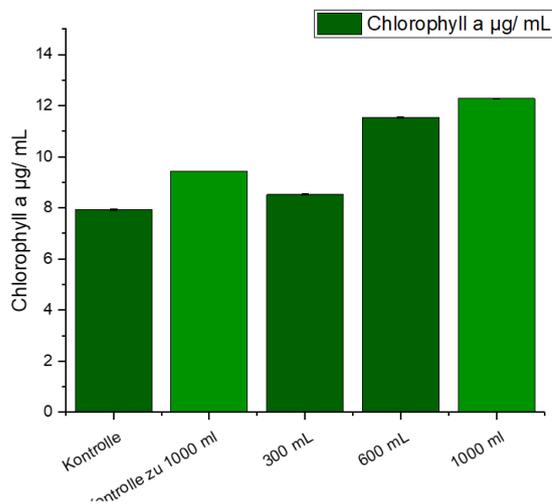


Abbildung 57 Chlorophyllgehalt der Durchflussversuche nach 30 Minuten Behandlungszeit. Als ideal hat sich eine Durchflussrate von 1L/min herausgestellt.

Analyseergebnisse zur Optimierung der Durchflusszeiten – Cyanidium

Probe	Verfahrensschritte					Analysierte Parameter				
						TM		Polyphenole		
	GT	PA	EA	EX	Z	g/100ml	SD %	mg/100ml	SD %	% i.T. berechnet
1 Lot: 200421	x	-	-	x	x	2,41	1,96	21,7	3,1	0,90
2 Lot: 270421_300*	x	x	x	x	x	3,75	1,01	58,5	3,5	1,56
3 Lot: 270421_600*	x	x	x	x	x	3,72	0,56	61,9	1,7	1,67
4 Lot: 260521_1000	x	x	x	x	x	3,87	0,83	81,5	1,6	2,1

* Suspension teilweise gefroren

Lot: 270421_300 Plasmaaufschluss 300 ml/min
 Lot: 270421_600 Plasmaaufschluss 600 ml/min
 Lot: 260521_1000 Plasmaaufschluss 1000 ml/min

Abbildung 58 Analyseergebnisse des IGV aus den Durchflussexperimenten.

Bei den Untersuchungen zum Elektrodenmaterial hat sich herausgestellt, dass das bereits verwendete reine Wolfram das beständigste Material mit geringen Materialabtrag ist (siehe Abbildung 59 und Abbildung 60, links). Ein Temperaturprofil der Flüssigkeit während der Plasmabehandlung wurde ebenfalls erstellt und ist in der Abbildung 60, rechts dargestellt. Gut zu erkennen ist, dass es nur geringe Unterschiede im Temperaturprofil gibt. Im Laufe der Untersuchung stellte sich aber klar heraus, dass die Legierungen deutlich instabiler sind, vor allem die Wolfram-Zirkon-Verbindung war besonders spröde. Aus diesen Erkenntnissen heraus und nach Beratung durch Materialwissenschaftler und Schweißfachingenieuren wird das System weiterhin mit reinen Wolframelektroden betrieben, da es die beständigste und kostengünstigste Variante darstellt.

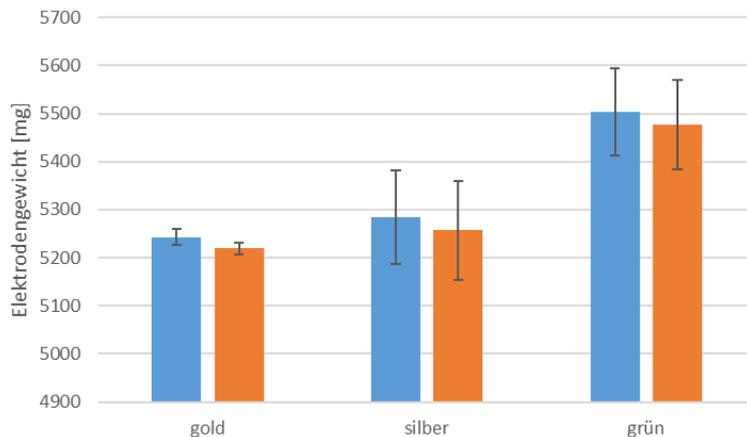


Abbildung 59: Materialabtrag verschiedener Wolframlegierungen vor (blaue Balken) und nach Plasmabehandlung (orangefarbene Balken).

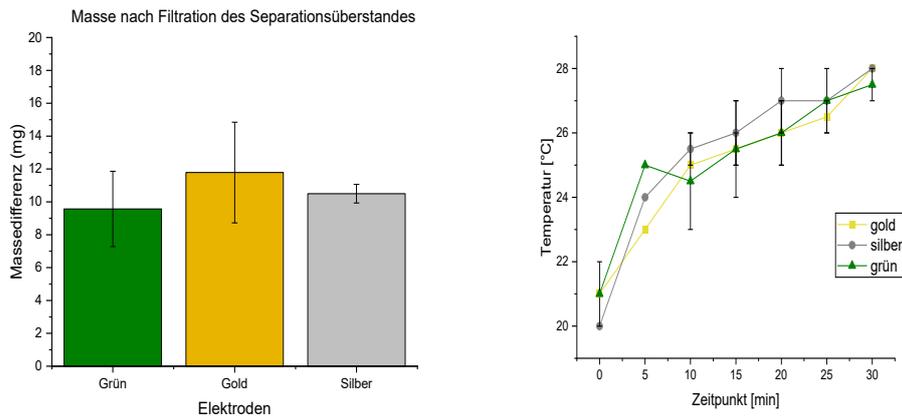


Abbildung 60: Links: Massedifferenz nach Plasmabehandlung der verschiedenen Wolframlegierungen. Rechts: Temperaturprofil der Flüssigkeit mit den jeweiligen Wolframelektroden im Laufe einer Plasmabehandlung.

Ein weiterer Untersuchungsgegenstand waren verschiedene Elektrodengeometrien. Plan geschliffene und im 45° Winkel chemisch geschliffene Elektroden verschiedener Durchmesser wurden überprüft. Einschließlich des 1-Liter Moduls (Meilenstein 1) wurden standardmäßig 1 mm Elektroden verwendet, die sich jedoch recht schnell abtragen und daher häufig während des Aufschlusses der Abstand zueinander nachjustiert werden musste. Daher wurde untersucht, ob größere Durchmesser ein günstigeres Abbrandverhalten zeigen, bzw. ob sie auch eine geringere Durchbruchspannung und somit weniger Energie zur Plasmazündung benötigen.

In Abbildung 61 sind die Ausbeuten an Phycocyanin und Chlorophyll *a* Gehalten unter Verwendung verschiedener Elektrodengeometrien und –durchmessern dargestellt. Zu erkennen ist, dass die besten Ergebnisse mithilfe von 2 mm und 3 mm dicken, plan geschliffenen Elektroden erzielt wurden. Beim Phycocyaningehalt konnten auch angespitzte 3 mm Elektroden sehr gute Ergebnisse erzielen, allerdings hat sich bei Betrachtung der Elektrodenköpfe herausgestellt, dass die Spitze innerhalb weniger Minuten unter Plasmabehandlung vollständig abbrennt. Zu diesem Zweck wurden Aufnahmen sämtlicher Elektrodenköpfe mit einem 3D-Mikroskop vor und nach Plasmabehandlung erstellt. Beispielhaft sind in Abbildung 62 die angespitzten 3 mm Elektroden dargestellt, in welcher zu erkennen ist, dass die Spitze nach der Plasmabehandlung gänzlich fehlt. In Abbildung 63 sind dagegen Aufnahmen der planaren 2 mm Elektroden dargestellt, auf denen gut zu erkennen ist, dass sich auf der Elektrodenoberfläche kaum etwas ändert. Lediglich die Spuren des Schleifens sind abgetragen worden, was aber keinen Einfluss auf das Plasmaverhalten hat.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde dann die eingetragene Energie pro Hochspannungspuls für die jeweilige Elektrodengeometrie bestimmt und ist in Kombination mit dem entsprechenden Masseabtrag in Abbildung 64 aufgetragen. Den geringsten Masseabtrag verzeichnete die Kombination zweier planarer Elektroden mit jeweils 2 mm Durchmesser, obwohl der Energieeintrag verhältnismäßig hoch ist. Augenscheinlich ist die Kombination 3 mm angespitzt-zu-angespitzt die ideal, jedoch lässt sich aus den oben genannten Ergebnissen ableiten, dass dies nicht der Fall ist. Generell kann man aus den Mikroskopaufnahmen schließen, dass angespitzte Elektroden zu schnell abbrennen, ein Anschleifen ist damit nicht zielführend und kann unterlassen werden. Unter Berücksichtigung aller Daten sind zwei

planare Elektroden mit 2 mm Durchmesser die am günstigsten Kombination und sind für größere Module empfehlenswert. Größere Durchmesser erschweren zudem eine saubere Plasmazündung und ist bei $\varnothing > 3$ mm in diesem System nur unter großem Energieaufwand möglich.

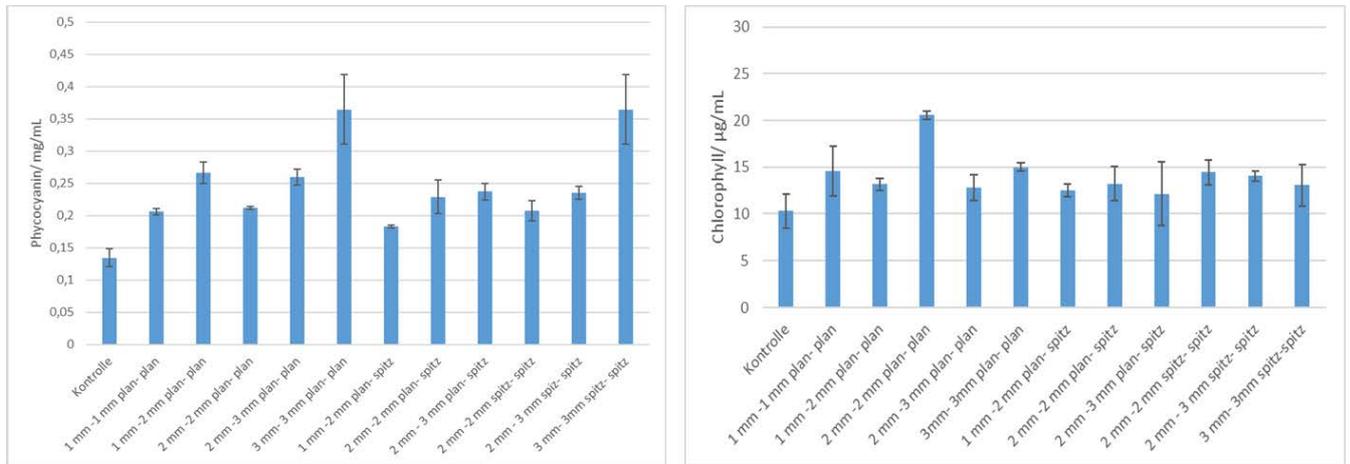


Abbildung 61: Ausbeuten an Phycocyanin und Chlorophyll a unter Verwendung verschiedener Elektrodengeometrien und -durchmesser

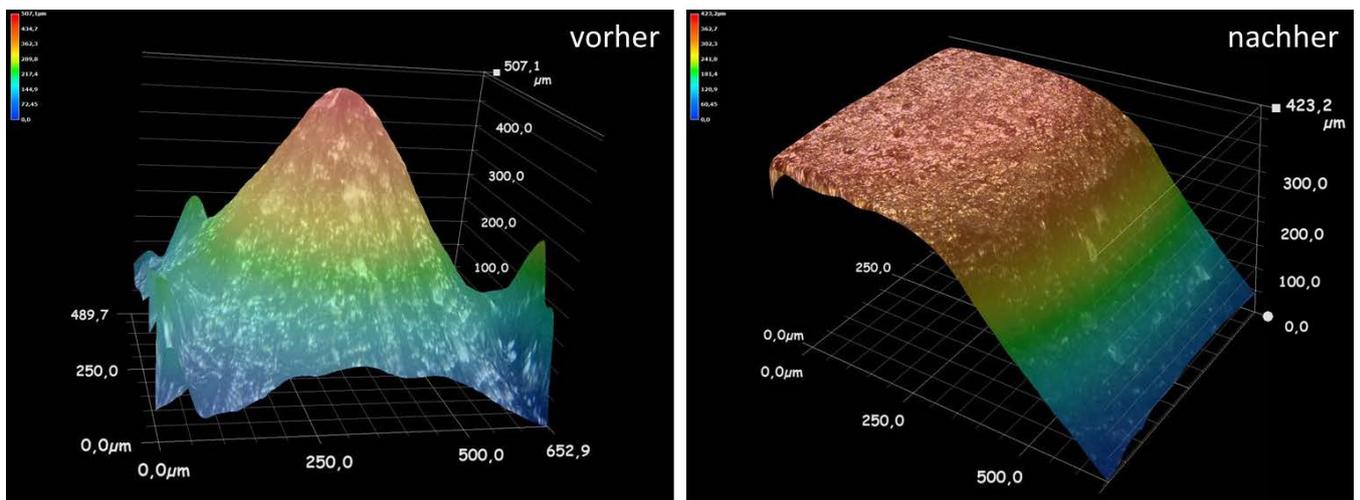


Abbildung 62: 3D Darstellung der angespitzten 3 mm Elektroden vor (links) und nach (rechts) Plasmabehandlung.

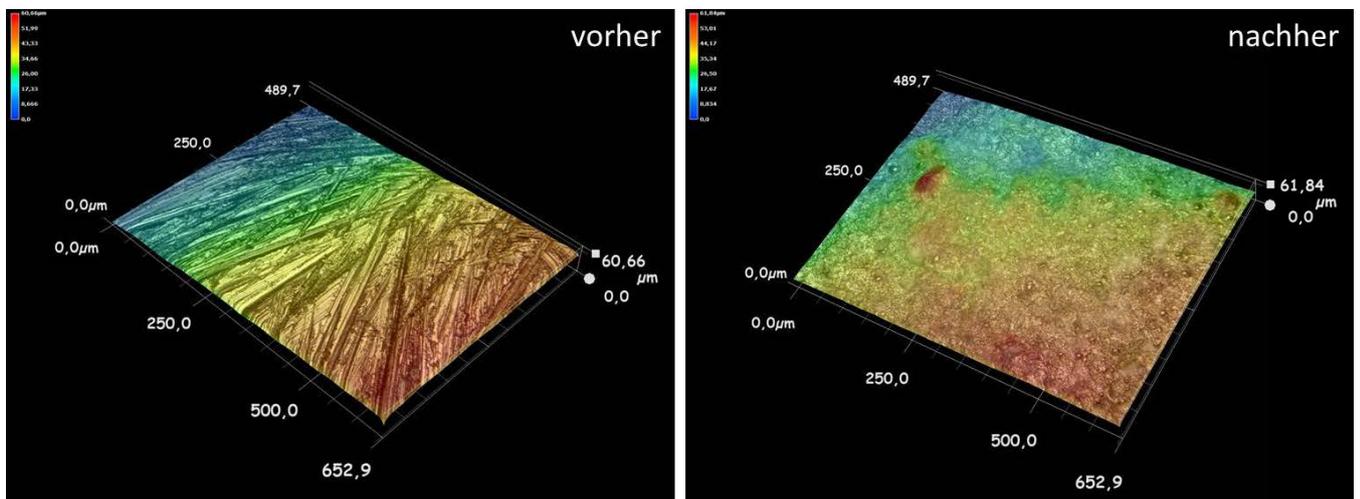


Abbildung 63: 3D Darstellung der planaren 2 mm Elektroden vor (links) und nach (rechts) Plasmabehandlung.

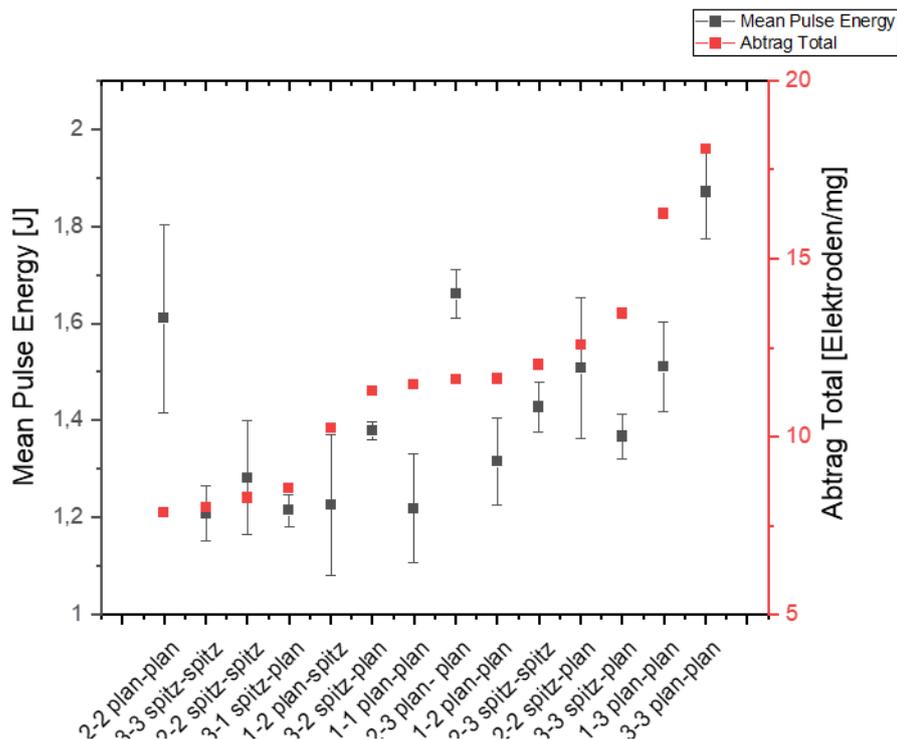


Abbildung 64: Eingetragene Energie pro Puls im Verhältnis zum Masseabtrag der jeweiligen Elektrodengeometrie.

Hinsichtlich der getesteten Hohlelektroden waren die Ergebnisse nicht überzeugend. Zwar konnte in der Kombination Hohlelektrode 4 mm – Vollelektrode 2 mm eine im Vergleich zur Kontrolle gesteigerte Phycocyaninausbeute erzielt werden (Abbildung 65, links), allerdings war der Masseabtrag der Vollelektrode sehr hoch (Abbildung 65, rechts). In der Kombination Hohlelektrode 4 mm – Hohlelektrode 4 mm konnte dagegen keine nennenswerte Extraktausbeute erzielt werden, obwohl der Masseabtrag etwas geringer war als in der Kombination Hohl- zu Vollelektrode (siehe Abbildung 66). Hauptursache dafür sind die extrem starke Beanspruchung der Hohlelektrode. Wie in Abbildung 67 beispielhaft zu erkennen ist, fehlen nach der Plasmabehandlung größere Metallstücke an der Elektrode, bzw. sind auch Risse auf der Oberfläche erkennbar (rechtes Bild).

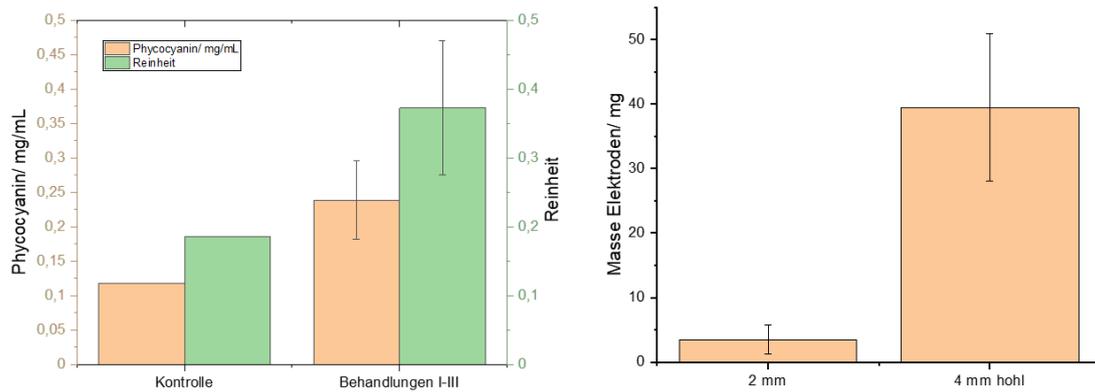


Abbildung 65: Phycocyaningehalt (links) nach Plasmaaufschluss mittels Voll- und Hohlelektrode, \varnothing 2 mm bzw. 4 mm, sowie deren Masseabtrag während der Plasmabehandlung (rechts).

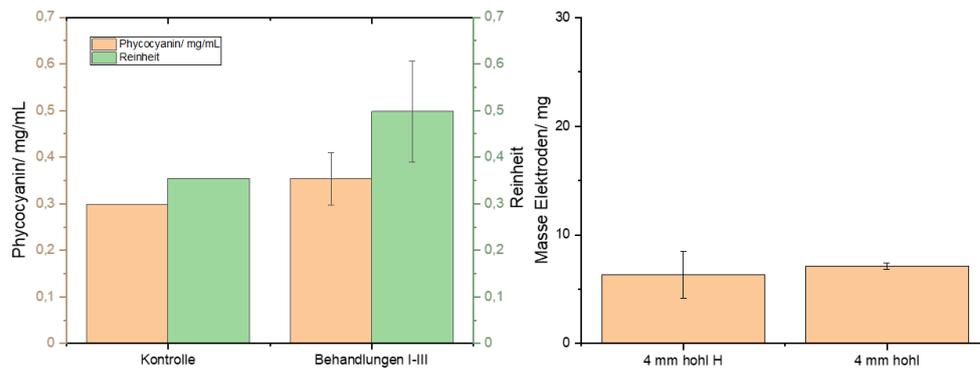


Abbildung 66: Phycocyaningehalt (links) nach Plasmaaufschluss mittels zweier Hohlelektroden, \varnothing 4 mm, sowie deren Masseabtrag während der Plasmabehandlung (rechts).

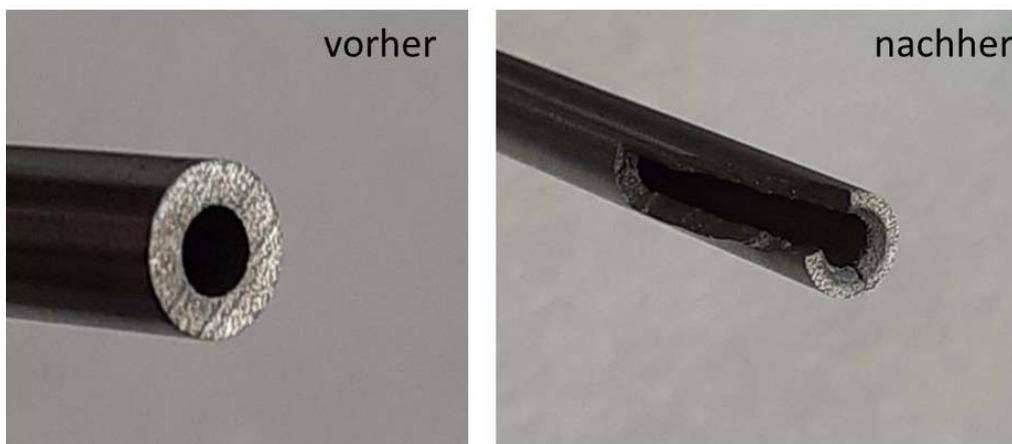


Abbildung 67: Hohlelektrode vor (links) und nach Plasmabehandlung (rechts).

Auffällig bei allen Versuchen ist das stetige Ansteigen der Werte der unbehandelten Kontrollen für nahezu alle Versuche. Beispielhaft kann dies anhand der Daten aus einem Versuch ersehen werden, bei dem untersucht werden sollte, ob der Plasmaaufschluss allein diesem Effekt unterliegt oder auch andere physikalische Methoden. In Tabelle 14 ist der vergleichende Aufschluss zwischen unbehandelter Kontrolle, Plasma- und Ultraschallaufschluss dargestellt.

Probe	Analysierte Parameter										
	Extrakt-Trockenmasse		Polyphenole			GABA			Protein		
	g/100ml	SD %	mg/100ml	% i.T.	SD %	mg/100ml	% i.T.	SD %	mg/100ml	% i.T.	SD %
1 Lot: 101121 Kontrolle	2,30	3,5	21,2	0,9	2,4	29,1	1,26		621	27,0	2,05
2 Lot: 101121 PA_1	2,24	4,0	20,9	0,9	1,2	29,4	1,31		566	25,3	1,51
3 Lot: 101121 PA_2	2,24	4,1	21,1	0,9	2,8	29,9	1,33		592	26,4	2,75
4 Lot: 101121 PA_3	2,17	4,7	21,6	1,0	0,9	29,3	1,35		594	27,4	0,90
5 Lot: 171121 US_1	2,43	3,2	20,8	0,9	3,0	28,8	1,19		544	22,4	0,50
6 Lot: 171121 US_2	2,36	1,3	22,3	0,9	6,1	27,1	1,15		529	22,4	1,11
7 Lot: 171121 US_3	2,39	1,3	21,0	0,9	2,1	32,3	1,35		536	22,4	1,37

Tabelle 14 Vergleichsexperiment zwischen unbehandelter Kontrolle, Plasma- (PA) und Ultraschallaufschluss (US). N=3

Für den Testlauf des 5-Liter Moduls wurde die zuvor gefrorene Biomasse über mehrere Tage aufgetaut. Aus den Durchflussexperimenten wäre eine Einstellung der Durchflussrate von 5L/min notwendig gewesen, da aber aus zeitlichen und monetären Gründen keine größere Pumpe seitens des INPs angeschafft werden konnte, wurde die Behandlungszeit dementsprechend wieder heraufgesetzt. Ziel der Untersuchung war vor allem die Funktionstüchtigkeit des Systems zu prüfen, sowie die Überprüfung eines adäquaten Aufschlusses in einem rationalen Zeitrahmen. Der Ausgangsleitwert der zu untersuchenden Substanz lag bei über 2,5 mS/cm, also über dem üblichen gelieferten Werten. Dennoch hat die Plasmazündung einwandfrei funktioniert, so dass auch bei diesem Aufbau sich die Konzeption des 1-Liter Modells sich bewährt hat. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der Leitsubstanzen dargestellt. Der Aufschluss wurde aufgrund der aktuellen Pandemielage wieder am INP durchgeführt, da eine Überführung des Systems ans IGV nicht möglich war. Die Analyse des Extraktes wurde in bewährter Weise vom IGV durchgeführt und die Ergebnisse dem INP zur Verfügung gestellt. Vergleicht man die unbehandelte Kontrolle (Versuch 1) mit dem Plasmaaufschluss (Versuch 3), so kann man eine

deutliche Steigerung der Leitsubstanzen erkennen, vor allem beim Proteingehalt (629 mg/100 ml versus 1255 mg/100 ml) und beim Polyphenolgehalt (28,3 mg/100 ml versus 41,8 mg/100 ml). Zwar ist der Plasmaaufschluss dem Original wenig unterlegen, aber dennoch als gleichwertig zu betrachten. Vor allem beweisen die Ergebnisse, dass eine Skalierung des Systems erfolgreich gewesen ist.

Versuchsaufbau PA 5L-Reaktor (INP) – Cyanidium Klötze Scale up

02/2022

Probe	Verfahrensschritte						Analysierte Parameter						
							TM	Polyphenole		GABA		Protein	
	GT	PA	GT	EA	EX	Z	g/100ml	mg/100ml	% i.T.	mg/100ml	% i.T.	mg/100ml	% i.T.
1 Lot: 250122 Basis 500 ml	x	-	-	-	x	x	2,16	28,3	1,3	28,0	1,30	629	29,1
2 Lot: 250122_ALK Original 500 ml	x	-	-	x	x	x	3,05	50,4	1,65	-	-	1.380	45,25
3 Lot: 010222_5000 PA Ultrafiltriert	x	x	-	x	x	x	2,60	41,8	1,5	38,6	1,48	1.255	48,3

Tabelle 15 Ergebnisse aus dem 5-Liter Versuch

3. Diskussion

Nach ausführlicher Testung der realen Biomasse, die vom IGV verwendet wird, konnte anhand der ermittelten Parameter ein 1-Liter System und mit den daraus gewonnenen Erkenntnissen ein 5-Liter Modul konzipiert und entwickelt werden.

Die zu verarbeitenden Biomassedichten stellten kein Problem dar, da die Plasmareaktoren insofern verändert wurden, als dass der Innenraum des Reaktors eine sphärische Form bekam. Dies hat zur Folge, dass die zum Aufschluss benötigten Schockwellen reflektiert und somit verstärkt werden. Der Aufschluss ist damit unabhängig von der Biomassedichte. Die Plasmazündung bei höheren Leitwerten konnte ebenfalls gelöst werden. Die Algenmasse kann somit nach dem regulären Ernteprozedere in das Plasmasystem eingeleitet werden.

Zudem hat sich gezeigt, dass eine kontinuierliche Behandlung im Durchflusssystem bei Beachtung der maximal anwendbaren Pulsfrequenz sich am besten eignet, da somit eine Umwälzung und damit Kühlung der Suspension ohne externe Kühlung möglich ist. Dies ist im Hinblick auf ökonomische Faktoren wichtig.

Als einzusetzendes Material für den Plasmareaktor als auch Elektrodenmaterial wird weiterhin, wie erwähnt, Kunststoff bzw. Wolfram eingesetzt. Diese Materialien hatte sich als besonders beständig und abriebfest erwiesen und sind in der Anschaffung kostengünstig. Die Gleichspannungsquelle, welche die benötigte Spannung für den Pulsgenerator liefert, wurde in der nächsten Konzipierung durch mehrere günstigere Modelle ersetzt, da die derzeitige Quelle für eine Skalierung sehr kostenintensiv wäre und größere Module allein nicht mehr mit ausreichend Spannung versorgen könnte.

Generell unterliegen diese Daten Schwankungen, da es sich bei den Mikroalgen um biologische Systeme handelt. Auch können Einflüsse von außen, z.B. Lichteinfall, Temperatur, Einfluss auf das Wachstum und damit das Exprimieren von primären und sekundären Metaboliten haben. Allerdings handelt es sich bei diesen Versuchen mit ein und derselben Charge, so dass diese Schwankungen nicht in der Form auftreten sollten. Als mögliche Hauptursache kann das Lagern der Biomasse im gefrorenen Zustand ausgemacht werden. Offenkundig wird die Zellwand beim Lagern bei mindestens -20°C über viele Wochen soweit geschwächt, so dass sie kaum noch Angriffsfläche für eine physikalische Aufschlussmethode bietet. Als extremen Fall konnte der Vergleich zwischen unbehandelter Kontrolle, Plasmaaufschluss und Ultraschallaufschluss dargestellt werden. Hier war sehr gut zu erkennen, dass es kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsschemata und der Kontrolle gibt. Als Handlungsempfehlung ergibt sich daraus, dass ein Plasmaaufschluss oder ein anderer physikalischer Aufschluss am besten vor der Einlagerung durchgeführt wird und den anschließenden, notwendigen Auftauprozess nach Lagerende als weitere „natürliche“ Unterstützung im Zellaufschluss zu nutzen. Interessanter Weise konnten diesbezüglich auch Effekte auf Leitsubstanzen festgestellt werden (hier nicht dargestellt). So ergibt der Plasmaaufschluss vitaler Algenzellen nennenswerte Ausbeuten am blauen Farbstoff Phycocyanin, welcher sich nach Behandlung im Überstand befindet und abzentrifugiert werden kann. Jedoch bleibt die Blaufärbung und damit das Vorhandensein von Phycocyanin aus, wenn die zuvor eingefrorene Biomasse nach dem Auftauen mechanisch (z.B. mittels Ultraschall oder Plasma) aufgeschlossen wird. Eine Ursache dafür konnte im Rahmen des Projektes nicht gefunden werden, es empfiehlt sich aber, dies im Sinne der Grundlagenforschung weiter zu verfolgen. Es unterstreicht dennoch die Empfehlung die vitale Biomasse vor dem Einfrieren aufzuschließen um auch temperatursensitive Stoffe erfolgreich zu extrahieren.

Bezugnehmend auf den Skalierungsschritt zum 5-Liter Modul hat sich gezeigt, dass die Technik durchaus im Industriemaßstab anwendbar ist. Die Energieversorgung wurde so konzipiert, dass eine

weitere Skalierung kostengünstig möglich ist. Pandemiebedingt konnte eine weitere Skalierung im Rahmen des Projektes nicht mehr zufriedenstellend realisiert werden, daher wurde das 5-Liter System besonders sorgfältig auf seine Skalierbarkeit ausgelegt. Eine Erweiterung um ein oder mehrere Module ist nun problemlos möglich. Für einen Einsatz im Großmaßstab sollte die Elektrodenkonfiguration sowie deren automatische Ansteuerung noch einmal überdacht und neu konzipiert werden. Hier hat eine Literaturrecherche bereits neue Impulse gegeben, welche in weiterführenden Projekten gemeinsam mit dem IGV realisiert werden könnten. Diesbezüglich ist noch vielversprechendes Potential da und sollte auch anhand der derzeitigen Extraktergebnisse in Betracht gezogen werden.

Aus wissenschaftlichem Interesse heraus wurden im Verlauf des Projektes zwei weitere Mikroalgen aus dem Portfolio des IGVs auf ihre Extrahierbarkeit hin untersucht. Untersucht wurden die vitalen Biomassen von *Chlorella vulgaris* und *Porphyridium cruentum*. Auch bei diesen Mikroalgen konnten beeindruckende Ergebnisse bei den Extraktausbeuten gewonnen werden. So konnte in einem Vorversuch gezeigt werden, dass sich die Menge an antimikrobiell wirksamen Polysacchariden aus *Porphyridium cruentum* durch den Plasmaaufschluss deutlich gesteigert werden konnte. Auch der rote Farbstoff Phycoerythrin konnte ähnlich leicht wie das Phycocyanin aus der Projektalge extrahiert werden. Aus *Chlorella vulgaris* konnte nach Plasmabehandlung eine gesteigerte Ausbeute an Vitamin B12 erzielt werden. Dies beweist auch, dass das Aufschlussverfahren sich nicht auf eine Algenart beschränkt, sondern breit eingesetzt werden kann. Bei Salzwasser-algen müsste lediglich die Spannungsversorgung angepasst werden, da bei höheren Leitwerten einer Flüssigkeit die Durchbruchsspannung heraufgesetzt ist und mehr Energie in das System eingespeist werden muss. Interessant wäre es, dies in Rahmen eines Folgeprojektes zu untersuchen.

Die Zusammenarbeit im dem IGV gestaltet sich außerordentlich konstruktiv und auf Schwierigkeiten wird zeitnah seitens des IGVs reagiert. Der Stand der Arbeitspakete wurde in regelmäßigen, gemeinsamen Onlinemeetings ausgetauscht, wobei auch hier die fachlichen Diskussionen immer zielführend und nutzbringend waren. Aufgrund der derzeitigen Pandemielage waren die beiden Projektpartner darauf angewiesen, Biomasse seitens des IGVs zu versenden und am INP aufschließen zu lassen, wobei nach Aufschluss die Biomasse zurück an das IGV zur Analyse versendet wurden. Auch dieses Vorgehen hatte sich bewährt und stellte daher in der derzeitigen allgemeinen Lage einen gute Alternative dar. Die erzielten Ergebnisse wurden vorab per E-Mail kommuniziert und ausführlich bei den Onlinemeetings besprochen, um so Probleme oder Wünsche besprechen und umsetzen zu können.

4. Öffentlichkeitsarbeit

Zielstellung und Projektinhalte sind auf der IGV Website veröffentlicht worden. Unter Berücksichtigung der Geheimhaltungsvereinbarung ist geplant, Teile der Ergebnisse im Oktober 2022 auf dem *4th World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine, and Food & Environmental Technologies* in Kopenhagen vorzustellen. Dessen Stattfinden ist jedoch stark vom derzeitigen globalen Pandemiegeschehen abhängig, so dass durchaus die Möglichkeit besteht, dass der Kongress auf nächstes Jahr verschoben werden muss und damit die Präsentation des Projektes.

In der Fachzeitschrift *KOSMETIK International* 06/2021 wurde im Artikel „Algen-Wunderwaffen“ über das Projektvorhaben berichtet.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit einer Publikation, vor allem im Hinblick auf das Extraktergebnis, dessen Analyse durch das IGV detailliert durchgeführt wird. Hier ließen sich die analytischen Ergebnisse mit den technisch variierten Parameter gut korrelieren und der Fachwelt zur Verfügung zu stellen.

Aus dem „Zufallsfund“ Phycocyanin konnte seitens des INPs eine Publikation zur Grundlagenforschung in einem Special Issue des *Microorganisms*-Journals (impact factor 4.167) dieses Manuskript publiziert werden: *Sommer, M. C., Balazinski, M., Rataj, R., Wenske, S., Kolb, J. F., & Zocher, K. (2021). Assessment of Phycocyanin Extraction from Cyanidium caldarium by Spark Discharges, Compared to Freeze-Thaw Cycles, Sonication, and Pulsed Electric Fields. Microorganisms, 9(7), 1452*

5. Fazit

Die Arbeiten erfolgten im Berichtszeitraum inhaltlich entsprechend der im Projektantrag bestätigten Arbeitspakete. Die Meilensteine des Projektes wurden inhaltlich voll erfüllt und termingemäß erreicht. Durch Integration der Plasmatechnologie im Herstellungsverfahren des Markenproduktes wird eine deutliche Steigerung im Extraktionsergebnis erreicht. Das zeigt sich sowohl in einer Erhöhung der Extraktausbeute (Trockenmasse) als auch in der Optimierung der Gehalte an bioaktiven Leitsubstanzen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Skalierung des Systems möglich ist, sowie eine Steigerung der Extraktausbeuten, auch unter ökonomischen Gesichtspunkten, möglich ist. Das Aufschlusssystem wurde so konzipiert, dass eine Erweiterung um weitere Module nicht nur möglich ist, sondern auch mit einer Energieversorgung ausgestattet wurde, die kostengünstig erweitert werden kann. Der Energieeintrag in das System steigt mit zunehmenden Behandlungsvolumen nur marginal an.

Die bislang erzielten Erkenntnisse bilden die Basis für weiterführende Projektideen. So ist bereits geplant, das neue Plasma basierte Aufschlusssystem in einem Forschungsprojekt zur Gewinnung eines Vitamin B12 haltigen Kaltextraktes aus der Mikroalge *Chlorella vulgaris* einzusetzen, zu testen bzw. auch weiter zu entwickeln. Ebenso hat sich gezeigt, dass die Ausbeute an antimikrobiell wirksamen Polysacchariden aus *Porphyridium cruentum* durch das Plasmaverfahren deutlich gesteigert werden konnte. Auch hier bietet sich weitere Untersuchungen im Rahmen eines Projektes an und wurde bereits zwischen den beiden Projektpartnern vereinbart.

Coronabedingt fanden Projekttreffen nicht vor Ort, sondern als Onlinemeetings statt. Die Zusammenarbeit zwischen den Partnern kann als sehr erfolgreich eingeschätzt werden.

Probe	Verfahrensschritte						Analysierte Parameter/Leitsubstanzen im Extrakt							
	GT	PA	GT	EA	EX	Z	TM g/100ml	Polyphenole mg/100ml % i.TM		GABA mg/100ml % i.TM		Protein mg/100ml % i.TM		
11 11Hz_ Alk	-	x	-	x	x	x	3,40	56,5	1,66	52,0	1,53	1.400	41,18	
12 11 Hz	-	x	-	-	x	x	1,85	17,0	0,92	40,5	2,19	443	23,95	
13 20 Hz	-	x	-	-	x	x	1,66	18,5	1,11	37,4	2,25	512	30,84	
14 20Hz_ Alk	-	x	-	x	x	x	3,10	55,9	1,80	58,3	1,88	1.360	43,87	
15 11Hz_ Alk	x	x	-	x	x	x	2,90	61,8	2,13	57,7	1,99	1.410	48,62	
16 11 Hz	x	x	-	-	x	x	1,95	19,4	1,00	40,7	2,09	547	28,05	
17 20Hz_ Alk	x	x	-	x	x	x	3,08	62,0	2,01	62,1	2,02	1.420	46,10	
18 20 Hz	x	x	-	-	x	x	1,80	21,2	0,69	37,6	2,09	561	31,17	
19 Original	x	-	-	x	x	x	2,89	42,9	1,49	110,0	3,81	1.161	40,17	
20 300 ml Alk	x	x	-	x	x	x	2,82	35,2	1,25	88,3	3,13	979,4	34,73	
21 600 ml Alk	x	x	-	x	x	x	2,79	37,2	1,33	95,1	3,41	978,8	35,08	
22 600 ml	x	x	-	-	x	x	2,24	23,1	1,03	78,8	3,52	663	29,60	
23 1000 ml Alk	x	x	-	x	x	x	2,59	39,1	1,51	92,1	3,58	1.033	39,88	

PA: Plasmaaufschluss
GT: Gefrier/Tau
EA: Enzymatischer Aufschluss

EX: Extraktion
Z: Zentrifugation
TM: Trockenmasse

Anlage 1



Extraktionsergebnisse: 1. Optimierung Durchflussrate / 2. 1L-PA Reaktor im IGV

Probe	Verfahrensschritte					Analysierte Parameter/Leitsubstanzen im Extrakt						
	GT	PA	EA	EX	Z	TM g/100ml	Polyphenole mg/100ml % i.TM		GABA mg/100ml % i.TM		Protein mg/100ml % i.TM	
1 Kontrolle	x	-	-	x	x	2,41	21,7	0,90	26,5	1,10	611	25,4
2 Original	x	-	x	x	x	3,60	65,1	1,81	52,3	1,45	1.387	1.387
3 300 ml/min	x	x	x	x	x	3,75	58,5	1,56	54,3	1,45	1.328	35,4
4 600 ml/min	x	x	x	x	x	3,72	61,9	1,67	69,2	1,86	1.352	36,3
5 1000 ml/min	x	x	x	x	x	3,87	81,5	2,10	65,6	1,70	1.637	42,3
PA im IGV: Durchfluss: 1000 ml/min, 500 ml Extraktherstellung												
1 Kontrolle	x	-	-	x	x	1,89	20,0	1,10	22,6	1,20	522	27,6
2 Original	x	-	x	x	x	4,34	114,4	2,6	34,8	0,80	2.282	52,6
3 + PA	x	x	x	x	x	3,83	94,9	2,5	33,1	0,86	1.881	49,1
4 - EA	x	x	-	x	x	1,92	21,1	1,1	23,8	1,24	885	35,7

➤ Aufstellung des 1L Plasmaaufschluss Reaktors am 11.08.2021 im IGV inklusive Unterweisung

PA: Plasmaaufschluss EX: Extraktion
 GT: Gefrier/Tau Z: Zentrifugation
 EA: Enzymatischer Aufschluss TM: Trockenmasse

Anlage 2



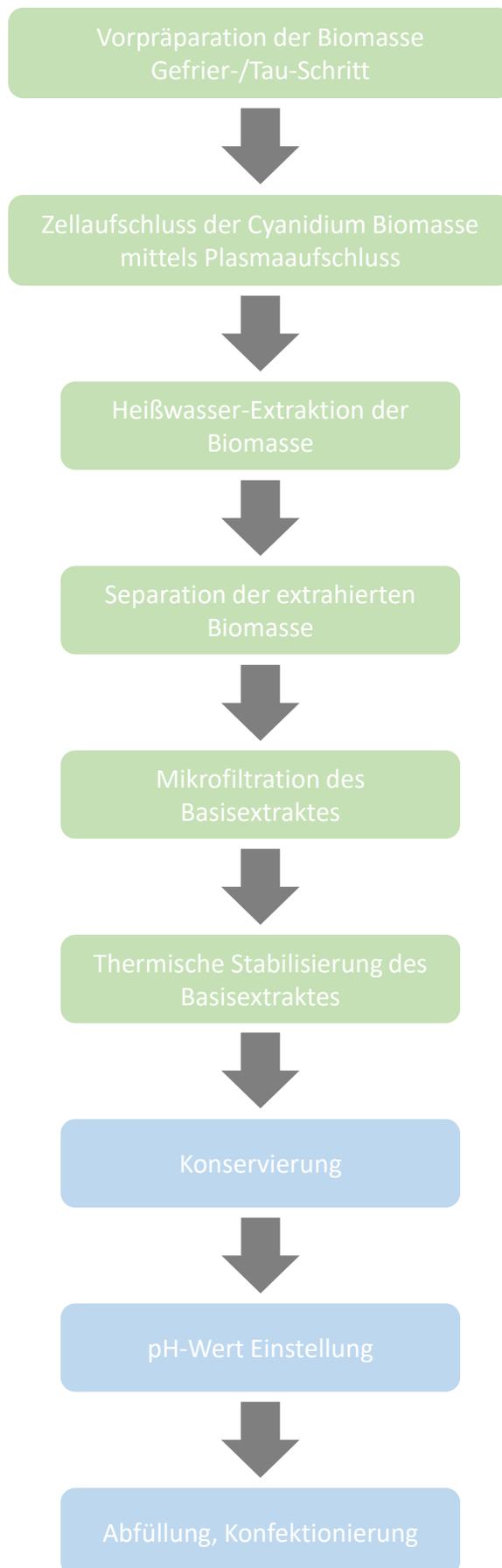
Certificate of Analysis

Anlage 3

Cyanidium Extract – Plasma digestion 1L-reactor

Batch Information				
IGV LOT – No.:		110821_1000 PA	Date of manufacturing:	11.08.2021
Batch quantity:		500 g	Storage condition:	10 - 20 °C in closed containers, dark as possible
Analysis data				
Test parameter	Result	Specification	Method	
Color	yellow-brown	yellow-brown	DAB 10 (V.6.2) visual examination	
Odour	characteristic smell	characteristic smell	DAB 10 (V.3.1.6) sensory	
Residue on drying	3.83 g/100 g	> 2.90 g/100 g	DAB 10 (V.6.22.N2) moisture analyser	
Density	1.017 g/cm ³	1.000 – 1.020 g/cm ³	DAB 10 (V6.4) pycnometer	
pH-Value	4.10	3.60 – 4.20	DAB 10 (V.6.3.1) potentiometric	
Colour (Gardner)	8.0	≤ 8.0	DIN EN ISO 4630 spectrophotometry	
Polyphenole Gallic acid equivalents	0,095 g/100 g	> 0.020 g/100 g	spectrophotometry according Folin Ciocalteu Assay	
Protein	1.88 g/100 g	> 0.05 g/100 g	ASU L 01.00-10/1:2016-03	
Minerals	0.43 g/100 g	> 0.25 < 1.00 g/100 g	ASU L 31.00-4:1997-01	
4 -Gamma-aminobutyric acid (GABA)	0.033 g/100 g	> 0.050 g/100 g	LC-MS/MS	
Heavy metals	n.a.	< 20 ppm	DIN EN ISO 15 586	
Arsenic	n.a.	< 2 ppm	DIN EN ISO 15 586	
Microbiology				
Total aerobic plate counts	≤ 100 cfu/g	≤ 100 cfu/g	Ph. Eur. 2.6.12	
Yeasts	≤ 10 cfu/g	≤ 10 cfu/g	Ph. Eur. 2.6.12	
Moulds	≤ 10 cfu/g	≤ 10 cfu/g	Ph. Eur. 2.6.12	
Specific microorganism <i>Escherichia coli</i> <i>Pseud. aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	absent/g absent/g absent/g	absent/g absent/g absent/g	Ph. Eur. 2.6.13 COLIPA – „Guidelines on Microbial Quality Management“	
Coliforms	≤ 10 cfu/g	≤ 10 cfu/g	ASU L 01.00-3 mod:1987-03	

Annedore Habel
Quality management officer



Anlage 4: Flow-Chart zur Herstellung des Cyanidium-Extraktes unter Anwendung des Plasmaaufschlussverfahrens