

Entwicklung und Bewertung eines Verfahrens zur  
Herstellung von Fucoxanthin und Eicosapentaensäure  
mit *Phaeodactylum tricornutum*

von der Fakultät 4 Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der  
Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der  
Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von  
Felix Derwenskus  
aus Bayreuth

Hauptberichter: Prof. Dr. Thomas Hirth  
1. Mitberichter: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten  
2. Mitberichter: Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2020

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie der  
Universität Stuttgart

2020



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst, lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel, verfasst habe.

---

Felix Derwenskus, Stuttgart den 31.03.2020



Diese Arbeit wurde im Rahmen des durch das Ministerium für Wissenschaft und Kunst (MWK), Baden-Württemberg, geförderten Forschungsprojektes „Integrierte Nutzung von Mikroalgen für die Ernährung“, Teilprojekt: „Entwicklung von Zellaufschluss- und Extraktionsverfahren zur Kaskadennutzung von Algenbiomasse“ (Az. 33-7533-10-5-93) und als Teil des begleitenden Graduiertenprogramms „BBW ForWerts“ angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in verschiedenen wissenschaftlichen Zeitschriften (sog. „peer-reviewed journals“) veröffentlicht:

**Derwenskus, F.**, Metz, F., Gille, A., Schmid-Staiger, U., Briviba, K., Schließmann, U., Hirth, T., 2019. Pressurized extraction of unsaturated fatty acids and carotenoids from wet *Chlorella vulgaris* and *Phaeodactylum tricorutum* biomass using subcritical liquids. *GCB Bioenergy* 11, 335–344. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12563>

**Neumann, U.<sup>(\*)</sup> und Derwenskus, F.<sup>(\*)</sup>**, Flaiz Flister, V., Schmid-Staiger, U., Hirth, T., Bischoff, S., 2019. Fucoxanthin, A Carotenoid Derived from *Phaeodactylum tricorutum* Exerts Antiproliferative and Antioxidant Activities In Vitro. *Antioxidants* 8, 183. <https://doi.org/10.3390/antiox8060183>; <sup>(\*)</sup> doppelte Erst-Autorenschaft.

Neumann, U., **Derwenskus, F.**, Gille, A., Louis, S., Schmid-Staiger, U., Briviba, K., Bischoff, S.C., 2018. Bioavailability and Safety of Nutrients from the Microalgae *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica* and *Phaeodactylum tricorutum* in C57BL/6 Mice. *Nutrients* 10, 16. <https://doi.org/doi:10.3390/nu10080965>

Gille, A., Stojnic, B., **Derwenskus, F.**, Trautmann, A., Schmid-Staiger, U., Posten, C., Briviba, K., Palou, A., Bonet, M., Ribot, J., 2019. A Lipophilic Fucoxanthin-Rich *Phaeodactylum tricorutum* Extract Ameliorates Effects of Diet-Induced Obesity in C57BL/6J Mice. *Nutrients* 11, 796. <https://doi.org/10.3390/nu11040796>

Neumann, U., Louis, S., Gille, A., **Derwenskus, F.**, Schmid-Staiger, U., Briviba, K., Bischoff, S.C., 2018. Anti-inflammatory effects of *Phaeodactylum tricorutum* extracts on human blood mononuclear cells and murine macrophages. *Journal of Applied Phycology* 30, 2837–2846. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1352-7>

Zusätzlich wurden Teile der Arbeit auf zahlreichen nationalen und internationalen Konferenzen und Fachtagungen präsentiert. Eine vollständige Liste der Veröffentlichungen findet sich hierzu im Anhang der Arbeit (Kap. A3)



## Kurzfassung

Eicosapentaensäure (EPA), eine essentielle mehrfach ungesättigte Omega-3 Fettsäure, sowie Fucoxanthin, ein sauerstoffhaltiges Carotinoid, besitzen eine Vielzahl gesundheitsfördernder Eigenschaften. Daher finden sie als funktionelle Inhaltsstoffe in vielen Nahrungsmitteln und Kosmetikprodukten Verwendung. Eine vielversprechende Alternative zu den bisher industriell eingesetzten Verfahren zur Gewinnung dieser Wertstoffe aus verschiedenen Organismen – Seefische für EPA und mehrzellige Algen für Fucoxanthin – bietet die simultane Herstellung beider Wertstoffe mit einzelligen Diatomeen. Diese sind durch Photosynthese in der Lage sowohl EPA als auch Fucoxanthin in erheblichen Mengen ausgehend von Licht und Kohlenstoffdioxid zu synthetisieren.

Die Herstellung beider Stoffe in industriell genutzten Photobioreaktoren scheitert derzeit jedoch an fehlenden wissenschaftlichen Daten zu geeigneten Produktionsstämmen sowie zur Abhängigkeit des biomassespezifischen Wertstoffgehaltes der Stämme von den zugrundeliegenden Kultivierungsbedingungen. Darüber hinaus mangelt es an skalierbaren Verfahren zur anschließenden Extraktion sowie Separation beider Stoffe aus der entsprechenden Algenbiomasse. Etablierte Verfahren, z.B. zur Extraktion von Lipiden aus Grünalgen, sind wegen der spezie-spezifischen Unterschiede in den vorliegenden Lipidklassen nicht ohne grundlegende Anpassungen auf Diatomeen übertragbar. Derzeit existieren daher weder integrierte Verfahren zur Herstellung von EPA und Fucoxanthin mit Diatomeen, noch existieren ökonomische Daten, welche die Bewertung eines solchen Herstellungsverfahrens ermöglichen würden. Folglich konnten bisher noch keine Herstellkosten ermittelt werden, so dass auch die wesentlichen Kostentreiber für einen zukünftigen Produktionsprozess nicht bekannt sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die genannten Wissenslücken zu schließen und ein integriertes Verfahren zur simultanen Herstellung beider Produkte mit Diatomeen in einem Photobioreaktor zu entwickeln sowie zu bewerten.

Hierfür wurde zunächst das Wachstumsverhalten und der biomassespezifische Wertstoffgehalt potentieller Produktionsstämmen unter definierten Kultivierungsbedingungen in einem Membranphotobioreaktor analysiert sowie die Kultivierbarkeit der ausgewählten Stämme in einem skalierbaren Flachplatten-Airlift-Photobioreaktor (FPA-PBR) untersucht. Unter zuvor optimierten Kultivierungsbedingungen konnte in einem Repeated-Fed-Batch-Prozess im FPA-PBR für den ausgewählten Stamm *Phaeodactylum tricoratum* UTEX 640 erstmals gezeigt werden, dass sich bereits auf zellulärer Ebene beschriebene Adaptionsmechanismen von Diatomeen an unterschiedliche Lichtverhältnisse eignen, um den biomassespezifischen Fucoxanthingehalt

gezielt auf bis zu 20,5 mg g<sup>-1</sup> zu steigern. Der EPA-Gehalt blieb hingegen nahezu konstant, so dass beide Wertstoffe ohne Einschränkungen simultan erzeugt werden können. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass im FPA-PBR in Abhängigkeit von der Lichtverfügbarkeit eine volumetrische Fucoxanthinproduktivität von bis zu 22,4 ± 7,6 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> erreicht werden kann. Dies stellt die bisher höchste in einem Photobioreaktor erreichte volumetrische Fucoxanthinproduktivität für Mikroalgen dar.

Die Gewinnung der beiden Wertstoffe aus der erzeugten *P. tricornutum*-Biomasse erfolgte mittels Hochdruckflüssigextraktion. Dabei wurden organische Lösungsmittel unter Berücksichtigung legislativer Vorgaben ausgewählt und hinsichtlich der Extraktionsausbeute und der Produktselektivität verglichen. In Abhängigkeit von der jeweiligen Polarität der Lösungsmittel gelang es, beide Produkte in einem einzigen Extraktionsschritt nahezu vollständig als Lipidfraktion zu gewinnen. Dabei konnten die Extraktionstemperatur und die Verweilzeit aufgrund der thermischen Instabilität des Fucoxanthins als kritische Prozessparameter identifiziert werden. Ausgehend von der extrahierten Lipidfraktion wurde ein neuartiges synergetisches Separationsverfahren entwickelt, welches eine einfache Trennung des Fucoxanthins von den enthaltenen Fettsäuren mittels Fällung und Filtration ermöglicht. Das Fucoxanthin konnte dadurch auf bis zu 97 %<sub>w/w</sub> aufgereinigt werden. Durch eine Skalierung des Extraktions- und Fällungsverfahrens als „Proof-of-Concept“ vom Milliliter- in den Liter-Maßstab war es nachfolgend möglich, ausreichend Probenmaterial für Untersuchungen der funktionellen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften der Lipidextrakte und des aufgereinigten Fucoxanthins herzustellen. Die dadurch gewonnenen Erkenntnisse und Daten bilden eine erste Grundlage für die zukünftige Zulassung beider Wertstoffe aus Diatomeen als „Novel Food“.

Auf Basis der neuen und optimierten Teilverfahren gelang es, ein vollständiges Herstellungsverfahren für Fucoxanthin und EPA mit Diatomeen zu entwickeln. Folglich konnten erstmals ökonomische Aspekte anhand definierter Produktionsszenarien im Pilot- und Industriemaßstab untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass insbesondere der Energieeintrag für die artifizielle Beleuchtung mit 43 bis 50 % der operativen Kosten einen wesentlichen Kostentreiber im Gesamtprozess darstellt. Demzufolge wirken sich die Stromkosten und damit auch der Standort der Anlage entscheidend auf die Produktionskosten aus. Es zeigte sich des Weiteren, dass eine Kostenreduktion durch eine Vergrößerung der Produktionsanlage aufgrund der modularen Bauweise der FPA-PBR nur begrenzt möglich ist und die Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses in viel höherem Maße vom Fucoxanthin als vom EPA bestimmt wird.

## Abstract

Both, eicosapentaenoic acids (EPA), an essential poly-unsaturated omega-3 fatty acid, as well as fucoxanthin, an oxygen-containing carotenoid, provide a broad variety of health promoting properties. Thus, they serve as functional ingredients in many food- and cosmetic applications. Compared to conventional individual sources such as marine fish and multicellular macroalgae, unicellular diatoms represent a promising alternative for the simultaneous production of both compounds. Due to photosynthesis, diatoms are able to convert carbon dioxide and light into substantial amounts of EPA as well as fucoxanthin.

Nowadays, a lack of profound knowledge concerning suitable production strains and about the dependency of the product content in the microalgae biomass from the culture conditions hinders the production of both compounds in industrial photobioreactors. Furthermore, there are only very sophisticated and non-scalable procedures available for the extraction and separation of both compounds from diatoms. Conventional procedures, e.g. for the extraction of lipids from green algae, cannot be easily transferred to diatoms due to species-specific differences in the present lipid classes. For this reason, neither a comprehensive production process is described for EPA and fucoxanthin based on diatoms, nor does economic data exist concerning the feasibility of such a process. Consequently, production costs have not been evaluated and main cost drivers were not identified yet.

The main objective of this thesis was to close these knowledge gaps by developing an holistic process for the simultaneous production of both compounds using diatoms in an industrial photobioreactor. Furthermore, the overall production process should be assessed from an economic perspective. Therefore, the growth performance as well as the biomass-specific product content of potential production strains were investigated in a membrane photobioreactor using defined culture conditions. Additionally, the general capability of selected strains to grow in a scalable flat-panel-airlift-photobioreactor (FPA-PBR) was examined. By using the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 in a repeated fed-batch process with optimized cultivation conditions, the results show for the first time that photoacclimation mechanisms, as previously described on a cellular level, can be used to increase the product content in the FPA-PBR to up to 20.5 mg g<sup>-1</sup>. The EPA content remained almost constant using the same cultivation conditions. Thus, it is possible to produce both compounds simultaneously without any major restrictions. Furthermore, depending on the relative light availability, a volumetric fucoxanthin-productivity of up to 22.4 ± 7,6 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>

can be achieved in the FPA-PBR. To the knowledge of the author, this is the highest volumetric fucoxanthin productivity reported for microalgae so far.

Both, fucoxanthin and EPA, were extracted from the *P. tricornutum* biomass by pressurized liquid extraction (PLE). In consideration of legislative regulations, suitable organic solvents were selected according to their extraction yield and their product selectivity. Depending on the polarity of the solvent, it was possible to extract both compounds almost completely as a lipid fraction within a single extraction steps. Due to the heat-instability of fucoxanthin, extraction temperature and residence time proofed to be major critical parameters in the extraction procedure. Originating from the lipid fraction containing both compounds, a novel synergetic separation procedure was developed, providing a simple method to separate fucoxanthin from the fatty acids by selective precipitation and filtration. Thus, for fucoxanthin a purity of up to 97 %<sub>w/w</sub> was achieved. The extraction as well as the precipitation procedure was scaled-up as “proof of concept” from milliliter- to liter-scale to enable the production of sufficient sample material to assess functional and physiological properties of both products. The related assays provided new insights, which can be useful get the approval for both compounds derived from diatoms as “novel food” ingredients.

By combining all new and optimized procedures, an entire process was developed to produce fucoxanthin an EPA with diatoms. Hence, it was possible to assess economic aspects based on defined scenarios in pilot- and industrial scale for the first time. The results show, that the energy input for the artificial illumination of the FPA-PBR causes 43 to 53 % of the operating expenses and thus, represents the main cost driver in the overall process. Consequently, the energy costs and thereby the location of the production facility significantly effects the production costs. The results furthermore show that a massive cost reduction by scaling-up is only possible within limitations. This can be explained by the modular design of the FPA-PBR production facility. Additionally, the assessment revealed that the overall production costs are much more dependent on fucoxanthin rather than on EPA.

## Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich aussprechen an...

... Herrn **Prof. Dr. Thomas Hirth** für das entgegengebrachte Vertrauen, die vielen hilfreichen Diskussionen und Treffen, die Geduld, sowie ganz besonders für die fortwährende Unterstützung, auch nach dem Wechsel an das KIT.

... Herrn **Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten** sowie Herrn **Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors** für die Bereitschaft zur Übernahme der Gutachten sowie die Anmerkungen und fachlichen Diskussionen zu dieser Arbeit.

...**Frau Dr. Ulrike Schmid-Staiger** für die hervorragende fachliche Unterstützung in der Arbeitsgruppe für Technische Mikrobiologie am Fraunhofer IGB, die vielen fachlichen Diskussionen und Anmerkungen, das entgegengebrachte Vertrauen sowie die Freiheit eigene Ideen umzusetzen.

...Frau **Dr.-Ing. Ursula Schließmann** für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in der Abteilung für Umwelt- und Bioverfahrenstechnik (UBT) am Fraunhofer IGB durchzuführen sowie der gesamten **Abteilung UBT**, insbesondere **Renate Preisner** und **Konstantin Frick** für die praktische Unterstützung im Labor und die hervorragende Arbeitsatmosphäre.

...allen fleißigen, stets motivierten Studenten, deren Arbeiten ich im Zeitraum der Doktorarbeit betreuen durfte. Mein besonderer Dank an dieser Stelle gilt: **Felix Metz, Matthias Hardtmann, Melanie Dauner, Natalie Keil, Jan Müller, Benjamin Schäfer, Patrick Bodenberger, Alicia Geier, Lisa Salzman, Julian Eisenhardt und Sonja Faust.**

... **Dr. Andrea Gille** und **Dr. Karlis Briviba** (MRI), **Dr. Ulrike Neumann** und Herrn **Prof. Dr. Stefan C. Bischoff** (Universität Hohenheim) sowie **Dr. Andreas Trautmann** und **Prof. Clemens Posten** (KIT) für die fachliche Zusammenarbeit hinsichtlich zahlreicher Diskussionen, gemeinsamer Publikationen sowie die Unterstützung bei der Carotinoid-Analytik und den ernährungsphysiologischen Assays.

...Herrn **Sebastian Weickert** und Frau **Prof. Dr. Iris Lewandowski** (Uni Hohenheim) für die Unterstützung bei der ökonomischen Bewertung und Definition geeigneter Szenarien.

...nicht zuletzt **meinen Eltern Karin und Karl-Heinz, meiner Freundin Ilka und unserer Tochter Palina Marie**, den wichtigsten Personen in meinem Leben, die mich stets in allen Lebenslagen unterstützen, ertragen und motivieren.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>III</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>V</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>XV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Ausgangssituation.....	1
1.2 Zielsetzung.....	4
<b>2 Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>6</b>
2.1 Diatomeen.....	6
2.1.1 Klassifizierung und Erkennungsmerkmale .....	7
2.1.2 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	8
2.2 Photosynthese und assoziierte Stoffwechselwege in Diatomeen .....	10
2.2.1 Die Lichtreaktion der Photosynthese .....	10
2.2.2 Die Xanthophyllzyklen .....	12
2.3 Lichtverfügbarkeit und Photoakklimatisation .....	15
2.3.1 Photonenflussdichte und relative Lichtverfügbarkeit .....	15
2.3.2 Mechanismen zur Photoakklimatisation .....	17
2.4 Struktur und Pigmentierung der Lichtsammelkomplexe in Diatomeen .....	18
2.4.1 Fucoxanthin-Chlorophyll a/c-Proteinkomplexe (FCP).....	19
2.4.2 Fucoxanthin und dessen physiologische Bedeutung.....	20
2.5 Zusammensetzung der Thylakoidmembran in Diatomeen.....	21
2.5.1 Glyco- und Phospholipide.....	22
2.5.2 Eicosapentaensäure (EPA) und deren physiologische Bedeutung.....	23
<b>3 Stand der Technik .....</b>	<b>25</b>
3.1 Mikroalgen-basierte Produkte und derzeit genutzte Herstellungsverfahren .....	25
3.1.1 Verfahren zur Gewinnung von Fucoxanthin.....	28

3.1.2	Verfahren zur Gewinnung von EPA .....	29
3.2	Photobioreaktoren zur Produktion von Mikroalgenbiomasse .....	31
3.2.1	Offene Photobioreaktoren .....	32
3.2.2	Geschlossene Photobioreaktoren .....	33
3.2.3	Der Flach-Platten-Airlift-Photobioreaktor (FPA-PBR) .....	34
3.3	Aufarbeitsverfahren für eine Mikroalgen-Bioraffinerie .....	36
3.3.1	Ernte und Entwässerung der Biomasse .....	37
3.3.2	Zellaufschluss .....	37
3.3.3	Fest-Flüssig-Extraktion von Lipiden .....	38
3.3.4	Subkritische Hochdruckflüssigextraktion (PLE) .....	40
3.3.5	Separation von Fettsäuren und Fucoxanthin .....	42
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>45</b>
4.1	Stammhaltung und Vorkulturen .....	45
4.2	Nährmedien und Substratlösungen .....	46
4.3	Kultivierungsmethoden im kleinen Maßstab .....	46
4.3.1	Kultivierung im Cell-DEG HDC-Membranbioreaktor .....	46
4.3.2	Kultivierung im Schüttelkolben .....	47
4.4	Kultivierung im Flachplatten-Airlift-Photobioreaktor .....	47
4.4.1	Vorbereitung und Innokulation der Reaktoren .....	49
4.4.2	Batch-Kultivierung potentieller Produktionsstämme .....	50
4.4.3	Untersuchungen zur Langzeit-Photoakklimatisation von <i>P. tricornutum</i> .....	50
4.4.4	Freilandkultivierung von <i>P. tricornutum</i> im Pilotmaßstab .....	51
4.5	Aufarbeitung der Biomasse .....	52
4.5.1	Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle .....	52
4.5.2	Subkritische Hochdruckflüssigextraktion im Labormaßstab .....	52
4.5.3	Subkritische Hochdruckflüssigextraktion im technischen Maßstab .....	54
4.5.4	Vakuumfiltration von Lösungsmittelextrakten .....	56
4.5.5	Untersuchungen zur Löslichkeit von Fucoxanthin in n-Hexan .....	56
4.5.6	Untersuchungen zur thermischen Stabilität von Fucoxanthin .....	56
4.6	Analytische Methoden .....	57
4.6.1	Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration .....	57
4.6.2	Bestimmung der Ammonium- und Phosphatkonzentration im Nährmedium .....	57
4.6.3	Quantifizierung von Proteinen mittels FTIR-Spektroskopie .....	58

4.6.4	Bestimmung von Fettsäureprofilen mittels FAME-GC .....	58
4.6.5	Quantifizierung von Carotinoiden mittels HPLC .....	59
4.6.6	Massenspektroskopische Analyse von Fucoxanthin mittels UHPLC-MS.....	60
4.6.7	Partikelgrößenbestimmung von Fucoxanthinpartikeln mittels Laserbeugung.....	61
4.6.8	Rasterelektronenmikroskopie (REM) von Fucoxanthinpartikeln .....	61
4.7	Assays zur Bestimmung von ernährungsphysiologischen Eigenschaften .....	61
4.7.1	Folin-Ciocalteu-Assay zur Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes .....	61
4.7.2	DPPH-Assay zur Bestimmung der Radikalfängereigenschaften .....	62
4.7.3	FRAP-Assay zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität.....	62
4.8	Definition von Sekundärgrößen aus direkten Messwerten .....	63
4.8.1	Sekundärgrößen zur Beschreibung der Kultivierungsprozesse .....	63
4.8.2	Sekundärgrößen zur Beschreibung der Extraktion und Produktaufreinigung .....	65
4.8.3	Fehlerbetrachtung und Signifikanzanalyse .....	66
4.9	Ökonomische Bewertung der Produktionsszenarien .....	67
4.9.1	Abschätzung der Investitions- und Betriebskosten (CAPEX und OPEX).....	67
4.9.2	Wesentliche Annahmen und Vereinfachungen.....	68
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>71</b>
5.1	Vergleich potentieller Produktionsstämme .....	72
5.1.1	Spezifische Wachstumsrate und volumetrische Biomasseproduktivität.....	72
5.1.2	Biomassespezifischer Fucoxanthingehalt .....	74
5.1.3	Fettsäureprofil und biomassespezifischer EPA-Gehalt.....	75
5.2	Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf den Wertstoffgehalt von <i>P. tricornutum</i> .....	76
5.2.1	Einfluss der $\text{NH}_4^+$ -, $\text{NO}_3^-$ - und Eisenkonzentration .....	77
5.2.2	Einfluss der relativen Lichtverfügbarkeit .....	79
5.3	Untersuchungen zur Photoakklimatisation von <i>P. tricornutum</i> im FPA-PBR.....	81
5.3.1	Auswirkung der relativen Lichtverfügbarkeit auf die volumetrische Biomasseproduktivität und Lichtausbeute.....	81
5.3.2	Auswirkung der relativen Lichtverfügbarkeit auf die Fucoxanthinsynthese .....	83
5.3.3	Auswirkung der relativen Lichtverfügbarkeit auf die EPA-Synthese .....	87
5.3.4	Auswirkung der relativen Lichtverfügbarkeit auf den Gesamtproteingehalt.....	90
5.3.5	Ansätze zur prozesstechnischen Nutzung der Photoakklimatisation im FPA-PBR unter artifizieller Beleuchtung .....	91
5.3.6	Auswirkung der Photoakklimatisation unter Freilandbedingungen .....	92

5.3.7	Zusammenfassung der Akklimatisierungsversuche.....	93
5.4	Subkritische Fest-Flüssig-Extraktion von Lipiden aus <i>P. tricornutum</i> .....	94
5.4.1	Einfluss des Zellaufschlusses auf die Extraktionsausbeute .....	95
5.4.2	Einfluss des Lösungsmittels und der Temperatur auf die Gesamtlipidausbeute ...	97
5.4.3	Einfluss des Lösungsmittels und der Temperatur auf die EPA-Ausbeute .....	98
5.4.4	Einfluss der statischen Verweilzeit auf die EPA-Ausbeute.....	100
5.4.5	Einfluss des Lösungsmittels und der Temperatur auf die Fucoxanthinausbeute.	101
5.4.6	Einfluss der statischen Verweilzeit auf die Fucoxanthinausbeute.....	103
5.4.7	Subkritische Extraktion von Fettsäuren und Fucoxanthin aus wässriger Mikroalgenbiomasse .....	105
5.4.8	Zusammenfassung der Ergebnisse zur subkritischen Fest-Flüssig-Extraktion....	108
5.5	Temperaturinduzierte Fällung von Fucoxanthin aus Lipidextrakten .....	109
5.5.1	Löslichkeit von Fucoxanthin in n-Hexan.....	110
5.5.2	Fällung und Filtration von Fucoxanthin-Agglomeraten .....	112
5.5.3	Untersuchung der Fucoxanthinpartikel mittels Rasterelektronenmikroskopie....	115
5.5.4	Massenspektroskopische Untersuchung des aufgereinigten Fucoxanthins .....	116
5.5.5	Skalierung des Extraktions- und Fällungsverfahrens in den Litermaßstab .....	117
5.5.6	Zusammenfassung der Separationsversuche.....	119
5.6	Funktionelle und physiologische Eigenschaften von Fucoxanthin und EPA.....	120
5.6.1	Anti-oxidative Eigenschaften des ausgefällten Fucoxanthins .....	121
5.6.2	Abhängigkeit der anti-oxidativen Wirkung der Lipidextrakte vom Fucoxanthin und dem Gesamtphenolgehalt.....	122
5.6.3	Ernährungsphysiologische Eigenschaften .....	124
5.7	Bewertung des neu entwickelten Herstellungsverfahrens für EPA und Fucoxanthin .....	125
5.7.1	Definition der Produktionsszenarien.....	127
5.7.2	Bewertung der Energie- und Massenbilanzen für die Produktionsszenarien .....	129
5.7.3	Abschätzung der Investitions- und Betriebskosten (CAPEX/OPEX).....	133
5.7.4	Einordnung der Produktionskosten in das derzeitige Marktumfeld.....	137
5.7.5	Fazit und Maßnahmen zur Kostenreduktion.....	138
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>141</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>145</b>

<b>8 Anhang.....</b>	<b>164</b>
A1 Materialien und Methoden .....	164
A1.1 Geräteliste .....	164
A1.2 Verwendete Chemikalien.....	165
A1.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	167
A1.4 Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien und Nährstofflösungen .....	168
A1.5 Zusammensetzung der Reagenzien für die lebensmitteltechnologischen Assays ..	169
A2 Ergebnisse und Diskussion .....	169
A2.1 Aufschlusskinetik der für das DSP verwendeten <i>P. tricornutum</i> -Biomasse .....	169
A2.2 Annahmen und Parameter zur Berechnung der Szenarien .....	170
A2.3 Tabellen zur Berechnung von OPEX und CAPEX des Basisszenarios (BS).....	174
A2.4 Tabellen zur Berechnung von OPEX und CAPEX des Industrieszenarios (IS).....	176
A2.5 Tabellen zur Berechnung von OPEX und CAPEX des Industrieszenarios (HIS)..	178
A3 Liste der Veröffentlichungen im Zeitraum der Anfertigung dieser Arbeit .....	180

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung	Einheit
(v/v)	Verhältnis bezogen auf das Volumen	-
(w/w)	Verhältnis bezogen auf das Gewicht	-
$\lambda_{\max}$	Wellenlänge mit der höchsten Photonenabsorption	-
$\mu_x$	Spezifische Wachstumsrate	[d <sup>-1</sup> ]
$\mu_{x,L}$	Spez. Wachstumsrate nach Bitaubé-Pérez et al. (2008)	[d <sup>-1</sup> ]
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff	-
ADP	Adenosindiphosphat	-
ATP	Adenosintriphosphat	-
AX	Astaxanthin	-
BCH	β-Carotin-hydroxylase	-
BHT	Butylhydroxytoluol	-
BS	Basisszenario	-
BTM	Biotrockenmasse	-
C	Elementarer Kohlenstoff	-
<i>C. fusiformis</i>	<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	-
<i>C. sorokiniana</i>	<i>Chlorella sorokiniana</i>	-
<i>C. vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	-
CAPEX	Investitionskosten (engl. „capital expenditure“)	-
CBP	Zentrum für chemisch-biotechnologische Prozesse	-
CCAP	engl. “Culture Collection of Algae and Protozoa”	-
c <sub>EPA</sub>	Eicosapentaensäurekonzentration	[mg L <sup>-1</sup> ]
c <sub>Fe</sub>	Eisenkonzentration	[mg L <sup>-1</sup> ]
c <sub>FX</sub>	Fucoxanthinkonzentration	[mg L <sup>-1</sup> ]
Chl a/c	Chlorophyll (a/c)	-
c <sub>NH4</sub>	Ammoniumkonzentration	[mg L <sup>-1</sup> ]
c <sub>NO3</sub>	Nitratkonzentration	[mg L <sup>-1</sup> ]
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	-
c <sub>x</sub>	Biomassekonzentration	[g L <sup>-1</sup> ]
D	Dissipation	-
<i>D. salina</i>	<i>Dunalliella salina</i>	-
DDE	Diatoxanthin-de-epoxidase	-
DDX	Diadinoxanthin(zyklus)	-
DEP	Diatoxanthin-epoxidase	-

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>DGDG</b>	Digalactosyl-diacylglycerid	-
<b>DHA</b>	Docosahexaensäure; 22:6 ( $\omega$ -3)	-
<b>DMAPP</b>	Dimethylallylpyrophosphat	-
<b>DPPH</b>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	-
<b>DSP</b>	Produktaufbereitung (engl. "Downstream-Processing")	-
<b>EFSA</b>	engl. „European Food Safety Authority“	-
<b>EPA</b>	Eicosapentaensäure; 20:5 ( $\omega$ -3)	-
<b>EU</b>	Europäische Union	-
<b>F</b>	Fluoreszenz	-
<b>FAME</b>	Fettsäuremethylester (engl. „Fattyacid-methylester“)	-
<b>FCP</b>	Fucoxantin-Chlorophyll-a/c-Protein	-
<b>FDA</b>	engl. „United States Food and Drug Administration“	-
<b>FIA</b>	Fließinjektionsanalyse	-
<b>FPA-PBR</b>	Flachplatten-Airlift-Photobioreaktor	-
<b>FRAP</b>	“Ferric Ion Reducing Antioxidant Power”-(Assay)	-
<b>FTIR</b>	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie	-
<b>FX</b>	Fucoxanthin	-
<b>GC</b>	Gaschromatographie	-
<i>H. pluvialis</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i>	-
<b>HIS</b>	Hypothetisches Industrieszenario	-
<b>HFD</b>	engl. „High Fat Diet“	-
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigchromatographie	-
<b>HPLC-MS</b>	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektroskopie	-
<b>I<sub>c</sub>; I<sub>s</sub>; I<sub>h</sub></b>	Initiale, sättigende und übersättigende Photonendichte	-
<b>IGB</b>	Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik	-
<b>IPP</b>	Isopentenylpyrophosphat	-
<b>I<sub>rel</sub></b>	Relative Lichtverfügbarkeit	[ $\mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]
<b>IS</b>	Industrieszenario	-
<b>ISC</b>	Intersystem-Crossing	-
<i>Isochrysis sp.</i>	<i>Isochrysis speciosa</i>	-
<b>KIT</b>	Karlsruher Institut für Technologie	-
<b>KOH</b>	Kaliumhydroxid	-
<b>LDL</b>	engl. „Low Density Lipoprotein“	-
<b>LHC</b>	engl. “Light Harvesting Complex”; Lichtsammelkomplex	-
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid	-
<b>m/z</b>	Masse-Ladungs-Verhältnis	-

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>MBR</b>	Membranphotobioreaktor	-
<b>MEP</b>	Methylerythritolphosphat-Syntheseweg	-
<b>MEV</b>	Mevalonat-Syntheseweg	-
<b>MGDG</b>	Monogalactosyl-diacylglycerid	-
<b>MRI</b>	Max Rubner Institut, Karlsruhe	-
<b>MSR</b>	Mess-, Steuerungs- und Regelungstechnik	-
<b>N</b>	Elementarer Stickstoff	-
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid	-
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid	-
<i>N. oceanica</i>	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	-
<i>N. oculata</i>	<i>Nannochloropsis oculata</i>	-
<b>NPQ</b>	Nicht-Photochemisches Quenching	-
$\bar{\Phi} I_{rel}$	Durchschnittliche relative Lichtverfügbarkeit	[ $\mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]
<i>O. aurita</i>	<i>Odontella aurita</i>	-
<b>OD<sub>750nm</sub></b>	Optische Dichte bei 750 nm	-
<b>OPEX</b>	Betriebskosten (engl. „operational expenditure“)	-
<b>p</b>	Extraktionsdruck	[bar]
<i>P. tricornutum</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	-
<b>PAR</b>	Photosynthetisch aktive Strahlung	-
<b>PBMC</b>	engl. „Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC	-
<b>PFD</b>	Photonenflussdichte	[ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]
<b>PLE</b>	engl. „Pressurized Liquid Extraction“	-
<b>P<sub>max</sub></b>	Maximale Photosyntheserate	-
<b>PS I/II</b>	Photosystem I bzw. II	-
<b>PTFE</b>	Polytetrafluorethylen	-
<b>Q<sub>EPA</sub></b>	Volumetrische Eicosapentaensäureproduktivität	[ $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ]
<b>q<sub>EPA</sub></b>	Biomassespezifische Eicosapentaensäurebildungsrate	[ $\text{mg g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ]
<b>Q<sub>FX</sub></b>	Volumetrische Fucoxanthinproduktivität	[ $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ]
<b>q<sub>FX</sub></b>	Biomassespezifische Fucoxanthinbildungsrate	[ $\text{mg g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ]
<b>Q<sub>P</sub></b>	Volumetrische Proteinproduktivität	[ $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ]
<b>Q<sub>X</sub></b>	Volumetrische Biomasseproduktivität	[ $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ]
<b>REM</b>	Rasterelektronenmikroskopie	-
<b>ROS</b>	engl. “Radical Oxygen Species”	-
<b>RWKM</b>	Rührwerkskugelmühle	-
<i>S. platensis</i>	<i>Spirulina platensis</i>	-
<b>SAG</b>	Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen	-

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>SEM</b>	Scanning Electron Microscopy	-
<b>SiO<sub>2</sub></b>	Siliciumdioxid	-
<b>sog.</b>	sogenannte	-
<b>SPS</b>	Speicherprogrammierbare Steuerungseinheit	-
<b>SQDG</b>	Sulfoquinovosyl-diacylglycerid	-
<b>t</b>	Zeit (z.B. Kultivierungsdauer oder statische Extraktionszeit)	[d]; [h]; [min]
<b>T</b>	Temperatur	[°C]
<b>TAG</b>	Triacylglycerid	-
<b>TE</b>	engl. „Trolox equivalent“	-
<b>TS</b>	Trockensubstanz	-
<b>USP</b>	Prozesse zur Kultivierung (engl. "Upstream-Processing")	-
<b>UTEX</b>	University of Texas	-
<b>V</b>	Volumen	[L]; [ml]
<b>VAZ; VX</b>	Violaxanthinzyklus; Violaxanthin	-
<b>VDE</b>	Violaxanthin-de-epoxidase	-
<b>v<sub>Filtration</sub></b>	Filtrationsgeschwindigkeit	[ml s <sup>-1</sup> ]
<b>v<sub>vm</sub></b>	Gasvolumen pro Reaktorvolumen und Minute	-
<b>WAT</b>	engl. „White adipose tissue“	-
<b>X<sub>BTM</sub></b>	Beladung des Lösungsmittels mit Biotrockenmasse	[mg ml <sup>-1</sup> ]
<b>X<sub>FX</sub></b>	Beladung des Lösungsmittels mit Fucoxanthin	[mg ml <sup>-1</sup> ]
<b>X<sub>EPA</sub></b>	Beladung des Lösungsmittels mit Eicosapentaensäure	[mg ml <sup>-1</sup> ]
<b>Y<sup>*</sup><sub>EPA</sub></b>	Eicosapentaensäureausbeute bezogen auf Referenzmethode	% <sub>w/w</sub>
<b>Y<sup>*</sup><sub>FX</sub></b>	Fucoxanthinausbeute bezogen auf Referenzmethode	% <sub>w/w</sub>
<b>Y<sup>*</sup><sub>FS</sub></b>	Ausbeute an Fettsäuren bezogen auf Referenzmethode	% <sub>w/w</sub>
<b>Y<sub>BTM</sub></b>	Biotrockenmasseausbeute	[mg g <sup>-1</sup> ]
<b>Y<sub>EPA</sub></b>	Eicosapentaensäureausbeute	[mg mol <sup>-1</sup> ]; [mg g <sup>-1</sup> ]
<b>Y<sub>FX</sub></b>	Fucoxanthinausbeute	[mg mol <sup>-1</sup> ]; [mg g <sup>-1</sup> ]
<b>Y<sub>X</sub></b>	Biomassespezifische Lichtausbeute	[g mol <sup>-1</sup> ]
<b>ZEP</b>	Zeaxanthin-epoxidase	-
<b>ω<sub>EPA</sub></b>	Biomassespezifischer Eicosapentaensäuregehalt	[mg g <sup>-1</sup> ]
<b>ω<sub>FX</sub></b>	Biomassespezifischer Fucoxanthingehalt	[mg g <sup>-1</sup> ]; % <sub>w/w</sub>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Inhalte der vorliegenden Arbeit und Zuordnung zu den einzelnen Kapiteln.. .....	5
Abbildung 2: REM-Aufnahmen verschiedener Diatomeen, übernommen aus Hildebrand et al. (2012)..7	
Abbildung 3: SEM-Aufnahmen der drei morphologischen Formen von <i>P. tricornutum</i> übernommen von Martino et al. (2007) und lichtmikroskopische Aufnahme des in dieser Arbeit verwendeten Stammes <i>P. tricornutum</i> UTEX 640 .....	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der möglichen Deaktivierungswege von Chlorophyll a nach Lichtanregung. Darstellung übernommen aus Lohr (2000) in Anlehnung an Young und Britton (1993) (Lohr, 2000; Young and Britton, 1993).. .....	12
Abbildung 5: Darstellung des Biosyntheseweges von $\beta$ -Carotin zu Fucoxanthin über den Violaxanthin- und Diadinoxanthinzyklus (Bertrand, 2010; Kuczynska et al., 2015) .....	13
Abbildung 6: Zusammenhang zwischen Photonenflussdichte (PFD) und Photosyntheserate nach Tredici (2010). Darstellung übernommen aus Holdmann 2018 mit Ergänzungen .....	16
Abbildung 7: Darstellung der Struktur eines in die Thylakoidmembran von Diatomeen als Lichtsammel-Antenne eingebauten FCP-Dimers.....	19
Abbildung 8: Darstellung der Strukturformel von Fucoxanthin und dessen funktionelle Gruppen.....	20
Abbildung 9: Darstellung der Strukturformel der Omega-3 Fettsäuren Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure. Abbildung übernommen aus Seel et al. (2017) .....	23
Abbildung 10: Darstellung verschiedener Photobioreaktorkonzepte aus Derwenskus und Holdmann (2017).....	31
Abbildung 11: Aufbau eines 6-Liter Flachplatten-Airlift-Reaktors (Bergmann and Trösch, 2016). ....	34
Abbildung 12: FPA-Reaktoren (180 L) zur Produktion von <i>P. tricornutum</i> Biomasse in der Pilotanlage des Fraunhofer Zentrums für Chemisch-Biotechnologische Prozesse CBP.....	35
Abbildung 13: Schematische Darstellung möglicher Prozessschritte innerhalb einer Bioraffinerie zur Herstellung verschiedener Mikroalgen-basierter Endprodukte .....	36
Abbildung 14: RI-Fließschema eines FPA-Photobioreaktors mit Steuerungseinheit (SPS) und angeschlossener Peripherie.....	48
Abbildung 15: Beispielhafte Darstellung einer Kultivierung von <i>P. tricornutum</i> UTEX 640 zur Photoakklimatisation mit 48 h Akklimatisationszeit bei konstanter Biomassekonzentration.. .....	50
Abbildung 16: RI-Fließbild der Technikumsanlage zur Hochdruckflüssigextraktion von <i>P. tricornutum</i> Biomasse und anschließender Fällung von partikulärem Fucoxanthin ....	55
Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung der Verteilung von drei Datenmengen als Box-Plot (Whisker-Plot) mit jeweils n = 16 Datenpunkten. ....	66
Abbildung 18: Spezifische Wachstumsrate $\mu_X$ der ausgewählten Stämme im Cell-DEG-Membranphotobioreaktor (MBR) und volumetrische Produktivität $Q_X$ im 6-Liter Flachplatten-Airlift-Photobioreaktor (FPA-PBR) über einen Prozesszeitraum von 120 h.....	73
Abbildung 19: Biomassespezifischer Fucoxanthingehalt $\omega_{FX}$ der untersuchten Stämme im Cell-DEG Membranbioreaktor nach einer Kultivierungsdauer von 120 h (Wachstumsphase) .....	74

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abbildung 20: Vergleich der spezifischen Wachstumsrate $\mu_X$ und des biomassespezifischen Fucoxanthin- und EPA-Gehaltes $\omega_{FX/EPA}$ von <i>P. tricornutum</i> im Schüttelkolben bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen .....	78
Abbildung 21: Vergleich der spezifischen Wachstumsrate $\mu_X$ und des biomassespezifischen Fucoxanthin- und EPA-Gehaltes $\omega_{FX/EPA}$ von <i>P. tricornutum</i> UTEX 640 im Schüttelkolben bei unterschiedlicher relativer Lichtverfügbarkeit .....	80
Abbildung 22: Volumetrische Biomasseproduktivität $Q_X$ und Lichtausbeute $Y_I$ von <i>P. tricornutum</i> UTEX 640 bei unterschiedlicher relativer Lichtverfügbarkeit $I_{rel}$ im FPA-PBR bei einer Biomassekonzentration von $3 \text{ g L}^{-1}$ und $6 \text{ g L}^{-1}$ .....	82
Abbildung 23: Volumetrische Fucoxanthinproduktivität $Q_{FX}$ , biomassespezifischer Fucoxanthingehalt $\omega_{FX}$ , biomassespezifische Fucoxanthinbildungsrate $q_{FX}$ sowie die produkt-spezifische Lichtausbeute $Y_{FX}$ von <i>P. tricornutum</i> UTEX 640 im FPA-PBR bei unterschiedlicher relativer Lichtverfügbarkeit und einer initialen Biomassekonzentration von $6 \text{ g L}^{-1}$ ....	84
Abbildung 24: Volumetrische EPA-Produktivität $Q_{EPA}$ , biomassespezifischer EPA-Gehalt $\omega_{EPA}$ , biomassespezifische Produktbildungsrate $q_{EPA}$ , sowie die produktspezifische Lichtausbeute $Y_{EPA}$ von <i>P. tricornutum</i> UTEX 640 im FPA-PBR bei unterschiedlicher relativer Lichtverfügbarkeit .....	88
Abbildung 25: Verlauf der Biomassekonzentration $c_X$ , des biomassespezifischen Fucoxanthingehaltes $\omega_{FX}$ und die biomassespezifische Fucoxanthinbildungsrate $q_{FX}$ über einen künstlich nachgestellten Tagesverlauf im FPA-PBR .....	92
Abbildung 26: Extraktionsausbeute an Gesamtlipiden $Y_{BTM}$ , an Eicosapentaensäure $Y_{EPA}$ und an Fucoxanthins $Y_{FX}$ aus nicht-aufgeschlossener, sowie aufgeschlossener Biomasse von <i>P. tricornutum</i> mittels PLE. Extrahiert wurde mit verschiedenen Lösungsmitteln .....	96
Abbildung 27: Gravimetrische Ausbeute $Y_{BTM}$ an gelöster Biotrockensubstanz (lipophile/ölige Fraktion $< 0,25\mu\text{m}$ ) bezogen auf die eingesetzte aufgeschlossene <i>P. tricornutum</i> -Biotrockenmasse nach Extraktion mittels PLE mit verschiedenen Lösungsmitteln .....	97
Abbildung 28: EPA-Ausbeute $Y_{EPA}$ bezogen auf die eingesetzte <i>P. tricornutum</i> -Biotrockenmasse und die maximal verfügbare EPA-Menge in der Biomasse $Y^*_{EPA}$ nach Lepage und Roy (1984), die volumetrische Beladung der verschiedenen Lösungsmittel nach der subkritischen Extraktion sowie der Massenanteil von EPA bezogen auf die extrahierte Gesamttrockensubstanz der Extrakte .....	99
Abbildung 29: EPA-Ausbeute bei unterschiedlichen statischen Verweilzeiten des Extraktionsgutes in der Extraktionszelle sowie bei unterschiedlichen Extraktionstemperaturen und einer statischen Verweilzeit von 0 min .....	100
Abbildung 30: Fucoxanthin-Ausbeute $Y_{FX}$ bezogen auf die eingesetzte <i>P. tricornutum</i> Biotrockenmasse und maximal verfügbare Fucoxanthinmenge in der Biomasse $Y^*_{FX}$ , die volumetrische Beladung der verschiedenen Lösungsmittel nach der subkritischen Extraktion sowie der Massenanteil des Fucoxanthins bezogen auf die extrahierte Gesamttrockensubstanz der Extrakte .....	102
Abbildung 31: Fucoxanthin-Ausbeute $Y_{FX}$ bezogen auf die eingesetzte <i>P. tricornutum</i> Biotrockenmasse in Abhängigkeit von der statischen Verweilzeit (bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ) und in Abhängigkeit der Extraktionstemperatur bei einer Verweilzeit von 0 min .....	104

Abbildung 32: Ausbeute an Fettsäuren $Y_{FS}$ aus <i>C. vulgaris</i> und <i>P. tricornutum</i> ausgehend von getrockneter Biomasse und Biomasse mit einem Biotrockenmasseanteil von 25 % <sub>w/w</sub> jeweils bezogen auf die Referenzmethode von Lepage und Roy (1984).....	105
Abbildung 33: Ausbeute an Fucoxanthin $Y_{FX}$ aus <i>P. tricornutum</i> ausgehend von getrockneter Biomasse und Biomasse mit einem Biotrockenmasseanteil von 25 % <sub>w/w</sub> .....	107
Abbildung 34: Löslichkeit von Fucoxanthin in n-Hexan (99%) und einem mittels PLE erzeugten hexanolischen Extrakt.....	111
Abbildung 35: Partikelgrößenverteilung des präzipitierten Fucoxanthins in einer übersättigten n-Hexanlösung bei 25 °C.....	112
Abbildung 36: Filtrationsausbeute $Y_{Präzipitat}$ an partikulärem Fucoxanthin-reichem Präzipitat (Porengröße = 0,2 $\mu$ m), der Fucoxanthin-Massenanteil $\omega_{FX}$ am zurückgehaltenen Präzipitat sowie die daraus resultierende Fucoxanthinausbeute $Y_{FX}$ .....	113
Abbildung 37: REM-Aufnahmen des abfiltrierten Fucoxanthinpulvers bei unterschiedlichen Vergrößerungen (Maßstab: 20 $\mu$ m bis 100 nm).....	115
Abbildung 38: UHPLC-Chromatogramm und MS-Spektrum eines all-trans-Fucoxanthinstandards und des aus <i>P. tricornutum</i> UTEX 640 gewonnen Fucoxanthinpulvers. ....	116
Abbildung 39: Foto der am Fraunhofer CBP, Leuna, aufgebauten PLE-Anlage im Technikumsmaßstab, des fucoxanthin-haltigen Retentats auf der PTFE-Filtermembran, des gewonnenen Fucoxanthinpulvers und des EPA-haltigen Filtrats. ....	118
Abbildung 40: Ergebnisse des FRAP-Assay dargestellt als Reduktions-Äquivalente von Eisen(II)-sulfat. ....	122
Abbildung 41: Zusammenhang zwischen dem Gesamtphenolgehalt sowie dem Fucoxanthingehalt und der reduzierenden Eigenschaft sowie der Radikalfängereigenschaft der PLE-Extrakte.....	123
Abbildung 42: Prozessfließbild mit wesentlichen Stoffströmen und in der Arbeit verwendeten Verfahrensschritten bis zu den beiden Endprodukten im Labormaßstab.....	126
Abbildung 43: Relative Anteile der Investitionskosten der für den Prozess wesentlichen Maschinen bzw. Geräte für die drei zuvor definierten Szenarien. ....	133
Abbildung 44: Relative Verteilung der operativen Kosten für wesentliche Energie-, Massenströme- und Verbrauchsmaterialien für die drei zuvor definierten Szenarien. ....	135
Abbildung 45: Anteilige Gesamtkostenverteilung für das hypothetische Industrieszenario (HIS) nach Ación et al. 2012.....	136
Abbildung 46: Aufschlusskinetik zu der für die PLE-Extraktion verwendeten Biomassecharge.....	169

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Produkte und geschätzte Produktionsvolumina für ausgewählte Mikroalgen-basierte Produkte aus Enzing et al. (2014) und Vigani et al. (2015) mit eigenen Ergänzungen.....	26
Tabelle 2: Fucoxanthingehalt verschiedener Mikro- und Makroalgen bezogen auf das Biotrockengewicht basierend auf der Zusammenstellung von Petrushkina et al. (2017) und Zarekarizi et al. (2019) mit eigenen Ergänzungen.....	28
Tabelle 3: Gehalt und Verhältnis von DHA und EPA in Meeresfisch und Mikroalgen. ....	30
Tabelle 4: Ausgewählte Anwendungsbeispiele zur Hochdruckflüssigextraktion von Carotinoiden, Antioxidantien und ungesättigten Fettsäuren aus Mikro- und Makroalgen. ....	41
Tabelle 5: Untersuchte Mikroalgenstämme mit Herkunft (Habitat) und der Bezugsquelle.....	45
Tabelle 6: Physikalische Kenngrößen der für die Extraktion verwendeten Lösungsmittel.....	53
Tabelle 7: Temperaturprofil der eingesetzten FAME-GC-Methode.....	59
Tabelle 8: Lösungsmittelgradient der HPLC-Methode zur Quantifizierung der Carotinoide.....	60
Tabelle 9: Lösungsmittelgradient zur Analyse von Fucoxanthin mittels UHPLC-MS.....	60
Tabelle 10: Fettsäurezusammensetzung der untersuchten Mikroalgenstämme.....	76
Tabelle 11: Vergleich der ermittelten Prozesskenngrößen mit publizierten Maximalwerten. ....	86
Tabelle 12: Prozessdaten zur photoautotrophen Produktion von EPA mit Mikroalgen.....	89
Tabelle 13: Prozessdaten zur heterotrophen Produktion von DHA mit Mikroalgen.....	89
Tabelle 14: Wesentlicher Kenngrößen der in dieser Arbeit betrachteten Produktionsszenarien. ....	129
Tabelle 15: Ermittelter jährlicher Energiebedarf für die Kultivierung und die Produktaufarbeitung in MWh a <sup>-1</sup> . ....	129
Tabelle 16: Zusammenfassung der jährlich ein- und ausgehenden Massenströme für die Kultivierung, die Reinigung und Sterilisation der FPA-PBR und die Aufarbeitung der Biomasse, sowie erzeugte Produkte und Nebenströme. ....	132
Tabelle 17: Investitionskosten der für den Prozess wesentlichen Maschinen bzw. Geräte.....	134
Tabelle 18: Operative Kosten für wesentliche Energie-, Massenströme- und Verbrauchsmaterialien.....	135
Tabelle 19: Zusammenfassung der Gesamtproduktionskosten (USP und DSP) aufgeteilt in operative Betriebsausgaben (OPEX) und Investitionsausgaben (CAPEX) .....	136
Tabelle 20: Liste der verwendeten Geräte.....	164
Tabelle 21: Liste der verwendeten Chemikalien.....	165
Tabelle 22: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	167
Tabelle 23: Zusammensetzung des Mann & Myers (M&M-)Kulturmediums.....	168
Tabelle 24: Zusammensetzung der Vitamin- und Spurenelemente-Lösung für das M&M-Kulturmedium (Mann and Myers, 1968). ....	168
Tabelle 25: Zusammensetzung der verwendeten Nährstofflösungen.....	168
Tabelle 26: Zusammensetzung der DPPH-Stocklösung und der Arbeitslösung.....	169

## TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 27: Zusammensetzung des Acetatpuffer und der FRAP-Lösung für den FRAP-Assay.....	169
Tabelle 28: Zusammenfassung wesentlicher Prozessparameter für die ökonomische Bewertung .....	170
Tabelle 29: Beschaffungskosten und Nennvolumen betrachteten FPA-PBR.....	170
Tabelle 30: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der Pumpen, Sensoren und Ventile.....	171
Tabelle 31: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der Geräte zur Kühlung. ....	171
Tabelle 32: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der Geräte zur Beleuchtung der Mikroalgen.	171
Tabelle 33: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der Geräte zur Steuerung der Reaktoren.....	172
Tabelle 34: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der Geräte zur Aufkonzentrierung der Biomasse. ....	172
Tabelle 35: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der Geräte zum Aufschluss der Biomasse. ....	172
Tabelle 36: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der Geräte zur Trocknung der Biomasse. ....	172
Tabelle 37: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der Geräte zur Extraktion der Biomasse.....	172
Tabelle 38: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der Geräte zur Rückgewinnung des Lösungsmittels. ....	173
Tabelle 39:Standortspezifische Kosten für Wasser und Industrieland.....	173
Tabelle 40: Kosten für die Medienbestandteile, Substrate und Chemikalien.....	173
Tabelle 41: Kosten für die verwendeten Verbrauchsmaterialien. ....	174
Tabelle 42: Fixkosten für das Basisszenario. ....	174
Tabelle 43: Operative Kosten für das Basisszenario. ....	175
Tabelle 44: Gesamtkosten (OPEX und CAPEX) und der Kostenstruktur für das Basisszenario.....	175
Tabelle 45: Fixkosten für das Industrieszenario.....	176
Tabelle 46: Operative Kosten für das Industrieszenario .....	177
Tabelle 47: Gesamtkosten (OPEX und CAPEX) und der Kostenstruktur für das Industrieszenario..	177
Tabelle 48: Fixkosten für das hypothetische Industrieszenario.....	178
Tabelle 49: Operative Kosten für das hypothetische Industrieszenario .....	179
Tabelle 50: Gesamtkosten und der Kostenstruktur für das hypothetische Industrieszenario.....	179



# 1 Einleitung

## 1.1 Ausgangssituation

In Zeiten des globalen Klimawandels stellt die nachhaltige Erzeugung von insbesondere proteinhaltigen Nahrungsmitteln für die stetig wachsende Erdbevölkerung eine der größten Herausforderungen der Menschheit dar (Posten und Feng Chen, 2016; Matos, 2017). Allein um den Nahrungsmittelbedarf für die erwartete Weltbevölkerung von 9,8 Milliarden Menschen im Jahre 2050 zu decken, muss die aktuell produzierte Nahrungsmittelmenge verdoppelt werden (United Nations, 2009, 2017). Gleichzeitig muss jedoch der Ausstoß an Treibhausgasen in die Atmosphäre verringert werden, um die Geschwindigkeit des fortschreitenden Klimawandels schnellstmöglich zu reduzieren.

Durch Photosynthese sind Mikroalgen in der Lage, das Treibhausgas Kohlenstoffdioxid – unter energetischer Nutzung von Licht – zu assimilieren und zusammen mit einer Stickstoff- und Phosphatquelle als proteinreiche Biomasse zu speichern. Der biomassespezifische Proteingehalt kann dabei, abhängig von der Spezies sowie den Kultivierungsbedingungen, bis zu 71 % der Gesamtbio-trockenmasse betragen und ist damit deutlich höher als bei den meisten terrestrischen Pflanzen (Becker, 2007a). Als „grüne“ Proteinquelle bieten Mikroalgen somit eine vielversprechende Möglichkeit die genannten zukunftsweisenden Herausforderungen zu adressieren. Deshalb ist dieser bioökonomische Ansatz zurzeit Gegenstand einer Vielzahl von Forschungsvorhaben (Lewandowski, 2017).

Neben Proteinen, welche sich aufgrund eines geeigneten Aminosäureprofils sowie ihrer technofunktionellen Eigenschaften sehr gut zur Substitution von tierischen Proteinen in der Human- und Tierernährung eignen, bilden Mikroalgen während der Kultivierung eine Reihe von wertvollen bioaktiven Inhaltsstoffen (FAO/WHO, 1987; Grossmann et al., 2019). Dies sind beispielsweise einfach- und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, akzessorische Pigmente wie Carotinoide, Vitamine, Phytosterole und Polyphenole (Francavilla et al., 2010; Matos, 2017; Rico et al., 2013). Diese Inhaltsstoffe erfüllen größtenteils essenzielle Funktionen im Stoffwechsel der Mikroalgen und finden wegen ihrer positiven ernährungsphysiologischen Eigenschaften sowohl in gesundheitsfördernden Nahrungsergänzungsmitteln, in funktionalen Lebens- und Futtermitteln (sog. „functional foods“) als auch in Kosmetikprodukten Verwendung (Caporgno und Mathys, 2018).

Ein vielversprechender Ansatz, um die Produktion von Bulk-Produkten wie Proteinen auf Basis von Mikroalgen ökonomisch zu realisieren, kann die prozesstechnische Implementierung von

Verfahren zur sequenziellen Gewinnung der genannten mittel- und hochpreisigen Inhaltsstoffe aus einer spezifischen proteinreichen Mikroalgenbiomasse darstellen (Rösch et al., 2018; Caporgno und Mathys, 2018). Als Beispiel für etablierte photoautotrophe Prozesse für Hochwertprodukte auf Basis von Mikroalgen ist die Produktion von Carotinoiden wie beta-Carotin und Astaxanthin mit *Dunalliella salina* bzw. *Haematococcus pluvialis* zu nennen (Vigani et al., 2015). Diese Prozesse zeigen, dass selbst die Produktion einzelner Wertstoffe unter photoautotrophen Bedingungen wirtschaftlich darstellbar ist.

Eine äußerst erfolgsversprechende Gruppe von Mikroalgen zur Etablierung einer Bioraffinerie mit mehreren Produkten stellen Diatomeen (sog. Kieselalgen) dar. Diatomeen sind in der Lage, neben einem biomassespezifischen Proteingehalt von bis zu 50 %<sub>w/w</sub> zusätzlich erhebliche Mengen Eicosapentaensäure (EPA), eine für den Menschen essentielle mehrfach-ungesättigten Omega-3-Fettsäure, wachstumsassoziiert zu synthetisieren. Diese Fettsäure ist in Form von Glycolipiden fester Bestandteil der Thylakoidmembran in Diatomeen. Der EPA-Gehalt der getrockneten Biomasse kann dabei bis zu 5 %<sub>w/w</sub> betragen (Meiser et al., 2004). EPA wird aktuell überwiegend aus Salzwasserfischen gewonnen, wobei auch Fische die Fettsäure nicht selbst synthetisieren können, sondern diese über die Nahrungskette ausgehend von Mikroalgen als Primärproduzenten aufnehmen (Ryckebosch et al., 2014a).

Außer EPA können Diatomeen erhebliche Mengen des akzessorischen Lichtsammelpigments Fucoxanthin bilden. Dieses sauerstoffhaltige Carotinoid (sog. Xanthophyll) kommt auch in den intrinsischen Zwischenräumen der Thylakoidmembranen von Makroalgen, wie z.B. Wakame (*Undaria pinnatifida*) und Kombu (*Saccharina japonica*) vor. In dieser Form ist es bereits fester Bestandteil der traditionellen Ernährung im asiatischen Raum (Nisizawa et al., 1987). Daher wird Fucoxanthin derzeit auch überwiegend aus Makroalgen gewonnen. Makroalgen wiederum werden dabei unter undefinierten Bedingungen kultiviert und müssen mit hohem maschinellen Aufwand an den Meeresküsten geerntet werden. Der biomassespezifische Fucoxanthingehalt in Makroalgen unterliegt saisonalen Schwankungen und ist selbst unter optimalen Bedingungen um etwa den Faktor 10 geringer als der Gehalt in Diatomeen. Dem orange-rötliche Pigment, welches strukturelle Ähnlichkeiten zu den großtechnisch auf Basis von Mikroalgen produzierten beta-Carotin und Astaxanthin aufweist, wird eine Vielzahl gesundheitsfördernder Eigenschaften zugeschrieben (siehe Kap. 2.4.2). Fucoxanthin gewinnt daher in der Humanernährung sowie als Futtermittel in Aquakulturen oder in Kosmetikprodukten zunehmend an Bedeutung (Jouenne und Barbosa, 2018).

Um sowohl Fucoxanthin als auch EPA gezielt mit Diatomeen herstellen zu können, ist es erforderlich, geeignete Produktionsstämme zu identifizieren und effektive Verfahren zur deren Kultivierung in industriellen Photobioreaktoren sowie zur Aufarbeitung der Biomasse zu entwickeln. Zwar sind in der Literatur Daten zum Wertstoffgehalt einzelner Stämme verfügbar, jedoch sind diese aufgrund der sehr unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen nur äußerst bedingt miteinander vergleichbar und auch nur sehr begrenzt auf einen technischen Prozess übertragbar.

Dies ist insbesondere deshalb schwierig, weil aus der Literatur bekannt ist, dass das Mengenverhältnis der Wertstoffe in der Biomasse von Diatomeen in hohem Maße von den Kultivierungsbedingungen abhängt (Nymark et al., 2009; Lepetit et al., 2012). Insbesondere die eingestrahlte Lichtintensität und der Stickstoffgehalt im Nährmedium sind entscheidende Einflussgrößen. Der Umfang dieser Adaption ist jedoch bisher lediglich qualitativ beschrieben, und es mangelt an empirischen quantitativen Daten zur Kultivierung von Diatomeen in skalierbaren Photobioreaktoren.

Diatomeen unterscheiden sich in ihrer stofflichen- und strukturellen Zusammensetzung sehr stark von anderen Mikroalgenspezies wie z.B. Grünalgen (Le Costaouéc et al., 2017). Um nach der Kultivierung beide Wertstoffe in einer oder in mehreren Fraktionen von der proteinhaltigen Biomasse trennen zu können, ist es daher notwendig, die bereits für Grünalgen oder terrestrische Ölpflanzen beschriebenen Extraktions- und Separationsverfahren für Carotinoide und Fettsäuren weiterzuentwickeln und auf Diatomeen anzupassen (Cooney et al., 2009; Pieber et al., 2012). Da die Optimierung der genannten Aufbereitungsverfahren für Diatomeen bisher nicht erfolgt ist, sind nur wenige Daten zu den funktionellen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften der aufgereinigten Wertstoffe verfügbar. Dies gilt insbesondere für das Fucoxanthin.

Aufgrund des Fehlens integrierter Herstellungsverfahren für diese beiden Produkte, welche sowohl die Kultivierung der Algen als auch die Aufarbeitung der Produkte umfassen, kann derzeit auch keine ökonomische Bewertung selbiger Verfahren durchgeführt werden. In Folge dessen sind daher weder die Herstellkosten bekannt noch sind die wesentlichen Kostentreiber eines Herstellverfahrens abgeschätzt worden.

## 1.2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein vollständiges Verfahren zur simultanen Herstellung der Wertstoffe Fucoxanthin und EPA mit Diatomeen zu entwickeln und dieses zu bewerten. Hierfür ist es erforderlich, wesentliche Verfahrensschritte entlang der gesamten Prozesskette sowohl zur Kultivierung der Mikroalgen als auch zur Aufarbeitung der Biomasse spezifisch für Diatomeen und die simultane Gewinnung beider Wertstoffe weiterzuentwickeln.

Da bisher nur wenige Daten zu Kultivierbarkeit, Biomasseproduktivität und biomasse-spezifischem Wertstoffgehalt potentieller Produktionsstämme in industriell genutzten Photobioreaktoren verfügbar sind, muss hierfür zunächst ein geeigneter Stamm identifiziert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Diatomeen die stöchiometrische Zusammensetzung ihres Photosynthese-Apparates und damit den Gehalt der beiden photosynthese-assoziierten Wertstoffe in Abhängigkeit von der Lichtverfügbarkeit sowie von der im Nährmedium vorliegenden Stickstoffkonzentration anpassen können. Der quantitative Umfang dieser Adaption in Photobioreaktoren und die Nutzbarkeit dieses Anpassungsverhaltens zur Optimierung eines technischen Herstellungsprozesses ist bisher jedoch nur unzureichend untersucht worden. Daher sollen in dieser Arbeit empirische Daten zum Einfluss der relativen Lichtverfügbarkeit auf den biomassespezifischen Wertstoffgehalt und auf die volumetrische Wertstoffproduktivität erhoben werden. Aus den gewonnen Erkenntnissen sollen dann erstmals technische Möglichkeiten zur Optimierung eines Kultivierungsverfahrens zur Herstellung von Fucoxanthin- und EPA-reicher Biomasse erarbeitet werden.

Bisher beschriebene Extraktions- und Separationsverfahren zur Gewinnung von Fettsäuren und Carotinoiden aus Mikroalgenbiomasse sind aufgrund erheblicher speziesspezifischer Unterschiede in den vorliegenden Lipidklassen nur sehr eingeschränkt auf Diatomeen übertragbar. Ein Großteil der verfügbaren Methoden ist zudem aufgrund der Art der verwendeten Lösungsmittel und damit verbundener legislativer Vorgaben nicht zur Extraktion von Wertstoffen für die Anwendung in Lebensmitteln geeignet. Ein Teilziel dieser Arbeit ist es daher, die Extraktion einer Fucoxanthin- und EPA-haltigen Lipidfraktion mittels Hochdruckflüssigextraktion (engl. „Pressurized Liquid Extraction“, PLE) zu untersuchen und diese produkt- und speziesspezifisch zu optimieren. Insbesondere sollen geeignete organische Lösungsmittel identifiziert und wesentliche Einflussfaktoren, wie die Extraktionstemperatur und die Verweilzeit, angepasst werden. Zudem soll erstmals untersucht werden, ob die PLE zur direkten Extraktion von Fucoxanthin und EPA aus wässriger Diatomeen-Biomasse eingesetzt

werden kann, um gegebenenfalls einen energie- und kostenintensiven Trocknungsschritt vermeiden zu können.

Die Separation von EPA und Fucoxanthin kann im Labor nach aktuellem Kenntnisstand nur durch aufwendige mehrstufige Chromatographieschritte in Kombination mit nachgeschalteten Flüssig-Flüssig-Extraktionen erreicht werden. Ein Ziel dieser Arbeit ist es daher, ein für einen technischen Prozess vorteilhafteres, skalierbares Verfahren zur einfachen Separation der beiden Wertstoffe zu finden. Für dieses Verfahren soll idealerweise der „Proof of Concept“ im Technikums-Maßstab gezeigt werden. Somit könnten ausreichende Mengen an Produktmuster erzeugt werden, um eine Bewertung der grundlegenden funktionalen und physiologischen Eigenschaften der gewonnenen Wertstoffe für ihren Einsatz in Lebensmitteln zu ermöglichen.

Sämtliche neu gewonnenen prozesstechnischen Erkenntnisse sollen schließlich genutzt werden, um ein optimiertes Herstellungsverfahren zu entwickeln, welches erstmalig eine Bewertung der Wirtschaftlichkeit über die gesamte Prozesskette ausgehend von der Kultivierung bis hin zu den Endprodukten EPA und Fucoxanthin ermöglicht (siehe Abb. 1). Für ausgewählte Produktionsszenarien sollen dazu Produktionskosten für beide Wertstoffe mit Diatomeen abgeschätzt und zudem wesentliche Kostentreiber sowie Möglichkeiten zur Kostenreduktion identifiziert werden.

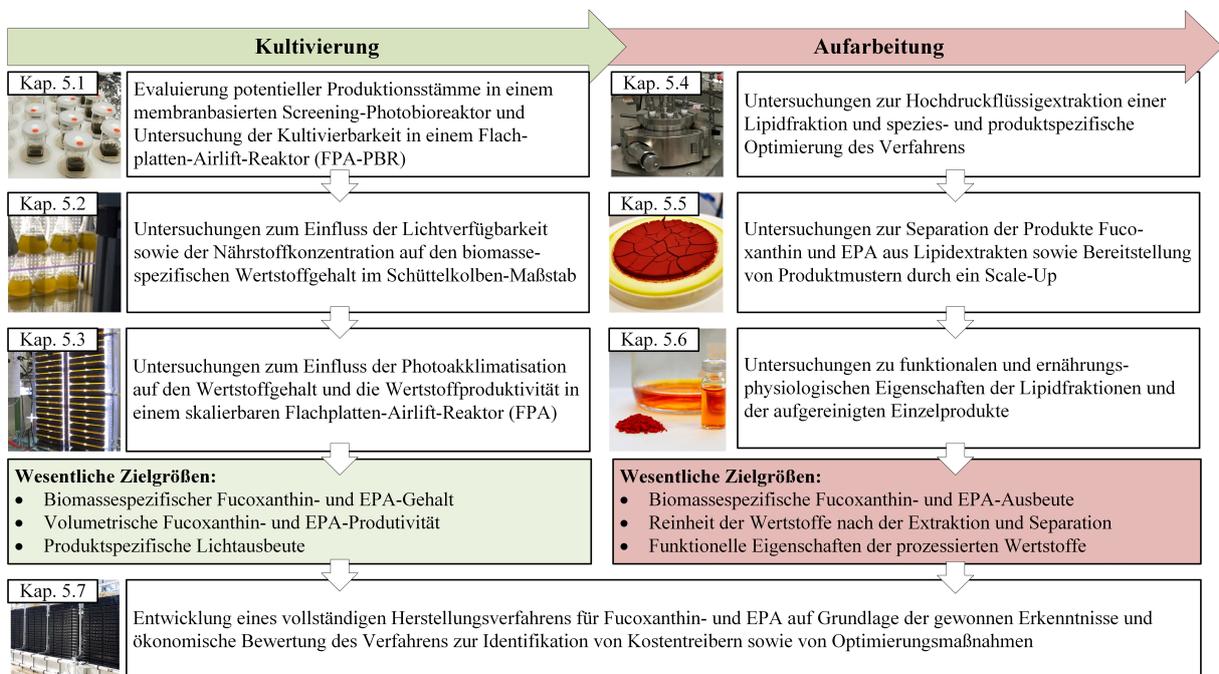


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Inhalte der vorliegenden Arbeit und Zuordnung zu den einzelnen Kapiteln.

## 2 Theoretische Grundlagen

Das nachfolgende Kapitel soll einen Überblick über die zum Verständnis dieser Arbeit notwendigen theoretischen Grundlagen geben. In dieser Arbeit wird primär die Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* zur photoautotrophen Produktion der photosynthese-assoziierten Wertstoffe Fucoxanthin und Eicosapentaensäure (EPA) untersucht. In diesem Zusammenhang wird auf Diatomeen (Kap. 2.1), insbesondere *P. tricornutum*, sowie auf die Lichtreaktion der Photosynthese und die beteiligten Xanthophyllzyklen in Diatomeen eingegangen (Kap. 2.2).

Nachfolgend wird die Bedeutung und Funktion der bisher wenig erforschten Photoakklimatisationsmechanismen der Diatomeen in Abhängigkeit von der relativen Lichtverfügbarkeit beschrieben (Kap. 2.3). Schließlich wird der Aufbau der akzessorischen Lichtsammelkomplexe sowie die Zusammensetzung der Thylakoidmembran im Hinblick auf die Wertstoffe Fucoxanthin und EPA erläutert (Kap. 2.4 und Kap. 2.5).

### 2.1 Diatomeen

Diatomeen (vom griechischen „diatomos“, in zwei geteilt), im deutschen auch unter dem Trivialnamen „Kieselalgen“ bekannt, sind ubiquitär vorkommende, eukaryotische Mikroalgen. Zwei wesentliche Gruppen bilden dabei die pennaten Diatomeen (Bacillariophyceae) und die zentrischen Diatomeen (Mediophyceae) (Bowler et al., 2008). Aus evolutionärer Sicht gehen Diatomeen aus einer komplexen Entstehungsgeschichte hervor, welche sich von der Evolution terrestrischer Pflanzen stark unterscheidet. So wird davon ausgegangen, dass Diatomeen – im Gegensatz zu terrestrischen Pflanzen und Grünalgen – nicht aus der primären Endosymbiose einer heterotrophen Zelle und eines Cyanobakteriums hervorgegangen sind, sondern aus einer zweiten Endosymbiose einer eukaryotischen, heterotrophen Zelle und einer Rotalge (Rhodophyta) (Armbrust, 2009). Aus den genannten Gründen unterscheiden sich Diatomeen in ihrem Zellaufbau gravierend von den meisten eukaryotischen Mikroalgen (siehe Kap. 2.1.1).

Zusammen sind die geschätzten 200.000 verschiedenen Diatomeenspezies für etwa ein Fünftel der gesamten Photosynthese-Leistung der Erde verantwortlich und die jährlich durch Diatomeen erzeugte Biomasse ist vergleichbar mit der Biomasse aller Regenwälder auf der Erde zusammen (Field et al., 1998; Nelson et al., 1995). Entsprechend sind Diatomeen von erheblicher Relevanz für das globale Klima, die Kohlenstoffdioxidkonzentration in der Atmosphäre sowie das marine Ökosystem (Armbrust, 2009). Der durch Diatomeen fixierte Kohlenstoff bildet die Grundlage für viele Nahrungskreisläufe in den Ozeanen und dient damit als Futter für viele Fischarten und Tiefseeorganismen.

### 2.1.1 Klassifizierung und Erkennungsmerkmale

Ein typisches Unterscheidungsmerkmal von Diatomeen gegenüber anderen eukaryotischen Mikroalgenarten, wie z.B. Grünalgen (Chlorophyta) oder Rotalgen (Rhodophyceae), ist die aus hydriertem Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) bestehende Zellwand (Kröger und Sumper, 1998). Aufgrund der Symmetrie der Zellwand kann eine Klassifizierung in zentrische Diatomeen (radial-symmetrisch) und pennate Diatomeen (bilateral-symmetrisch) erfolgen (Falciatore und Bowler, 2002). Anhand dieser Einteilung lässt sich auch auf das Vorkommen der jeweiligen Diatomeen in den aquatischen Lebensräumen rückschließen. So kommen zentrische Diatomeen überwiegend pelagial als Phytoplankton vor, während pennate Diatomeen vermehrt im Benthos, also in Bodennähe der Gewässer, beheimatet sind (Falciatore und Bowler, 2002).

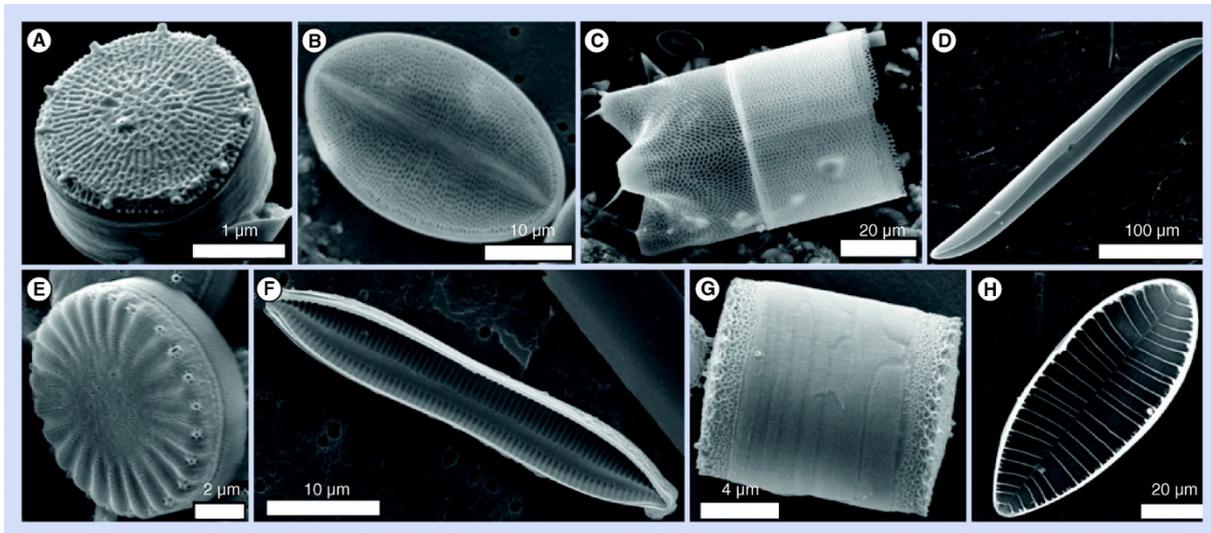


Abbildung 2: REM-Aufnahmen verschiedener Diatomeen, übernommen aus Hildebrand et al. (2012). Von links nach rechts: [A] *Thalassiosira pseudonana*, [B] *Cocconeis* sp., [C] *Lampriscus* sp., [D] *Gyrosigma balticum* [E] *Cyclotella cryptica*, [F] *Nitzschia* sp., [G] *Thalassiosira weissflogii* und [H] *Achnanthes* sp. (Hildebrand et al., 2012).

Ein weiteres Erkennungsmerkmal von Diatomeen gegenüber terrestrischen Pflanzen und anderen Mikroalgenarten ist die vierlagige Chloroplastenmembran, welche auf die zuvor beschriebene sekundäre Endosymbiose zurückzuführen ist. Auch die Anordnung der Thylakoiden in Dreierstapeln ist für Diatomeen typisch (Veith et al., 2009). Die Absorption von Licht zur Photosynthese basiert in Diatomeen – anders als bei Grünalgen und terrestrischen Pflanzen – nicht auf Chlorophyll a und b, sondern auf Chlorophyll a und c sowie dem Lichtsammel pigment Fucoxanthin. Fucoxanthin zählt als sauerstoffhaltiges Carotinoid zur Klasse der Xanthophylle. Alle drei Pigmente liegen in den intrinsischen Zwischenräumen der Thylakoidmembran als Lichtsammelkomplexe (engl. „light harvesting complexes“, LHC), in Form von Fucoxanthin-Chlorophyll a/c-Proteinkomplexen (FCP) vor (Herbstová et al., 2015). Die grün

gefärbten Chlorophyllmoleküle sind gemeinsam mit dem orange-roten Fucoxanthin für die typischerweise bräunliche Farbgebung der Diatomeen-Biomasse verantwortlich.

### 2.1.2 *Phaeodactylum tricornutum*

*Phaeodactylum tricornutum* zählt zu den pennaten Diatomeen und ist der erste Vertreter der Bacillariophyceae, dessen Genom im Jahre 2008 vollständig sequenziert wurde<sup>1</sup> (Bowler et al., 2008). Daher gilt *P. tricornutum* als ein Modellorganismus zur Untersuchung genetischer Modifikationen an Mikroalgen und auch als potentielles Expressionssystem für rekombinante Proteine (Hempel und Maier, 2012). Eine Verwendung als industrielles Expressionssystem scheidet jedoch zurzeit an der Verfügbarkeit von adäquaten Genom-Engineering-Tools, da klassische Ansätze aufgrund des diploiden Genoms und der bisher wenig erforschten sexuellen Fortpflanzung von Diatomeen nur schwer übertragbar sind (Daboussi et al., 2014).

*P. tricornutum* ist von Natur aus polymorph und kann abhängig von äußeren Umwelteinflüssen in drei morphologischen Formen vorkommen: oval, fusiform oder triradiat (siehe Abb. 3). Die verschiedenen Umweltstimuli und Mechanismen, welche morphologische Änderungen der Zellen hervorrufen, sind derzeit weitgehend unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass die Formgebung durch Faktoren wie die mechanische Belastung oder den verfügbaren Silicatgehalt im Nährmedium beeinflusst werden kann (Tesson et al., 2009). Im Gegensatz zu anderen Diatomeen besteht die dreilagige Zellwand von *P. tricornutum* nur zu sehr geringen Teilen aus Siliziumdioxid.

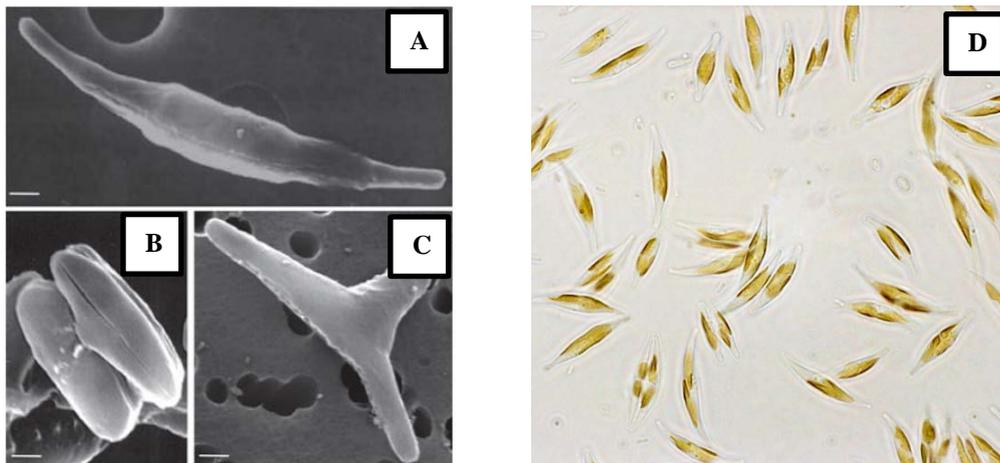


Abbildung 3: SEM-Aufnahmen (links) der drei morphologischen Formen von *P. tricornutum* (A: fusiform, B: oval, C: triradiat) übernommen von Martino et al. (2007) und lichtmikroskopische Aufnahme (D, rechts) des in dieser Arbeit verwendeten Stammes *P. tricornutum* UTEX 640 mit überwiegend fusiformem Erscheinungsbild (eigene Aufnahme). Quellen: (Martino et al., 2007).

<sup>1</sup> Zuvor wurde bereits das Genom der zentrischen Diatomee *Thalassiosira pseudonana* vollständig sequenziert (Armbrust et al., 2004)

Den Großteil der Zellwand bilden Lipide und organische Bestandteile wie Polysaccharide (Le Costaouëc et al., 2017; Tesson et al., 2009). Daher lässt sich *P. tricornutum*, im Gegensatz zu vielen anderen Diatomeen, ohne Zusatz von Silikaten im Nährmedium kultivieren, was wiederum im Hinblick auf prozesstechnische Anwendungen vorteilhaft ist. Die prinzipielle Kultivierbarkeit von *P. tricornutum* in offenen als auch geschlossenen Photobioreaktorsystemen, sowohl unter artifizieller Beleuchtung als auch im Freiland, wurde bereits mehrfach gezeigt (Meiser et al., 2004; Silva Benavides et al., 2013; Santos-Ballardo et al., 2016; Steinrücken et al., 2018).

Die Biomasse von *P. tricornutum* kann unter geeigneten Kultivierungsbedingungen hohe Gehalte der beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Wertstoffe, Fucoxanthin sowie Eicosapentaensäure (EPA), aufweisen (Seibert, 2013; Wu et al., 2016). Beide Stoffe stellen einen integralen Bestandteil des Photosynthese-Apparates der Mikroalgenzellen, insbesondere der Thylakoidmembran, dar (Lepetit et al., 2012). Das Vorkommen beider Wertstoffe und ein hoher Proteingehalt von bis zu 50 %<sub>w/w</sub>, sowie die gute Kultivierbarkeit in geschlossenen Photobioreaktorsystemen in Verbindung mit einer sehr hohen Biomasseproduktivität machen *P. tricornutum* daher prinzipiell zu einem sehr interessanten Produktionsorganismus für beide Stoffe. Der biomassespezifische Gehalt des jeweiligen Wertstoffs hängt dabei jedoch gravierend von den jeweiligen Kultivierungsbedingungen als auch dem spezifischen Wildtyp-Isolat bzw. Phäno- und Genotypen ab. So sind in der Literatur u.a. auch unterschiedliche Angaben zu den Fettsäureprofilen einzelner Unterarten der Gattung *P. tricornutum* zu finden (Qiao et al., 2016; Ryckebosch et al., 2014b). Es ist daher zwingend notwendig konsequent zwischen einzelnen Isolaten bzw. Stämmen zu unterscheiden. Die speziesinterne genetische Diversität von *P. tricornutum* wurden von Martino et al. (2007) untersucht. In dieser Arbeit wurden die Phäno- und Genotypen anhand verschiedener Merkmale, wie z.B. der bevorzugten morphologischen Erscheinung, in zehn *P. tricornutum* Stämmen eingeteilt (Martino et al., 2007).

Der in dieser Arbeit primär verwendete Wildtyp-Stamm *P. tricornutum* UTEX 640 (weitere Bezeichnungen: *P. tricornutum* SAG 1090-1b und CCAP 1052/1B) wurde durch M.B. Allen im Jahre 1963 in Großbritannien unter der Bezeichnung „*Nitzschia closterium* f. *minutissima* Allen et Nelson 1052-1b“ aus salzwasserhaltigen Habitaten isoliert. Der Stamm lässt sich anhand der durch Martino et al. (2007) vorgeschlagenen Klassifizierung durch sein unter Laborbedingungen überwiegend fusiformes aber auch ovales Erscheinungsbild dem morphologischen Phänotypen Pt3 zuordnen. Da sich verschiedene *P. tricornutum* Wildtyp-Stämme

jedoch nicht nur morphologisch, sondern auch in ihrer biochemischen Zusammensetzung unterscheiden können, beziehen sich wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit, wenn nicht anders vermerkt, auf diesen Stamm. Es wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits veröffentlicht, dass dieser spezifische Stamm unter geeigneten Kultivierungsbedingungen einen sehr hohen EPA- aber auch Fucoxanthingehalt bezogen auf die Biotrockenmasse bilden kann (Derwenskus et al., 2019). Auf beide Stoffe wird in Kap. 2.4.2 bzw. Kap. 2.5.2 gesondert eingegangen.

## 2.2 Photosynthese und assoziierte Stoffwechselwege in Diatomeen

Abhängig vom jeweiligen Stamm sind Diatomeen wie *P. tricornutum* in der Lage photoautotroph und auch mixotroph, d.h. mit zusätzlichen organischen C-Quellen wie Glycerin oder Acetat, zu wachsen (Cerón-García et al., 2013). In dieser Arbeit erfolgte die Kultivierung von *P. tricornutum* im Hinblick auf das Ziel einer lichtadaptierten Produktion der photosyntheseassoziierten Wertstoffe Fucoxanthin und EPA ausschließlich photoautotroph. Daher wird in den nachfolgenden Kapiteln auf die Lichtreaktion der Photosynthese sowie die beteiligten Xanthophyllzyklen eingegangen, welche u.a. der Biosynthese von Fucoxanthin dienen.

### 2.2.1 Die Lichtreaktion der Photosynthese

Diatomeen wachsen in Abwesenheit organischer Kohlenstoffquellen photoautotroph und betreiben Photosynthese. Dabei wird Licht als Energiequelle genutzt, um über eine Primärreaktion (Lichtreaktion) und eine Sekundärreaktion (Dunkelreaktion) Kohlenstoffdioxid in organische Kohlenstoffverbindungen nach Gleichung 1 zu fixieren. Hierzu werden 2870 kJ Energie pro mol Glucose benötigt.



Diese sogenannte Lichtreaktion findet an der Thylakoidmembran in den Chloroplasten der Zellen statt. Bei der Lichtreaktion werden Photonen durch Chlorophyll a direkt im Reaktionszentrum des Photosystems II (PS II) absorbiert oder alternativ – wie es bei Diatomeen der Fall ist – durch intrinsische Lichtsammelkomplexe (LHC), häufig auch als Antennenproteine bezeichnet, in den Thylakoidzwischenräumen absorbiert und anschließend an das im PS II befindliche Chlorophyll a (Dimer P680) weitergeleitet. In Diatomeen sind Fucoxanthin und Chlorophyll c integraler Bestandteil der LHC, welche daher auch als sogenannte Fucoxanthin-Chlorophyll c-Proteinkomplexe (FCP) bezeichnet werden (siehe hierzu auch Kap. 2.4.1). In Chlorophyll-a/c-haltigen Organismen tragen Xanthophyll-Moleküle wie Fucoxanthin in größerem Umfang zur Absorption von Licht bei, als es bei Chlorophyll a/b-haltigen Organ-

ismen, wie Grünalgen oder terrestrischen Pflanzen, der Fall ist (Wilhelm, 1990). Das Fucoxanthin ( $\lambda_{\max} = 450 - 540 \text{ nm}$ ) erweitert das absorbierte Lichtspektrum in den blau-grünen Bereich und ist in Diatomeen für etwa 60 % der absorbierten photochemisch genutzten Energie verantwortlich (Papagiannakis et al., 2005). Dies ist aus evolutionärer Sicht insbesondere bei höheren Wassertiefen, in denen das blaugrüne Licht dominiert oder genereller Lichtmangel herrscht, besonders vorteilhaft (Giovagnetti und Ruban, 2017).

Nach der Absorption von Photonen geht das Chlorophyll a im PS II in den angeregten Zustand ( $^1\text{Chl}^*$ ) über und überträgt zwei Elektronen an einen Elektronenakzeptor (ein Pheophytin a Molekül). Durch Spaltung von Wasser in ein Sauerstoffmolekül werden zwei Protonen frei, welche wiederum auf das P680 übergehen. Vom Elektronenakzeptor werden die Elektronen über die Elektronentransportkette zum PS I (P700) transportiert, wobei Protonen ins Lumen der Thylakoidmembran gepumpt werden. Der während der Elektronentransportkette entstandene Protonengradient zwischen Thylakoidmembran und Stroma wird durch Protonenpumpen zur Phosphorylierung von ADP zu ATP eingesetzt. Die an das PS I übertragenen Elektronen schließen eine Elektronenlücke, welche durch erneute Anregung des P700-Komplexes und der Abgabe von Elektronen an einen weiteren Elektronenakzeptor entstanden ist. Über den Akzeptor wird durch das Enzym Ferredoxin-NADP-Reduktase unter Nutzung der Elektronen sowie zwei Protonen aus dem Stroma  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  reduziert. Sowohl ATP als auch  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  gehen schließlich in die Sekundärreaktion (auch Dunkelreaktion bzw. Calvinzyklus) ein. Hierbei wird  $\text{CO}_2$  chemisch in Form des Zuckerbausteines Glycerinaldehyd-3P (GAP) gebunden, welches den Ausgangsstoff für organische Kohlenstoffverbindungen darstellt. Die zuvor beschriebene Lichtreaktion läuft unter moderater Lichtintensität (siehe hierzu auch Kap. 2.3.1, Abb. 6) effizient ab, und es können etwa 80 % der absorbierten Photonen photochemisch verwertet werden (Krause und Weis, 1991; Lohr, 2000). Bei steigender Lichtintensität sinkt die Ausbeute jedoch, da immer mehr Photonen auf „geschlossene“ Photosysteme treffen, sobald die Absorptionsrate die Turn-Over-Rate der Elektronentransportkette überschreitet (Kolber und Falkowski, 1993).

Um eine Schädigung der Photosysteme zu vermeiden, wenn zu viel Licht vorliegt, muss die Energie des angeregten Chlorophylls ( $^1\text{Chl}^*$ ) abgeführt werden, da diese biochemisch nicht mehr genutzt werden kann. Wie durch Lohr (2000) illustriert (siehe Abbildung 4), kann es daher zur Wärmeabgabe und Fluoreszenz sowie zur Bildung von sogenanntem Triplett-Chlorophyll ( $^3\text{Chl}^*$ ) durch sogenanntes Intersystem-Crossing in den Antennen kommen (Peterman et al., 1995; Lohr, 2000).

Unter Anwesenheit von molekularem Sauerstoff wird die Anregungsenergie von  $^3\text{Chl}^*$  auf den Sauerstoff übertragen, und es kommt zur Bildung von Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ).  $^1\text{O}_2$  wiederum kann zu Schädigungen des Photosyntheseapparates führen, da er u.a. mit photosyntheseassoziierten Pigmenten reagiert. Neben  $^1\text{O}_2$  kann die Freisetzung der überschüssigen Anregungsenergie zudem zur Bildung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies, wie Superoxiden  $\text{O}_2^-$  und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), führen (Britton, 1993).

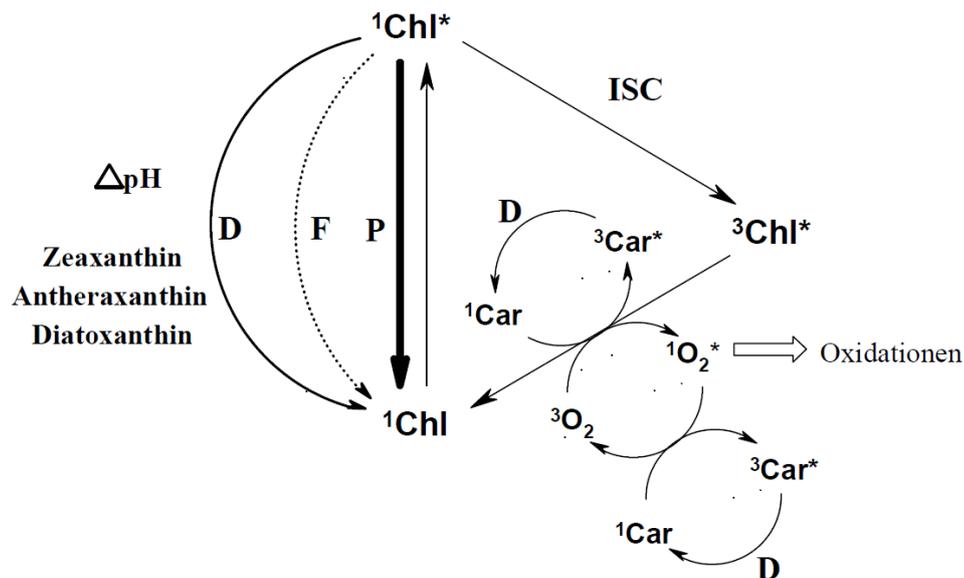


Abbildung 4: Schematische Darstellung der möglichen Deaktivierungswege von Chlorophyll a nach Lichtanregung. Darstellung übernommen aus Lohr (2000) in Anlehnung an Young und Britton (1993) (Lohr, 2000; Young and Britton, 1993). **Legende:**  $^1\text{Chl}$  bzw.  $^3\text{Chl}$ : Chlorophyll im Singulett-Zustand bzw. Triplett-Zustand; **P**: Photochemische Verwertung; **F**: Fluoreszenz; **D**: Dissipation / Wärmeabgabe; **ISC**: Intersystem Crossing; \* = angeregtes Molekül.

Diatomeen besitzen daher Mechanismen zur Vermeidung und Deaktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies („Reactive oxygen species“, ROS) (Young und Britton, 1993). Hier spielen sauerstoffhaltige Carotinoide (Xanthophylle) und damit auch die sog. Xanthophyllzyklen – aus welchen auch das Fucoxanthin hervorgeht – eine entscheidende Rolle (siehe nächstes Kapitel). Wie in Abbildung 4 illustriert, können Carotinoide die Anregungsenergie von  $^3\text{Chl}^*$  entweder direkt übernehmen und in Wärme umwandeln (Dissipation) oder entstandene ROS durch Wärmeabgabe deaktivieren.

### 2.2.2 Die Xanthophyllzyklen

Diatomeen und Mikroalgen, welche evolutionär aus einer zweiten Endosymbiose hervorgegangen sind, besitzen gegenüber terrestrischen Pflanzen und Grünalgen spezielle sauerstoffhaltige Carotinoide. Diese sogenannten Xanthophylle zeichnen sich ausgehend von beta-Carotin durch das Vorhandensein von Hydroxyl-, Carbonyl-, Epoxy- oder Carboxyl-

gruppen aus. Der genaue Biosynthesewege der Xanthophylle in Diatomeen – speziell bis zum Endprodukt Fucoxanthin – ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt (Zarekarizi et al., 2019). Wie in Abb. 5 illustriert, wurden jedoch verschiedene Stoffwechselwege bis zum Endprodukt, dem Fucoxanthin, postuliert (Lohr und Wilhelm, 1999, 2001; Coesel et al., 2008; Bertrand, 2010; Dambek et al., 2012).

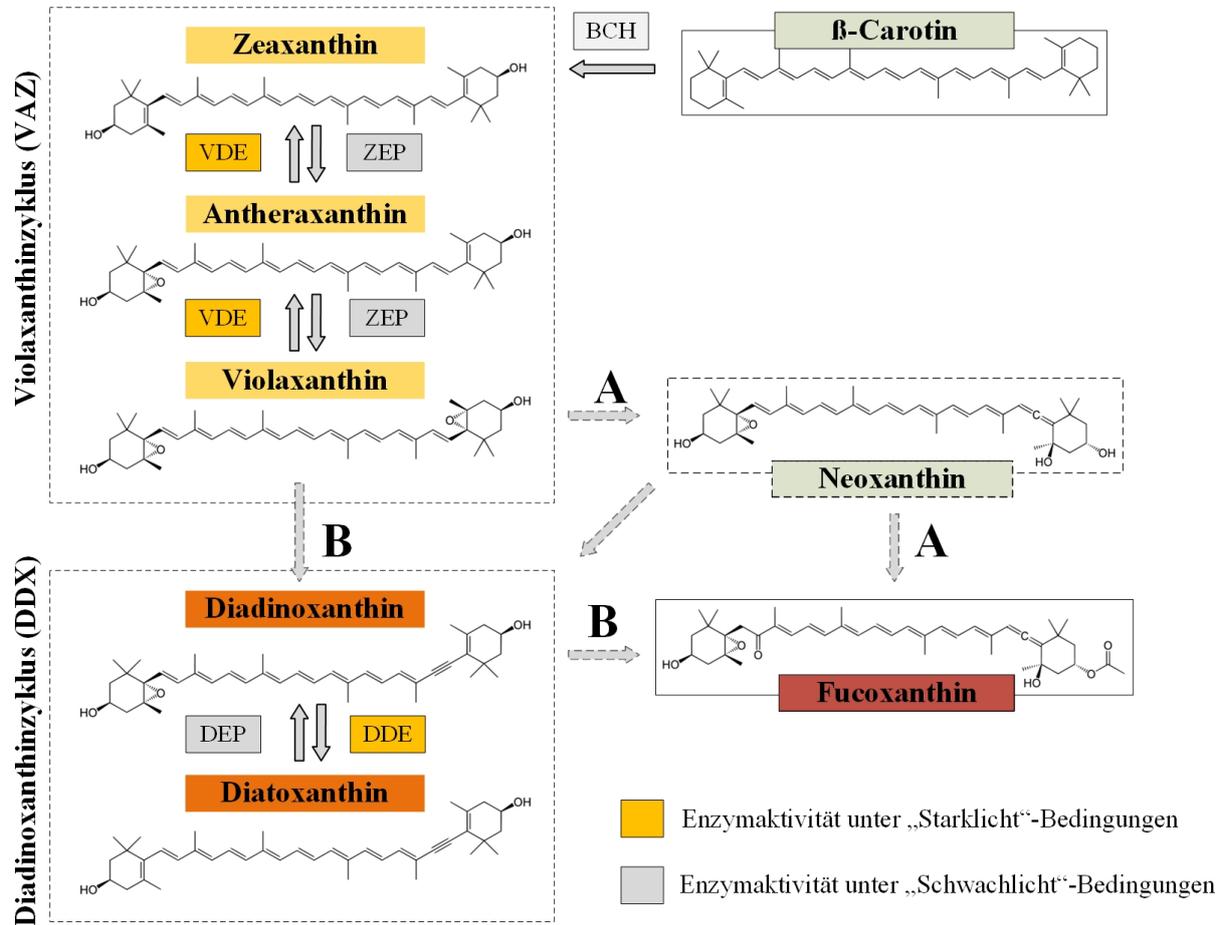


Abbildung 5: Darstellung des Biosyntheseweges von  $\beta$ -Carotin zu Fucoxanthin über den Violaxanthin- und Diadinoxanthinzyklus. Die Darstellung orientiert sich an Bertrand (2010) sowie Kuczynska et al. (2015) und enthält eigene Ergänzungen (Bertrand, 2010; Kuczynska et al., 2015). Gestrichelt umrahmte Pfeile zeigen hypothetische Biosynthesewege **[A]** vorgeschlagen durch (Dambek et al., 2012) und **[B]** durch (Lohr und Wilhelm, 1999). Abkürzungen der beteiligten Enzyme: **BCH** =  $\beta$ -Carotin-hydroxylase; **VDE** = Violaxanthin-de-epoxydase; **ZEP** = Zeaxanthin-epoxidase; **DEP** = Diatoxanthin-epoxidase; **DDE** = Diadinoxanthin-de-epoxidase. Die gelb hinterlegten Enzyme zeigen Aktivität bei hoher Lichtintensität, die grau hinterlegten Enzyme sind bei geringer Lichtaktivität aktiv.

Xanthophylle werden ausgehend von Dimethylallyl-Diphosphat (DMAPP) und dessen Isomer Isopentenylpyrophosphat (IPP) gebildet. Diese beiden Isoprenoidvorstufen werden in pennaten Diatomeen in den Chloroplasten über eine mehrstufige enzymatische Biosynthese, ausgehend von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-P (GAP), über das Zwischenprodukt 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat im sogenannten Methylerythritolphosphatweg (MEP) gebildet. Eine ausführliche Darstellung des MEP-Pathway findet sich z.B. in Bertrand (2010). Im Fall von

zentrischen Diatomeen wurde ebenfalls die Bildung von DMAPP und IPP über den Mevalonatweg (MEV) beschrieben (Bertrand, 2010). Wenngleich keine klare Abtrennung dieser beiden Wege vorherrscht, wird davon ausgegangen, dass der MEV-Weg weniger der Synthese von Carotinoiden als vielmehr der Bildung von Sterolen und verschiedenen Terpenen im Cytosol der Zellen dient (Bertrand, 2010; Masse et al., 2004). Ausgehend von IPP und DMAPP schließt sich die eigentliche enzymatische Carotinoid-Biosynthese an, bei welcher enzymatisch über Lycopon das  $\beta$ -Carotin gebildet wird. Lycopon wird dabei ausgehend von 15-cis-Phytoen über mehrere enzymatische Entsättigungsreaktionen synthetisiert.  $\beta$ -Carotin ist der Ausgangsstoff für beide bisher für Diatomeen postulierten Xanthophyllzyklen (siehe Abb. 5).

Für pennate Diatomeen wie *P. tricornutum* wird von der Existenz von zwei wesentlichen Xanthophyll-Biosynthesewegen ausgegangen: dem Violaxanthinzyklus (VAZ-Zyklus) und dem Diadinoxanthinzyklus (DDX-Zyklus). Die Reaktionssequenz des VAZ-Zyklus umfasst zwei enzymkatalysierte Epoxydierungsschritte vom Zeaxanthin (ZX) zu Violaxanthin (VX) mit Antheraxanthin (AX) als Intermediat (Coesel et al., 2008). Entgegengesetzt kann zudem eine Deepoxydierung des VX über AX zurück zu ZX erfolgen. Nach Dambek et al. (2012) kann im Anschluss an den VAZ-Zyklus aus VX über Neoxanthin (NX) als Precursor die Synthese von Fucoxanthin (FX) erfolgen (Dambek et al., 2012). Wie genau dieser Schritt enzymatisch abläuft ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (Zarekarizi et al., 2019).

Während der VAZ-Zyklus auch in Grünalgen (Chlorophyta) und vaskulären Pflanzen sowie Braunalgen (Phaeophyceae) vorkommt, postulierten Lohr und Wilhelm (1999) erstmals die Existenz des Diadinoxanthinzyklus (DDX-Zyklus) in *P. tricornutum* (Lohr und Wilhelm, 1999). Im DDX-Zyklus wird Diadinoxanthin (DDX) zu Diatoxanthin (DT) enzymatisch de-epoxydiert bzw. DT zu DDX epoxydiert. Lohr und Wilhelm (1999) postulierten zudem die Synthese von FX aus DDX.

Sowohl der VAZ- als auch der DDX-Zyklus spielen als photoprotektive Mechanismen eine entscheidende Rolle beim Schutz der Photosysteme vor übermäßigem Lichtenergieeintrag. Wie in Abb. 5 illustriert, erfolgt im Fall eines hohen Lichteintrags in beiden Zyklen eine De-epoxydierung hin zu Diatoxanthin und Zeaxanthin, wohingegen ein geringerer Lichteintrag zur Synthese der potentiellen Fucoxanthinvorstufen Diadinoxanthin und Violaxanthin führen kann. Über den finalen Biosyntheseschritt zum Fucoxanthin ist bisher sehr wenig bekannt, da es an experimentellen Daten mangelt (Dambek et al., 2012). Dies erschwert auch die Entwicklung biotechnologischer Herstellungsverfahren für Fucoxanthin (Zarekarizi et al., 2019). Das Endprodukt Fucoxanthin ist in Diatomeen als akzessorisches Lichtsammelpigment integraler Be-

standteil von sogenannten Fucoxanthin-Chlorophyll a/c-Proteinkomplexen (FCP), welche in Kap. 2.4.1 genauer beschrieben sind.

## **2.3 Lichtverfügbarkeit und Photoakklimatisation**

Diatomeen sind in ihrer natürlichen Umwelt meist unvorhersehbaren, drastischen Lichtschwankungen ausgesetzt, welche in aquatischen Habitaten aufgrund ständiger Durchmischung deutlich stärker ausgeprägt sind als bei terrestrischen, standortgebundenen photoautotrophen Organismen. Diese unvorhersehbaren Änderungen umfassen eine vertikale Durchmischung in der Wassersäule, Lichtstreuung durch Wellen an der Wasseroberfläche, Wolken, Tageszeiten, Tag-Nachtzyklen und jahreszeitliche Schwankungen (Falkowski und Chen, 2003). Um diesen extremen Fluktuationen entgegenzuwirken haben phototrophe Mikroorganismen verschiedene Strategien entwickelt um die Lichtausbeute (Konversion der Photonen in Biomasse) und den photosynthetischen Elektronentransport bei geringer Lichtintensität möglichst effizient zu gestalten, sowie – vice versa – das Photosystem vor einem zum hohen Energieeintrag und damit einhergehenden Schädigungen zu schützen (Lohr und Wilhelm, 1999; Falkowski und Chen, 2003). Auf diese kurz- und langfristige Adaptionsfähigkeit von Diatomeen an unterschiedliche Lichtintensitäten, welche auch bei der Biomasseproduktion in Photobioreaktoren erfolgen kann, wird in den nachfolgenden Kap. 2.3.1 und 2.3.2 eingegangen.

### **2.3.1 Photonenflussdichte und relative Lichtverfügbarkeit**

Wie in Kap. 2.2.1 beschrieben, stellt Licht die primäre Energiequelle bei der photoautotrophen Kultivierung von Mikroalgen dar. Die Lichtmenge, welche bei der Mikroalgenkultivierung in den Photobioreaktor eingebracht wird, ist dabei von entscheidender Bedeutung für die Biomasseproduktivität und stellt einen wichtigen Betriebsparameter für Photobioreaktoren dar. Sie wird häufig als Photonenflussdichte (PFD) angegeben und beschreibt die Menge des eingebrachten Lichts im PAR-Bereich (engl. „Photosynthetical Active Radiation“, PAR), entweder bezogen auf die beleuchtete Oberfläche oder bezogen auf die Standfläche eines Photobioreaktors. Unter der Annahme, dass Licht das einzige limitierende Substrat darstellt, erreichen Mikroalgen nach Tredici (2010) abhängig von der PFD eine unterschiedliche Photosyntheserate (siehe Abbildung 6).

Nach Tredici (2010) beginnt ab einer bestimmten Photonenflussdichte ( $I_c$ ) die Photosynthese (1) und erreicht schließlich ein Plateau (2) am Sättigungspunkt  $I_s$ . Wird schließlich

eine bestimmte PFD überschritten ( $I_h$ ), kommt es zur Photoinhibierung (3). Die optimale Biomasseproduktivität wird folglich bei Lichtsättigung (2) erreicht.

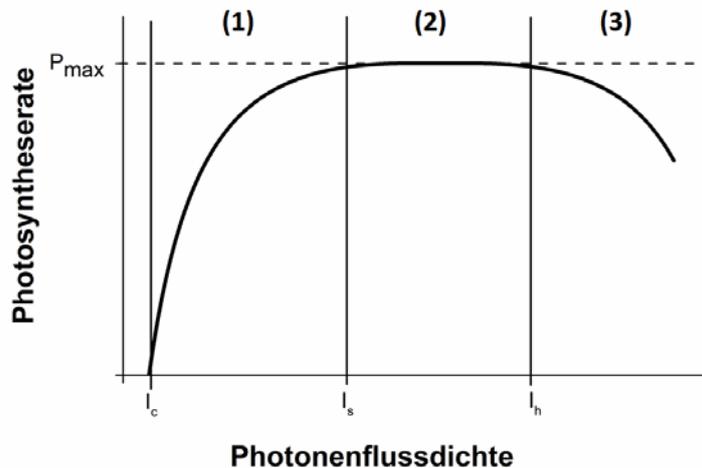


Abbildung 6: Zusammenhang zwischen Photonenflussdichte (PFD) und Photosyntheserate nach Tredici (2010). Darstellung übernommen aus Holdmann 2018, mit eigenen Ergänzungen (Tredici 2010, Holdmann 2018). **Legende:**  $P_{max}$ : maximale Photosyntheserate;  $I_c$ : Initiale Photonenflussdichte zur Photosynthese;  $I_s$ : Sättigungspunkt;  $I_h$ : Übersättigungspunkt, ab dem die PFD inhibitorisch wirkt.

Diese PI-Kurve ist nur bei extrem geringen Zellkonzentrationen gültig. In realen Photobioreaktoren erfolgt dahingegen bereits bei geringen Zellkonzentration eine gegenseitige Beschattung der Zellen. Das für die Photosynthese verfügbare Licht im wässrigen Medium sinkt zudem nach dem Lambert-Beerschen Gesetz, abhängig von der Eindringtiefe und somit auch von der Geometrie des jeweiligen Photobioreaktors. Im Hinblick darauf wurde durch Holdmann (2018) die relative Lichtverfügbarkeit ( $I_{rel}$ ) als Hilfsgröße eingeführt, welche den Quotienten zwischen PFD bezogen auf die Reaktoroberfläche und der Biomassekonzentration im Reaktor darstellt (Holdmann, 2018). Die relative Lichtverfügbarkeit berücksichtigt somit die aktuelle Biomassekonzentration, ist jedoch eine reaktorspezifische Kenngröße und daher nicht zwischen verschiedenen Bioreaktoren mit abweichender Geometrie sowie unterschiedlichen Strömungseigenschaften übertragbar. Es ist daher derzeit notwendig, für jeden Bioreaktortyp und auch jede Algenspezies empirische Daten zu erheben.

In den Bereichen der Photolimitierung (1) als auch der Photoinhibierung (3) (siehe Abb. 6) sind Mikroalgen in der Lage ihren Photosyntheseapparat zu modifizieren, um das Licht effizienter nutzen zu können bzw. das Photosystem vor irreversiblen Schäden zu schützen. Dies kann in einigen Mikroalgen durch die Synthese von photosynthese-assoziierten Pigmenten, wie Xanthophyllen, geschehen (siehe hierzu Kap. 2.3.2). Die gebildeten Pigmente dienen entweder dem Schutz der Zellen (z.B. Astaxanthin in *H. pluvialis*) oder der Verbesserung der Licht-

ausbeute (z.B. Fucoxanthin in Diatomeen oder Haptophyta). In Bezug auf Lichtsammelpigmente wird das beschriebene Phänomen in der Literatur häufig unter den Begriffen der Photoakklimatisation oder Photoadaptation zusammengefasst (Mouget et al., 2004; Rodríguez et al., 2006).

### **2.3.2 Mechanismen zur Photoakklimatisation**

Die Anpassungsmechanismen als Reaktion auf sich ändernde Lichtverhältnisse werden nach der Definition von Falkowski und Roche (1991) unter dem Begriff Photoakklimatisation zusammengefasst und finden in Zeitskalen von Sekunden bis mehreren Tagen statt (Falkowski und LaRoche, 1991; Falkowski und Chen, 2003). Die verantwortlichen molekularen Mechanismen zur Photoakklimatisation in Diatomeen sind jedoch wenig erforscht (Nymark et al., 2009). Nach aktuellem Kenntnisstand sind die wesentlichen Mechanismen die kurzfristige, thermische Dissipation von Strahlungsenergie über den Xanthophyllzyklus (siehe hierzu Kap. 2.2.2) durch Nicht-Photochemisches Quenching (NPQ), die Variation der Pigmentzusammensetzung intrinsischer Pigment-Protein-Antennenkomplexe (FCP) innerhalb der Thylakoid-Zwischenräume (siehe Kap. 2.4.1), sowie die Änderung der Anzahl besagter FCP-Komplexe (Janssen et al., 2000; Nymark et al., 2009; Lepetit et al., 2012).

Nach Nymark et al. (2009) lassen sich die Akklimatisationsmechanismen in Diatomeen – als Reaktion auf Starklicht – in drei Phasen einteilen (Nymark et al., 2009). In der ersten Phase (Response-Phase) ist dabei ein Anstieg der Genregulation von Proteinen zu erkennen, welche mit der Photosynthese, dem Pigmentstoffwechsel, sowie dem Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies assoziiert werden. Im Anschluss an diese ersten photoprotektiven Mechanismen ist in den weiteren Phasen (3 h bis 48 h) eine Änderung in der Zusammensetzung des Photosyntheseapparates und auch dem Gehalt der Lichtsammelpigmente zu beobachten. Insbesondere in der späten Akklimatisationsphase (12 h bis 48 h) führt dies zu einem Anstieg der photosynthetischen Kapazität der Diatomeen und ermöglicht somit eine Verwertung der zusätzlichen Lichtenergie.

Es kann des Weiteren eine Langzeit-Photoakklimatisation (in der Literatur häufig auch als „Photoadaptation“ bezeichnet) der Organismen an neue Lichtverhältnisse stattfinden (Rosen und Lowe, 1984; Janssen et al., 2000). Die Langzeit-Photoakklimatisation umfasst dabei insbesondere die durch Umwelteinflüsse bedingte Selektion der Organismen auf (epi-)genetischer Ebene und damit eine langfristige, „evolutionäre“ Anpassung sowie eine Anpassung intrazellulärer Kompartimente nach der Zellteilung (Mouget et al., 1999; Falkowski und Chen, 2003; Bertrand, 2010). Diese Anpassung kann beispielsweise durch eine Änderung

der Chloroplastengröße, eine Vergrößerung oder Verkleinerung der Thylakoidmembranfläche oder Variation der Pigmentzusammensetzung erfolgen (Rosen und Lowe, 1984; Mouget et al., 1999; Janssen et al., 2000). Mouget et al. (1999 und 2004) demonstrierten beispielweise eine Langzeit-Photoakklimatisation der Diatomee *Haslea ostrearia* in Abhängigkeit von der Lichtintensität sowie unterschiedlichen Wellenlängenspektren des verwendeten Lichts (Mouget et al., 1999, 2004). Dabei konnte eine Änderung der Länge der Chloroplasten der Zellen beobachtet werden, und es erfolgte eine deutliche Abnahme des Fucoxanthingehaltes pro Zelle mit steigender Lichtintensität bzw. Photonenflussdichte. Anning et al. (2000) beobachteten ebenfalls eine Variation des intrazellulären Fucoxanthingehaltes bei Untersuchung der Diatomee *Skeletonema costatum* unter Schwach- bzw. Starklichtbedingungen bei unterschiedlichen Kultivierungen über mehrere Tage (Anning et al., 2000).

Wenngleich die kurz- und langfristige Photoadaptation somit für Diatomeen bereits beschrieben wurde, sind bisher kaum prozesstechnisch belastbare Daten für industrielle Photobioreaktoren und Prozesse vorhanden. Vielmehr sind empirische Versuche notwendig, da z.B. die untersuchte Lichtintensität nicht ohne weiteres unter verschiedenen Reaktorsystemen – bedingt durch eine unterschiedliche Geometrie und Volumen der Reaktorsysteme sowie Unterschiede in der verwendeten Biomassekonzentration – übertragbar sind. Für eine technische Produktion von Fucoxanthin, stellt somit die Photonenflussdichte bzw. relative Lichtverfügbarkeit im Photobioreaktor nicht nur einen entscheidenden Prozessparameter für die volumetrische Biomasseproduktivität dar, sondern ist auch für die stöchiometrische Zusammensetzung der produzierten Biomasse mit ausschlaggebend. Sie ist damit auch für das spätere Downstream-Processing der Biomasse von großer Bedeutung.

## **2.4 Struktur und Pigmentierung der Lichtsammelkomplexe in Diatomeen**

Diatomeen besitzen sogenannte Lichtsammelkomplexe (engl. „light-harvesting complexes“, LHC). Dabei handelt es sich um Fucoxanthin-Chlorophyll a/c-Proteinkomplexe (FCP), welche als Antennenproteine der Photosysteme dienen (siehe Kap. 2.4.1). Das akzessorische Lichtsammelpigment Fucoxanthin ist integraler Bestandteil der FCP. Auf die Molekülstruktur des Fucoxanthins wird in Kapitel 2.4.2 im Detail eingegangen, weil darin auch dessen physiologische Eigenschaften und damit dessen Bedeutung als Wertstoff in der Human- und Tierernährung sowie in kosmetischen Produkten begründet sind.

### 2.4.1 Fucoxanthin-Chlorophyll a/c-Proteinkomplexe (FCP)

FCP sind in den intrinsischen Membranzwischenräumen der Thylakoidmembran lokalisiert, oder in die Thylakoidmembran innerhalb der Chloroplasten der Zellen eingebettet. Sie haben in den Chloroplasten primär die Aufgabe, Lichtenergie aus dem grün- bis blauen Wellenlängenbereich, welche speziell in hohen Wassertiefen dominiert, an das Chlorophyll a in den Reaktionszentren der Photosysteme weiterzuleiten (Giovagnetti und Ruban, 2017). Entsprechend liegt das Absorptionsmaximum  $\lambda_{\max}$  von Fucoxanthin bei 510 bis 525 nm. Es ist bisher nicht geklärt, ob die FCP-Komplexe als Antenne für beide Photosysteme (PS I und PS II) dienen. Es wird jedoch vermutet, dass sie eher dem PS I zuzuordnen sind (Veith et al., 2009). Eine erste strukturelle Darstellung von isolierten FCP-Proteinkomplexen (siehe Abb. 7) aus *P. tricornutum* wurde von Wang et al. (2019) veröffentlicht (Wang et al., 2019).

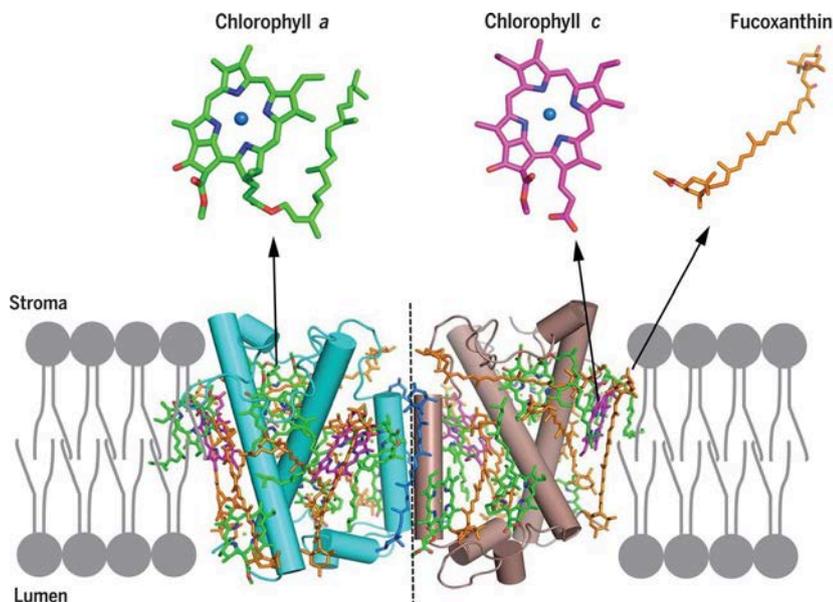


Abbildung 7: Darstellung der Struktur eines in die Thylakoidmembran von Diatomeen als Lichtsammel-Antenne eingebauten FCP-Dimers nach aktuellen Erkenntnissen von Wang et al. (2019). Gezeigt ist ein FCP-Dimer in einer Vergrößerung von 1,8 Å. Die gestrichelte Linie zeigt die symmetrische Achse zwischen den Monomeren. Die Proteinstruktur der beiden Monomere sind in cyan bzw. braun dargestellt (Wang et al., 2019).

Bei *P. tricornutum* liegen FCP überwiegend – aber nicht ausschließlich – als Trimer vor (Lepetit et al., 2012; Wang et al., 2019). Die FCP in Diatomeen enthalten, verglichen mit Antennenproteinen höherer Pflanzen, ein sehr hohes Verhältnis von Carotinoiden – bei Diatomeen ausschließlich Fucoxanthin – zu Chlorophyll. Das Pigmentverhältnis der FCP kann in Diatomeen speziesabhängig variieren. Nach den Beobachtungen von Premvardhan et al. (2010) beträgt das Pigmentverhältnis von Fucoxanthin zu Chlorophyll a zu Chlorophyll c eines FCP-Monomers in der Diatomee *Cyclotella meneghiniana* beispielsweise 8/8/2 (Premvardhan

et al., 2010). Wang et al. beobachteten ein Verhältnis von 7/7/2 für FCP-Monomere in *P. tricornutum* (Wang et al., 2019).

## 2.4.2 Fucoxanthin und dessen physiologische Bedeutung

Fucoxanthin wurde erstmals durch Willstätter und Page (1914) aus Makroalgen isoliert und ist eines der in aquatischen Lebensräumen weitverbreitetsten Carotinoide weltweit (Takao, 2002; Willstätter und Page, 1914). Es stellt aufgrund seines Vorkommens in vielen Makroalgenarten, wie z.B. *Undaria pinnatifida* (Wakame) oder *Eisenia bicyclis* (Akame), bereits seit Jahrhunderten einen Inhaltsstoff in der Ernährung im süd-ost asiatischen Raum dar (Nisizawa et al., 1987). Das orange-rote Xanthophyll besitzt mit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen, wie einer allenen, kumulierten Doppelbindung, einer 5,6-Monoepoxidgruppe, einer konjugierten Carbonylgruppe, einer Acetylgruppe, sowie neun konjugierten Doppelbindungen eine einzigartige Struktur unter den Carotinoiden (Englert et al., 1990).

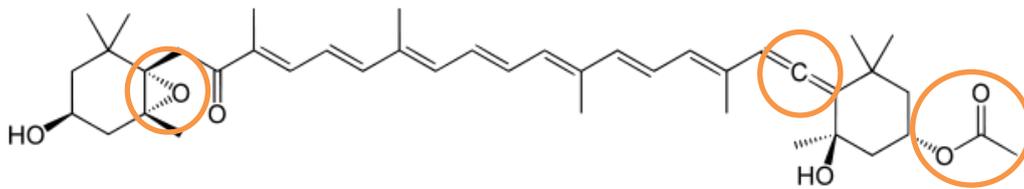


Abbildung 8: Darstellung der Strukturformel von Fucoxanthin und dessen funktionelle Gruppen. Charakteristisch gegenüber anderen Carotinoiden und Xanthophyllen sind insbesondere die Epoxidgruppe, die allene Doppelbindung und die konjugierte Carbonylgruppe (von links nach rechts). Die genannten funktionellen Gruppen stehen auch in Verbindung mit den meisten für Fucoxanthin beschriebenen pharmakologischen Eigenschaften (Englert et al., 1990).

Viele der in der Literatur beschriebenen funktionalen Eigenschaften lassen sich auf die spezielle Molekülstruktur zurückführen und machen Fucoxanthin zu einem hochfunktionalen Wertstoff mit einer Vielzahl von potentiellen Applikationsmöglichkeiten, z.B. als Nahrungsmittel- und Futtermittelzusatzstoff oder in Kosmetikprodukten (Jouenne und Barbosa, 2018; Hu, 2019). Fucoxanthin und fucoxanthinhaltige Extrakte aus Mikro- und Makroalgen sind bekannt als starke Radikalfänger für reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche bedingt durch verschiedene Oxidationsprozesse im menschlichen Körper vorkommen können (Sachindra et al., 2007). Diese Oxidationsprozesse sind Ursache vieler Krankheiten sowie chronischer Leiden. Eine Vielzahl von Veröffentlichungen belegt die Eigenschaften von Fucoxanthin, welches aus Makroalgen gewonnen wurde, freie Radikale abzufangen oder reaktive Substanzen zu reduzieren (Fung et al., 2013; Rajauria et al., 2016; Yan et al., 1999). Die Wirkung von Fucoxanthin kann in-vivo sogar die von bekannteren Antioxidantien wie  $\beta$ -Carotin übersteigen (Sangeetha et al., 2009).

Im Bereich der Humanernährung gelten sowohl Fucoxanthin als auch der in-vivo vorkommende, deacetylierte Metabolit Fucoxanthinol – aufgrund ihrer Eigenschaft, die Differenzierung von Gewebezellkulturen (3T3-L1) hin zu adipösem Gewebe zu hemmen – als potentielle Wirkstoffe zur Reduktion von Übergewicht (Maeda et al., 2006, 2005). Es wurde zudem mehrfach berichtet, dass eine fucoxanthinhaltige Diät den Insulinspiegel in Mäusen positiv beeinflussen und zu einer Reduktion der Gewichtszunahme, u.a. durch Eingriff in die Regulation des Lipidstoffwechsels, führen kann (Jeon et al., 2010; Woo et al., 2009, 2010). Kotake-Nara et al. (2001) zeigten des Weiteren einen, verglichen mit anderen Carotinoiden, starken inhibitorischen Effekt von Fucoxanthin auf das Wachstum von Prostatakrebszellen (Kotake-Nara et al., 2001). Ein ähnlicher Effekt wurde auch durch Hosokawa et al. (1999 und 2004) beobachtet. Deren Studien zeigen, dass Fucoxanthin die Apoptose von Leukämiezellen (HL-60) und Darmkrebszellen (Caco-2) induzieren kann (Hosokawa et al., 1999, 2004; Kim et al., 2010a).

Neben den genannten funktionellen Eigenschaften konnten Gille et al. (2017) zudem anhand von in-vitro-Verdauungsmodellen zeigen, dass Fucoxanthin aus der in dieser Arbeit verwendeten aufgeschlossenen *P. tricornutum* Biomasse eine gute Bioverfügbarkeit aufweist, ähnlich der von  $\beta$ -Carotin (Gille et al., 2017a). Die Bioverfügbarkeit von  $\beta$ -Carotin und Fucoxanthin konnte durch einen mechanischen Zellaufschluss gesteigert werden und ist stark abhängig vom Aufschlussgrad der Algenzellen. Eine detaillierte und umfangreiche Übersicht einer Vielzahl von Studien zu pharmakologischen Eigenschaften von Fucoxanthin wurde z.B. von Peng et al. (2011) und Zarekarizi et al. (2019) verfasst (Peng et al., 2011; Zarekarizi et al., 2019). Zusammenfassend legen die beschriebenen anti-oxidativen, anti-inflammatorischen, krebshemmenden und gewicht-reduzierenden Eigenschaften den Einsatz von Fucoxanthin in verschiedenen Anwendungsbereichen, z.B. als Lebensmittelzusatzstoff oder in Kosmetikprodukten, nahe (Heo und Jeon, 2009; Xia et al., 2013).

## **2.5 Zusammensetzung der Thylakoidmembran in Diatomeen**

Nachfolgend wird auf die Zusammensetzung der Thylakoidmembran in Diatomeen eingegangen, in welche die Photosysteme eingebettet sind und in deren intrinsischen Zwischenräumen die FCP lokalisiert sind (siehe hierzu Kap. 2.4.1). Die Thylakoidmembran besteht überwiegend aus Glyco- und Phospholipiden (Kap. 2.5.1), an welche unter anderem die mehrfach ungesättigte und für den Menschen essentielle Omega-3 Fettsäure EPA gebunden ist (Kap. 2.5.2).

### 2.5.1 Glyco- und Phospholipide

Die Thylakoidmembran in den Chloroplasten von eukaryotischen Mikroalgen wie Diatomeen, Cyanobakterien sowie terrestrischen Pflanzen besteht zu einem großen Teil und in einem speziesspezifischen Verhältnis aus Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) und Sulfoqionovosyldiacylglycerol (SQDG) sowie Phosphoglycolipiden (Boudière et al., 2014; Wilhelm et al., 2014). Zu den Phosphoglycolipiden zählen Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylinositol (PI). MGDG, DGDG und SQDG bilden die lipophile Matrix, in welche u.a. die Photosysteme integriert sind und dienen sowohl als stabilisierende sowie auch wechselwirkende Komponente insbesondere für die Funktion des Photosystems II. Die Integrität der Membran ist von einer angemessenen Zusammensetzung der jeweiligen Lipidklassen abhängig.

Die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Thylakoidmembran ist jedoch nicht die einzige Aufgabe der Glycolipide (Boudière et al., 2014). Während die Funktion der SQDG weitestgehend unbekannt ist, spielen MGDG eine wichtige Rolle bei der Funktion der Xanthophyllzyklen, da sie als Löslichkeitsvermittler hydrophober Pigmente dienen können (Wilhelm et al., 2014). Charakteristisch für die Lipidklasse der MGDG sowie DGDG sind der hohe Gehalt an mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (PUFA), welche an der Position sn-1 gebunden ist. In Diatomeen sind dies oft PUFA mit einer Kettenlänge von 20 oder mehr Kohlenstoffatomen und bis zu fünf Doppelbindungen, wie z.B. Eicosapentaensäure (EPA, C<sub>20:5</sub> n<sub>3</sub>) im Fall von *P. tricornutum*. Während sich an Position sn-2 eine weitere Fettsäure befindet, ist Position sn-3 entsprechend eine polare Kopfgruppe in Form von entweder ein oder zwei Galactose-Molekülen gebunden. Unter biotischem und abiotischen Stress kann es in Algen zu einer Freisetzung von PUFA aus den DGDG kommen, welche anschließend zu Oxylipinen umgewandelt werden (Andreou et al., 2009). Oxylipine wiederum dienen als Signalmoleküle in Algen aber auch in höheren Pflanzen.

Das Fettsäureprofil und der Gehalt an EPA in *P. tricornutum* kann abhängig vom jeweiligen Stamm und den Kultivierungsbedingungen stark variieren und liegt im Bereich von etwa 1,6 bis 5 %<sub>w/w</sub> bezogen auf die Biotrockenmasse (Meiser et al., 2004; Ryckebosch et al., 2014b). Es ist zudem bekannt, dass sich das Verhältnis der verschiedenen Lipidklassen (MGDG, DGDG und SQDG) durch verschiedene Umweltstimuli, wie die Lichtverhältnisse, beeinflussen lässt (Lepetit et al., 2012). So können Diatomeen beispielweise ihre Thylakoidmembranfläche als Reaktion auf verschiedene Lichtverhältnisse anpassen (Rosen und Lowe, 1984; Janssen et al., 2000). Dies legt die Vermutung nahe, dass sich auch das Fettsäureprofil und die Menge der

gebundenen Fettsäuren, wie beispielweise EPA, je nach Größe der Thylakoidmembranfläche abhängig von den zugrundeliegenden Umwelteinflüssen ändern kann.

### 2.5.2 Eicosapentaensäure (EPA) und deren physiologische Bedeutung

Eicosapentaensäure (EPA, 20:5 n-3) ist eine ungesättigte Omega-3-Fettsäure, mit einer Kettenlänge von 20 Kohlenstoffatomen mit insgesamt fünf Doppelbindungen, beginnend am dritten Kohlenstoffatom (n-3) des Methylendes (siehe Abb. 9). Sie kommt, zusammen mit der ebenfalls ungesättigten Docosahexaensäure (DHA, 22:6 n-3), in der Natur überwiegend in marinen Organismen vor. EPA kann durch den menschlichen Organismus nicht in ausreichender Menge synthetisiert werden und muss daher durch Nahrungsaufnahme zugeführt werden. Als eine Vorstufe für eine Vielzahl biologischer Verbindungen, insbesondere für Signalmoleküle wie die Eicosanoide und DHA, erfüllt EPA wichtige physiologische Funktionen (Tassoni et al., 2008). Sie kann dem menschlichen Organismus durch den Verzehr von Fisch, welcher EPA über die Nahrungskette, ausgehend von Mikroalgen aufnimmt, zugeführt werden.

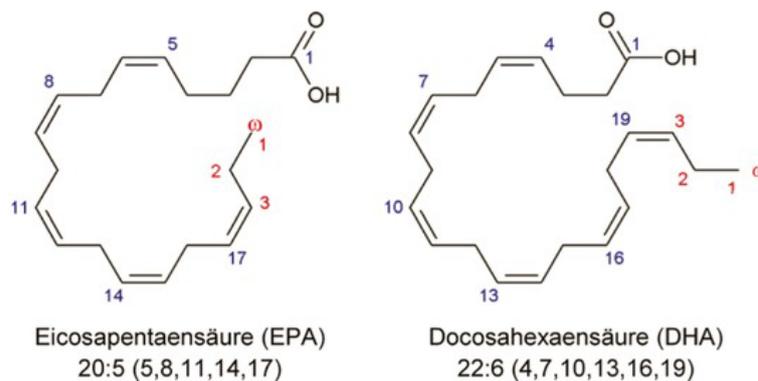


Abbildung 9: Darstellung der Strukturformel der Omega-3 Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA, 20:5, n-3) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6, n-3). Abbildung übernommen aus Seel et al. (2017) (Seel et al., 2017).

Die WHO empfiehlt für die menschliche Ernährung ein Verhältnis von Omega-3 zu Omega-6-Fettsäuren von 1 zu 5 (FAO, 2010). Tatsächlich liegt dieses Verhältnis jedoch in der Ernährungsweise westlicher Industrieländer bei 1 zu 25, weshalb der Verzehr von Omega-3-Fettsäuren empfohlen wird (Simopoulos, 1999; Mario Fernández und Juan, 2000). Eine wesentliche Quelle stellt dabei der Konsum von Fisch dar. Sowohl für DHA als auch für EPA sind verschiedene positive gesundheitliche Effekte, insbesondere im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen, bekannt (Lee et al., 2009). So zeigen verschiedene Studien nach Aufnahme von EPA eine Senkung des Triglyceridgehaltes im Blut, sowie eine Reduktion des Lipoproteinlevels (engl. „low density lipoprotein, LDL) (Rambjør et al., 1996; Oscarsson und Hurt-Camejo, 2017). Eine umfassende Zusammenstellung verschiedener Studien zu den gesundheitsfördernden Eigenschaften von EPA und DHA wurde durch Oscarsson und Hurt-

Camejo (2017) veröffentlicht (Oscarsson und Hurt-Camejo, 2017). Eine gemeinsame Veröffentlichung mit Neumann et al. (2018) – welche im direkten Zusammenhang mit dieser Arbeit steht – zeigt zudem eine gute Bioverfügbarkeit von Fettsäuren wie EPA aus *P. tricornutum* in einer in-vivo-Studie an C57BL/6-Mäusen (Neumann et al., 2018a). Der Zusatz der entsprechenden *P. tricornutum* Biomasse als Futtermittel zeigte keine negativen Auswirkungen und vor allem keine toxischen Effekte. In der entsprechenden Diät wurden bis zu 25 %<sub>w/w</sub> des Futters durch verschiedene Mikroalgen, u.a. *P. tricornutum*, substituiert.

### 3 Stand der Technik

Das nachfolgende Kapitel gibt einen Überblick über die derzeit verwendeten Herstellungsverfahren für Mikroalgen-basierte Produkte. Es wird dabei genauer auf aktuelle Photobioreaktorsysteme zur Produktion von Mikroalgenbiomasse und insbesondere den in dieser Arbeit verwendeten Flach-Platten-Airlift-Photobioreaktor (FPA) eingegangen. Es erfolgt zudem eine Einführung in relevante Aufarbeitungsschritte, wie die Extraktion sowie die Separation von Fettsäuren und Pigmenten aus Mikroalgen im Kontext eines Bioraffineriekonzeptes.

#### 3.1 Mikroalgen-basierte Produkte und derzeit genutzte Herstellungsverfahren

Mikroalgen sind in vielen Kulturkreisen bereits seit Jahrhunderten fester Bestandteil der Ernährung (Spolaore et al., 2006). So wurden Cyanobakterien wie *Athrospira* (ehem. *Spirulina*) und *Nostoc* bereits ab dem 16. Jahrhundert in Mittelamerika von den Azteken, sowie in Afrika und Asien, gesammelt und konsumiert (Farrar, 1966; Ciferri, 1983). Die erste industrielle Produktion von Mikroalgen<sup>2</sup> für die menschliche Ernährung erfolgte in den 1960er Jahren in Japan und wenige Jahre später in Mexiko (Spolaore et al., 2006; Vigani et al., 2015). In den 1980er Jahren folgte schließlich die großtechnische Produktion im asiatischen Raum, Indien, Israel und Australien (Enzing et al., 2014). Eine Abschätzung der weltweiten Produktionskapazität ist aufgrund vieler nicht-erfasster Produktionsstätten in China schwierig. Tabelle 1 gibt hierzu einen grundlegenden Überblick.

Die wesentlichen Anwendungsbereiche für Mikroalgen stellen aktuell die Human- und Tierernährung sowie Kosmetikprodukte dar. Für die Humanernährung werden die Mikroalgen *Arthrospira* (Spirulina) und *Chlorella* überwiegend als getrocknetes Pulver oder in Tablettenform als proteinreiches Nahrungsergänzungsmittel mit bioaktiven Inhaltsstoffen vermarktet (Caporgno und Mathys, 2018). Sie können ebenfalls in bestehende Fertigprodukte, z.B. Nudeln oder Biskuits, eingearbeitet werden. Letztere Variante gestaltet sich in Verbindung mit klassischen Nahrungsmitteln jedoch aufgrund des dadurch oftmals erzeugten fisch-artigen Geschmacks und Geruchs sowie der veränderten Färbung der Lebensmittel im Hinblick auf die Akzeptanz beim Konsumenten eher schwierig (Becker, 2007a; Beheshtipour et al., 2013).

Mikroalgen-basierte Produkte, wie die Carotinoide  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin aus den Mikroalgen *Dunaliella salina* und *Haematococcus pluvialis*, sowie die mehrfach-ungesättigten

---

<sup>2</sup> Kultiviert wurde eine Grünalge der Gattung *Chlorella*.

Omega-3-Fettsäuren wie Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) aus *Schizochytrium*, werden aufgrund ihrer Vielzahl potentiell gesundheitsfördernder Eigenschaften (siehe hierzu auch Kap. 2.5.2) ebenfalls als Nahrungsergänzungsmittel angeboten oder zur Funktionalisierung in bestehende Lebensmittelformulierungen eingearbeitet (Caporgno und Mathys, 2018). Pigmente, wie beispielsweise Phycobiline aus Cyanobakterien (wie z.B. *Arthrospira*), dienen als natürlicher Farbstoff für Lebensmittel. Das bekannteste Beispiel stellt das blaue Pigment Phycocyanin dar.

Tabelle 1: Produkte und geschätzte Produktionsvolumina für ausgewählte Mikroalgen-basierte Produkte aus Enzing et al. (2014) und Vigani et al. (2015) mit eigenen Ergänzungen.

Alge / Gattung	Produktionsvolumen	Produkt	Anwendungsbereich
	[t/a] (Jahr)		
<i>Arthrospira</i>	5000 (2012) <sup>(a)</sup>	ganze Zellen	Nahrungsmittel, Futtermittel, Kosmetika
<i>Chlorella</i>	2000 (2003) <sup>(a)</sup>		
<i>Dunaliella salina</i>	1200 (2006) <sup>(c)</sup>	β-Carotin	Nahrungsmittel
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300 (2004) <sup>(a)</sup>	Astaxanthin	Nahrungsmittel, Futtermittel, Kosmetika
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	240 (2003) <sup>(b)</sup>	Omega-3-Fettsäuren	Nahrungsergänzungsmittel, Kindernahrung, Futtermittel, Kosmetika
<i>Schizochytrium</i>	10		
<i>Cyanobakterien</i>	n.v.	Phycocyanin, Phycobiline	färbendes Pigment für Lebensmittel

<sup>(a)</sup>(Norsker et al., 2011); <sup>(b)</sup>(Milledge, 2011); <sup>(c)</sup>(Spolaore et al., 2006); n.v.: Menge nicht bekannt

Lediglich sieben Mikroalgenpezies bzw. Gattungen besitzen zurzeit den GRAS-Status („Generally Regarded As Safe“) der US Food- and Drug Administration (FDA): *Arthrospira*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Schizochytrium*, *Pophyridium cruentum* und *Cryptocodinium cohnii* (García et al., 2017). Die Einführung neuer Mikroalgenarten als Lebensmittel oder Nahrungsergänzungsmittel ist derzeit aufgrund legislativer Vorgaben sehr aufwendig. So gelten beispielsweise alle Mikroalgen sowie mikroalgen-basierte Produkte, welche nicht bereits vor dem 15. Mai 1997 in signifikanten Mengen konsumiert wurden, nach EU-Regulation 2283/2015 (in Kraft getreten zum 01.01.2018, ehem. EG-Verordnung 258/97, Novel Food Regulation, NFR) in der EU als „Novel Food“ und müssen aufwendige Zulassungsverfahren und Sicherheitsbetrachtungen durchlaufen (van der Spiegel et al., 2013). Diatomeen wie *P. tricornutum* sowie deren Bestandteile sind derzeit nicht für den Einsatz in Lebensmitteln zugelassen. Der europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit („European Food Safety Authority“, EFSA) liegen jedoch bereits Anträge zur Zulassung für EPA- und fucoxanthinhaltige Extrakte aus *P. tricornutum* für Lebensmittelapplikationen vor (EFSA, 2019).

Neben der Humanernährung stellt der stetig wachsende Markt für Futtermittel, insbesondere für Aquakulturen, einen wesentlichen Anwendungsbereich für Mikroalgen dar (FAO, 2010). Mikroalgen dienen aufgrund der Vielzahl enthaltener Nährstoffe hierbei primär als immunstimulierendes Protein- und Omega-3-Fettsäure-reiches Futtermitteladditiv sowohl für terrestrische als auch aquatische Tiere (Spolaore et al., 2006; Becker, 2007b). Sie werden u.a. angewendet um die Tiergesundheit, z.B. bei Jungfischen und Fischlarven, zu fördern oder um das spätere Erscheinungsbild der Produkte für den Konsumenten zu optimieren. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Zugabe von Astaxanthin als lipophiles, rötliches Pigment in der Lachszucht. Im Bereich der Tierernährung werden neben den zuvor genannten Mikroalgen mit GRAS-Status weitere Mikroalgenarten wie Diatomeen (z.B. *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Chaetoceros* oder *Navicula*) oder Haptophyta (z.B. *Isochrysis*) eingesetzt (Apt und Behrens, 1999; Harel und Clayton, 2004; Spolaore et al., 2006). Ursächlich hierfür sind im Wesentlichen die großen Mengen mehrfach-ungesättigter Fettsäuren, immunstimulierende Substanzen wie beta-1,3-Glucane (Laminarin), sowie Carotinoide in der Algenbiomasse (Caballero et al., 2016; Jouenne und Barbosa, 2018). Im Fall einiger der genannten Spezies, beispielsweise *P. tricornutum* oder *Isochrysis galbana*, ist zudem bereits gezeigt worden, dass diese Arten keine Toxine bilden (Matos, 2017). Sie erfüllen somit eine der Grundvoraussetzungen für eine Applikation in der Human- und Tierernährung.

Carotinoide, vor allem Astaxanthin, und beta-Glucane finden auch in der Kosmetikindustrie Verwendung (Eisfeld und Mehling, 2003; Ayalon, 2017). Hinzu kommen hier Exopolysaccharide (z.B. aus *Nostoc*). Zur Anwendung kommen hier meist Extrakte oder aufgereinigte Produkte, wobei in der Kosmetikindustrie insbesondere die funktionellen Eigenschaften der jeweils enthaltenen Substanzen eine entscheidende Rolle spielen. Astaxanthin beispielsweise werden sowohl anti-oxidative Eigenschaften als auch anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben.

Zusammenfassend stellen Pigmente und mehrfach-ungesättigte Fettsäuren neben der Verwendung von ganzen Zellen derzeit die einzigen kommerziell relevanten Produkte aus Mikroalgen dar. Viele Spezies, wie Diatomeen oder Haptophyta, sind jedoch in der Lage, beide genannten Stoffklassen wachstumsgekoppelt zu produzieren. Darum besteht ein Bedarf nach geeigneten Produktionsverfahren sowie Bioraffineriekonzepten, welche in der Lage sind, beide Produktklassen effizient aus der erzeugten Biomasse zu isolieren und für verschiedene Applikationsmöglichkeiten bereit zu stellen.

### 3.1.1 Verfahren zur Gewinnung von Fucoxanthin

Die mehrstufige chemische Synthese von Fucoxanthin ist nach aktuellem Kenntnisstand sehr aufwendig (Kajikawa et al., 2012). Historisch bedingt wurde die Produktion von Fucoxanthin und Fucoxanthin-reichen Extrakten bisher überwiegend an Makroalgen oder deren Verarbeitungsrückständen im asiatischen Raum untersucht (Shang et al., 2011). Alleine in Japan werden jährlich etwa 305.000 Tonnen Wakame konsumiert, weshalb Makroalgen hier in großen Mengen verfügbar sind (Kanazawa et al., 2008).

Der Fucoxanthingehalt in der Biotrockenmasse von Makroalgen ist jedoch verglichen mit dem von einigen Diatomeen (Bacillariophyta) oder Vertretern der Haptophyta wie *Isochrysis* um ein Vielfaches geringer (siehe Tabelle 2). Im Gegensatz zu Mikroalgen müssen Makroalgen zudem aufwendig manuell geerntet werden und können nur saisonal kultiviert werden. In Kombination mit geringen Produktausbeuten beim Downstream-Processing ist eine gezielte Produktion auf Basis von Makroalgen daher zurzeit ökonomisch nur mit hohem Aufwand darstellbar (Kajikawa et al., 2012; Kanazawa et al., 2008).

Tabelle 2: Fucoxanthingehalt verschiedener Mikro- und Makroalgen bezogen auf das Biotrockengewicht basierend auf der Zusammenstellung von Petrushkina et al. (2017) und Zarekarizi et al. (2019) mit eigenen Ergänzungen (Petrushkina et al., 2017, Zarekarizi et al., 2019).

Typ	Spezies	Fucoxanthingehalt [mg g <sup>-1</sup> ]	Quellen
<b>Makroalge</b>	<i>Undaria pinnatifida</i>	1,77 – 2,08*	(Fung et al., 2013)
	<i>Turbinaria turbinata</i>	0,59	(Jaswir et al., 2012)
	<i>Sargassum plagyophyllum</i>	0,71	(Jaswir et al., 2012)
	<i>Sargassum aquifolium</i>	0,73	(Jaswir et al., 2012)
<b>Mikroalge</b>	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	5,25	(Foo et al., 2015)
	<i>Cylindrotheca closterium</i>	5,23	(Pasquet et al., 2011)
	<i>Cylindrotheca closterium</i>	25,5	(H. Wang et al., 2018)
	<i>Mallomonas sp.</i>	26,6	(Petrushkina et al., 2017)
	<i>Isochrysis aff. galbana</i>	18,23	(Kim et al., 2012b)
	<i>Isochrysis galbana</i>	6,04	(Kim et al., 2012b)
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	15,42 – 16,51	(Kim et al., 2012a)
		5,5	(Wu et al., 2016)
		8,55	(Kim et al., 2012b)
		9,9 – 59,2**	(McClure et al., 2018)
<i>Nitzschia sp.</i>	4,92	(Kim et al., 2012b)	
<i>Odontella aurita</i>	18,47	(Xia et al., 2013)	

\*abhängig vom Erntezeitpunkt (saisonale Unterschiede); \*\*abhängig von den Kultivierungsbedingungen

Verschiedene Publikationen zeigen, dass Haptophyta wie *Isochrysis aff. galbana* (CCMP 1324) und Diatomeen wie *Odontella aurita* (SCCAP K-1251) einen Fucoxanthingehalt von etwa

18 mg g<sup>-1</sup> bezogen auf die Biotrockenmasse erreichen können, wobei der Gehalt nicht nur von der jeweiligen Spezies sondern auch gravierend von den Kultivierungsbedingungen beeinflusst wird (Kim et al., 2012b; Xia et al., 2013).

Für *P. tricornutum* liegt der in der Literatur beschriebene spezifische Fucoxanthingehalt zwischen 5,5 bis 59,2 mg g<sup>-1</sup> (McClure et al., 2018). Neben dem Fucoxanthingehalt unterscheiden sich die Mikroalgenstämme sehr stark in der volumetrischen Fucoxanthinproduktivität, welche wiederum stark vom verwendeten Photobioreaktorsystem beeinflusst wird. McClure et al. (2018) berichten unter Verwendung von *P. tricornutum* von einer volumetrischen Fucoxanthinproduktivität von 2,3 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> in einem Flachplatten-Photobioreaktor, bei einer maximalen volumetrischen Produktkonzentration von 20 mg L<sup>-1</sup>. Wang et al. (2018) berichten von einer maximalen volumetrischen Produktivität von 1,4 bis 1,8 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> in zwei geschlossenen Photobioreaktoren (Fa. Phytolutions) mit der Diatomee *Cylindrotheca closterium* (H. Wang et al., 2018). Der globale Markt für Fucoxanthin für die Hauptanwendungsgebiete Ernährung und Kosmetik, ist derzeit schwer einzuschätzen, da es kein äquivalentes Produkt und nur sehr wenige Informationen gibt (Jouenne und Barbosa, 2018). Am ehesten ist das Xanthophyll mit dem kommerziell erhältlichen Astaxanthin aus *H. pluvialis* zu vergleichen. Der Markt für Carotinoide wurde im Jahre 2016 auf 1,24 Mrd.-US\$ beziffert, mit einer Prognose von 1,53 Mrd.-US\$ im Jahre 2021 (Ambati et al., 2019). Wesentliche für das Marktwachstum verantwortliche Carotinoide stellen dabei das Astaxanthin, beta-Carotin und Lutein dar (Novoveská et al., 2019). Der Markt für Fucoxanthin wird für das Jahr 2015 auf 500 t a<sup>-1</sup> mit einem Wachstum von 5,3 % a<sup>-1</sup> von 2016 bis 2021 geschätzt (Reportstack, 2016). Der aktuelle Marktpreis für Fucoxanthin wird nach aktuellen Studien auf 10.000 US\$ kg<sup>-1</sup> geschätzt (Jouenne und Barbosa, 2018) und liegt dabei in ähnlichen Dimensionen wie der Preis für Astaxanthin. Astaxanthin wird zumeist nicht als Reinsubstanz angeboten, sondern als Oleoresin mit einem Astaxanthinanteil zwischen drei bis fünf Prozent.

### **3.1.2 Verfahren zur Gewinnung von EPA**

Im industriellen Maßstab wird EPA als Nahrungsergänzungsmittel primär aus Fischöl, Krill oder Sojalecithin gewonnen (Jouenne und Barbosa, 2018). Im Fisch liegt naturgemäß ein Gemisch aus DHA und EPA vor (siehe hierzu Tabelle 3). Daher entsteht auch bei der Herstellung von Fischöl immer ein Gemisch aus beiden Fettsäuren (Barclay et al., 2010). Es liegt zudem meist deutlich mehr DHA als EPA vor, und beide Fettsäuren lassen sich aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten nur sehr schwer voneinander trennen. Einige Mikroalgenarten

produzieren hingegen fast ausschließlich eine der beiden Fettsäuren. Somit kann z.B. eine definierte Dosierung einer der beiden Fettsäuren in entsprechenden Produkten erreicht werden.

Mikroalgen bieten gegenüber Fischöl zudem Vorteile bezüglich des Geschmacks und Geruchs (Jouenne und Barbosa, 2018). DHA-haltiges Öl (40-45%) wird kommerziell bereits mit der Mikroalge *Cryptocodinium cohnii* unter heterotrophen Bedingungen produziert (Winwood, 2013). Es werden aber auch DHA-Öle mit einem geringen EPA-Anteil (< 2 %) auf Basis von *Schizochytrium* vertrieben. Die Kultivierung von *Schizochytrium* erfolgt ebenfalls heterotroph. Aktuell wird geschätzt, dass der Markt für Omega-3-Fettsäuren, zu welchen auch EPA und DHA zählen, von etwa 500 Millionen (2014) auf vier Milliarden US\$ (2022 - 2024) ansteigen wird (Globenewswire, 2017).

Tabelle 3: Gehalt und Verhältnis von DHA und EPA in Meeresfisch und Mikroalgen.

<b>Ressource</b>	<b>DHA (g/100g)</b>	<b>EPA (g/100g)</b>	<b>Verhältnis DHA:EPA</b>	<b>Quellen</b>
<b>Fisch</b>				
<i>Blauflossen Thunfisch</i>	1,14	0,36	3,1 : 1,0	(Lee et al., 2009, 2008)
<i>Lachs (Zucht, Atlantik)</i>	1,43	0,41	3,5 : 1,0	(Lee et al., 2009, 2008)
<i>Hering (Atlantik)</i>	1,11	0,91	1,2 : 1,0	(Lee et al., 2009, 2008)
<i>Makrele (Atlantik)</i>	0,70	0,51	1,4 : 1,0	(Lee et al., 2009, 2008)
<i>Heilbutt</i>	0,37	0,09	4,1 : 1,0	(Lee et al., 2009, 2008)
<b>Mikroalgen</b>				
<i>Nannochloropsis sp.</i>	0,08	1,28	1,0 : 16,0	(Hu und Gao, 2003)
<i>Nannochloropsis sp.</i>	-	4,77	-	(Zittelli et al., 1999)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	n.a.	3,63	-	(Ryckebosch et al., 2014c)
<i>P. tricornutum (Bohlin)</i>	0,05	3,07	1,0 : 61,4	(Qiao et al., 2016)
<i>P. tricornutum UTEX 642</i>	0,06	2,2	1:0 : 37,7	(Vazhappilly und Chen, 1998)
<i>P. tricornutum UTEX 640</i>	-	5,0	-	(Meiser et al., 2004)
<i>P. tricornutum CCMP 2561</i>	0,11	1,64	1,0 : 14,91	(Ryckebosch et al., 2014c)
<i>Isochrysis galbana</i>	1,48	0,05	29,6 : 1,0	(Ryckebosch et al., 2014c)
<i>Tetraselmis sp. (M8)</i>	< 0,01	0,47	-	(Li et al., 2014)

n.a. = keine Angabe; - = nicht detektiert

Im Hinblick auf den EPA-Gehalt in der Biomasse von Diatomeen sind die Beobachtungen in der Literatur sehr divers. So beschrieben Christadha und Borowitzka (1994) beispielweise eine Erhöhung des EPA-Gehaltes in der Biomasse von *P. tricornutum* bei erhöhter Photonenflussdichte (Christadha und Borowitzka, 1994). Liang et al. (2006) berichten von einer Reduktion des EPA-Gehaltes in der Biomasse von *P. tricornutum* bei steigender Zelldichte und damit einer reduzierten Lichtverfügbarkeit, wohingegen Qiao et al. (2016) keinen signifikanten Zusammenhang zwischen zugeführter Lichtmenge und EPA-Gehalt beobachteten (Liang et al.,

2006; Qiao et al., 2016). Abhängig vom Prozess und dem Kultivierungssystem liegt die volumetrische EPA-Produktivität von *P. tricornutum* in Photobioreaktoren im Bereich von 12 bis 52 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Meiser et al., 2004; Steinrücken et al., 2018). Neben anderen Mikroalgenarten, wie z.B. verschiedenen Vertretern der Gattung *Nannochloropsis*, stellt *P. tricornutum* daher einen vielversprechenden Produktionsstamm für die photoautotrophe EPA-Produktion dar.

### 3.2 Photobioreaktoren zur Produktion von Mikroalgenbiomasse

Die Systeme zur photoautotrophen Kultivierung von Mikroalgen lassen sich prinzipiell in zwei Gruppen einteilen: offene und geschlossene Systeme (Pulz, 2001). In der ersten Kategorie sind sogenannte Open-Ponds oder auch Raceway-Ponds zusammengefasst, welche die zurzeit am häufigsten kommerziell eingesetzten Produktionssysteme darstellen (Kap. 3.2.1). Die Gruppe der geschlossenen Photobioreaktoren umfasst verschiedene Bauarten von Rohreaktoren und Flachplattenreaktoren (Kap 3.2.2). Die folgenden Kapitel sollen einen kurzen Überblick über Photobioreaktorkonzepte geben, wobei der Schwerpunkt auf den in dieser Arbeit verwendeten Flach-Platten-Airlift-Photobioreaktor gelegt wird (Kap 3.2.3).

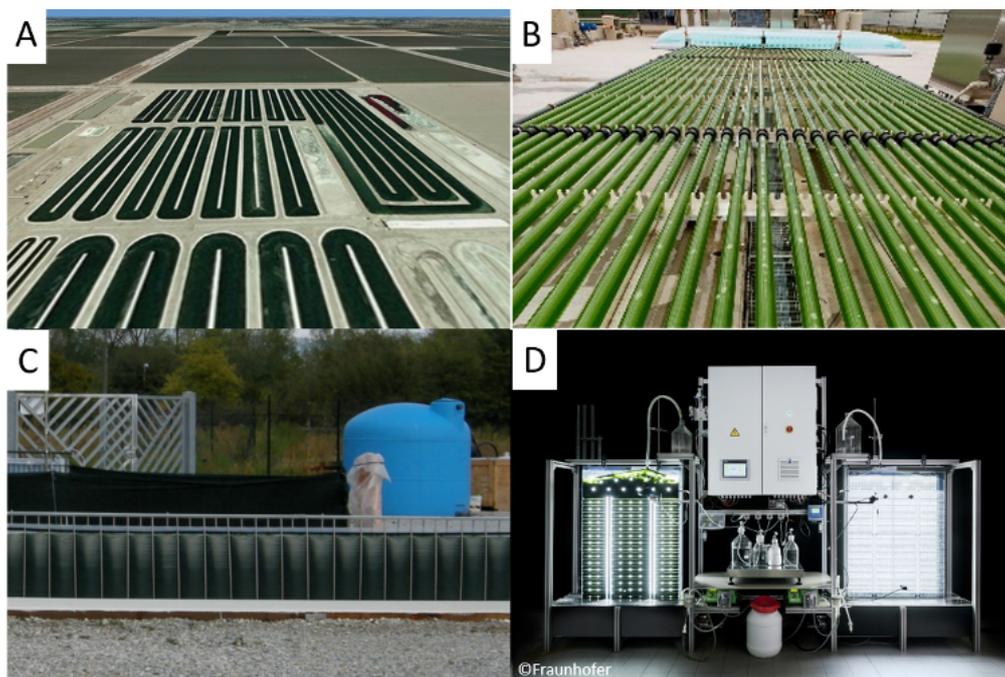


Abbildung 10: Darstellung verschiedener Photobioreaktorkonzepte aus Derwenskus und Holdmann (2017). [A]: Open-Pond in Südkalifornien (White, 2011); [B]: Röhrenreaktor im AlgaePARC in Wageningen, Niederlande (Wageningen UR, 2015); [C] Flachplattenreaktoren (Greenwall panel) an der Universität in Florenz; [D]: Flachplatten-Airlift-Reaktor (FPA) Doppelstand mit Steuerungseinheit am Fraunhofer IGB, Stuttgart.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass einige Mikroalgenarten auch mixotroph und heterotroph, auf Basis von Kohlenstoffquellen wie Glucose, Acetat oder Glycerin kultiviert werden können. Entsprechend ist eine Kultivierung in klassischen Rührkesseln prinzipiell denkbar. Dies gilt

auch für *P. tricornutum*, wengleich entsprechende Studien von Céron-García et al. (2013) anhand der für in dieser Arbeit verwendeten Stämmen am Fraunhofer IGB, Fraunhofer CBP sowie der Hochschule Köthen unabhängig voneinander im Zeitraum der Entstehung der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden konnten (Céron-García et al., 2013; Brinitzer, 2019). Bei heterotropher Kultivierung kann in klassischen Rührkesseln eine sehr hohe Biomasseproduktivität erreicht werden. Dabei entfallen jedoch wesentliche Aspekte, wie die Nutzung von CO<sub>2</sub> und die energetische Nutzung von Lichtenergie. Auf entsprechende Systeme wird aufgrund der fehlenden Relevanz für diese Arbeit – im Hinblick auf die Produktion von photosynthese-assoziierten Wertstoffen – daher nicht genauer eingegangen.

### 3.2.1 Offene Photobioreaktoren

Sogenannte „Open Ponds“ (offene Teiche) bestehen meist aus Betonbecken mit einer Tiefe von etwa 15 bis 30 cm. Häufig wird die Mikroalgenkultur durch Schaufelräder oder eine Umwälzpumpe durchmischt bzw. im Kreis gepumpt, wie es z.B. bei sogenannten Raceway-Ponds (siehe Abb. 10 A) der Fall ist (Chiaramonti et al., 2013). Eine Weiterentwicklung der Open-Ponds stellen die Cascaded-Raceway-Ponds dar (Doucha und Lívanský, 1995). In diesen Systemen fließt die Kultur mit einer geringen Schichtdicke über eine schräge Fläche hinab und wird anschließend durch eine Pumpe wieder aktiv nach oben befördert.

Open Ponds sind wegen der geringen Investitions- und Betriebskosten, bedingt durch ihre einfache Bau- und Betriebsweise, das derzeit am weitesten verbreitete Kultivierungssystem für Mikroalgen. Aufgrund der offenen Bauweise und der damit verbundenen Kontaminationsgefahr eignen sie sich besonders zur Kultivierung extremophiler Mikroalgenpezies wie *Dunaliella salina* (halophil) und *Spirulina* (extremer pH-Wert) (Borowitzka, 1999). Ebenfalls bedingt durch die offene Bauweise verdunstet ein nicht unwesentlicher Teil des eingesetzten Wassers. Die überwiegend laminare Strömung in den großen Becken sorgt zudem für eine meist unzureichende Durchmischung der Kultur und damit einer schlechten Lichtversorgung, was wiederum in einer geringen volumetrischen Biomasseproduktivität resultieren kann.

Wengleich bereits Diatomeen wie *Chaetoceros sp.* erfolgreich in offenen Systemen kultiviert wurden, stellen geschlossene Photobioreaktoren bei der Kultivierung von Diatomeen ein bevorzugtes Kultivierungssystem dar (Wang und Seibert, 2017). Dies ist darin begründet, dass Diatomeen, wie z.B. *P. tricornutum*, häufig sehr temperaturempfindlich sind und in offenen Open-Pond-System oft keine ausreichende Kühlung gewährleistet werden kann (Silva Benavides et al., 2013). Geschlossene PBR gewährleisten zudem eine bessere Prozesskontrolle, wie eine gezielte CO<sub>2</sub>-Versorgung und damit eine Steuerung des pH-Wertes. Bedingt durch die

geschlossene Bauweise minimieren sie zudem das Risiko von Kontaminationen im Vergleich zu offenen Systemen. Dieser Aspekt ist insbesondere dann wichtig, wenn Produkte, wie im Rahmen dieser Arbeit, in Nahrungs- und Futtermitteln sowie in Kosmetikprodukten Verwendung finden sollen und somit strikte gesetzliche Vorgaben erfüllen müssen.

### **3.2.2 Geschlossene Photobioreaktoren**

Die wichtigsten derzeitig genutzten geschlossenen Systeme zur Kultivierung von Mikroalgen sind Rohrreaktoren, Blasensäulen und verschiedenen Varianten von Flachplattenreaktoren (Posten, 2009). Durch verschiedene Geometrien wird dabei ein hohes Verhältnis von Reaktoroberfläche zu Volumen erzeugt, was einen erhöhten Lichteintrag gegenüber offenen Systemen ermöglicht. Geschlossene Systeme weisen zudem ein geringeres Kontaminationsrisiko auf und ermöglichen eine Kontrolle der Temperatur, was die Möglichkeit der Reproduzierbarkeit sowie Flexibilität von Kultivierungsprozessen erhöht (Pulz, 2001).

Rohrreaktoren bestehen aus Glas- oder transparenten Kunststoffrohren mit einem Durchmesser von bis zu 6 cm (Posten, 2009). Die Länge der Röhren kann mehrere hundert Meter betragen. Die Kultur wird meist ausgehend von einem Mischbehälter, der etwa ein Drittel des Reaktorvolumens enthält, durch die transparenten Rohre gepumpt. Bedingt durch die Geometrie kann es in Röhrenreaktoren zu Gradienten von Sauerstoff und CO<sub>2</sub> sowie Stickstoff- und Phosphatkonzentrationen kommen, da der Nährstoffeintrag systembedingt meist nur an einer Stelle des Reaktors erfolgt. Folglich können pH-Gradienten entlang der Rohre entstehen. Innerhalb der Rohre herrscht zudem konstruktionsbedingt eine überwiegend laminare Strömung. Aufgrund der fehlenden Turbulenz kann dies zu einer Lichtlimitierung der Kultur, besonders bei einer hohen Biomassekonzentration, kommen. Im Mischbehälter findet durch Lichtmangel ebenfalls kein oder nur sehr geringes Wachstum statt. Trotz der genannten Nachteile ist die volumetrische Produktivität von Röhrenreaktoren in der Regel deutlich höher als die von offenen Systemen.

Im Gegensatz zu Rohrreaktoren bestehen Flachplattenreaktoren aus zwei lichtdurchlässigen Seitenteilen mit einem definierten Abstand, zwischen denen sich das Flüssigvolumen des Reaktors befindet (siehe hierzu auch Abbildung 11 B). Die Einspeisung des CO<sub>2</sub> erfolgt in den meisten Fällen über eine Begasung im Fußraum des Reaktors als Luft/CO<sub>2</sub>-Gemisch. Die Durchmischung des Systems erfolgt einzig durch die aufsteigenden Gasblasen und kann durch die Begasungsrate sowie einer optimierten Strömungsführung (wie z.B. beim nachfolgend vorgestellten Flachplatten-Airlift-Reaktor) angepasst und optimiert werden. Eine Weiterent-

wicklung des Flachplattenreaktors stellt der Flachplatten-Airlift-Reaktor dar. Dieser wird im nachfolgenden Kapitel detaillierter beschrieben.

### 3.2.3 Der Flach-Platten-Airlift-Photobioreaktor (FPA-PBR)

Der Flachplatten-Airlift-Reaktor (FPA) stellt eine Weiterentwicklung klassischer Flachplattenreaktoren dar (Degen et al., 2001). Er wurde am Fraunhofer IGB, Stuttgart, entwickelt und patentiert (Trösch et al., 2000). Wie bei klassischen Flachplattenreaktoren wird dabei ein Luft-CO<sub>2</sub>-Gemisch durch eine Silikonmembran im Fußraum des Reaktors pneumatisch eingebracht. Die aufsteigenden Gasblasen sorgen in Kombination mit den integrierten „Downcomern“ für eine vertikale Durchmischung der Kultur (Airlift-Prinzip, siehe Abbildung 11). Die als statische Mischer bezeichneten eingebrachten Einstülpungen der Reaktoroberfläche (Kompartimente) erzwingen beim Aufsteigen der Gasblasen eine Walzenströmung und damit eine horizontale Durchmischung der Kultur. Dies sorgt für ein Transport der Mikroalgenzellen von der jeweils lichtabgewandten zur lichtzugewandten Seite des Reaktors mit einer Frequenz von 1-5 Hz, abhängig von der Begasungsrate (Bergmann et al., 2013). Hierdurch wird einer Lichtlimitierung bzw. Lichtinhibierung der Zellen entgegengewirkt.

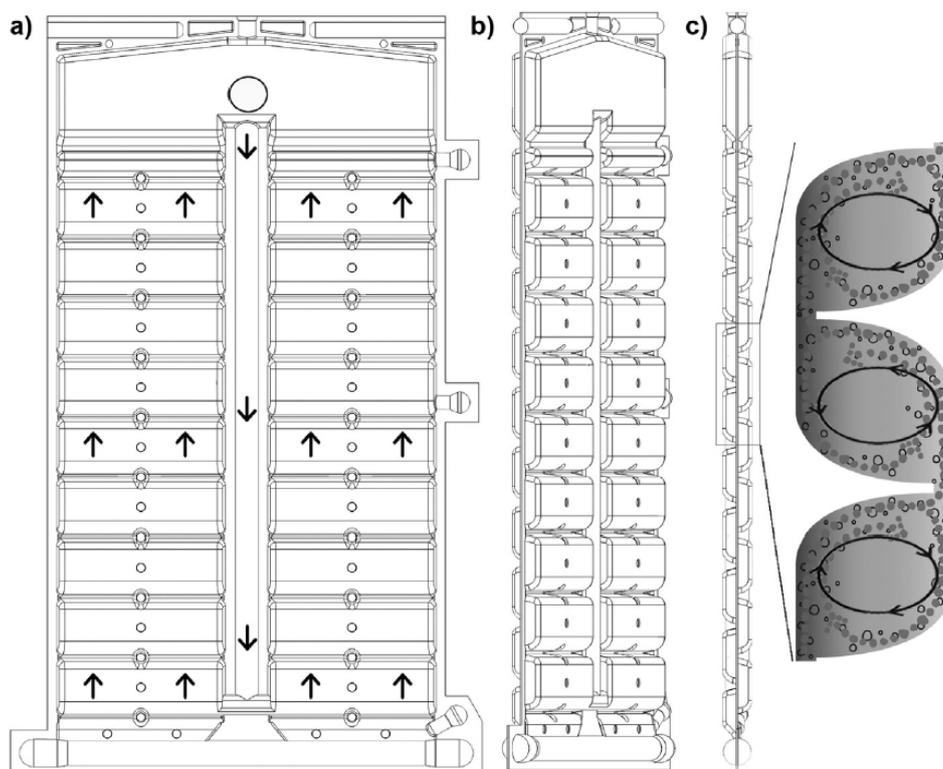


Abbildung 11: Aufbau eines 6-Liter Flachplatten-Airlift-Reaktors. a) Frontansicht und b) Schrägansicht des Reaktors mit statischen Mixern und Strömungsröhr (sog. „Downcomer“, Mitte). c) Seitenansicht durch die statischen Mischer und Illustration der Strömungsrichtung innerhalb der integrierten Kompartimente. Quelle: (Bergmann und Trösch, 2016).

Zusammen mit der vergleichsweise guten Durchmischung im System ermöglicht dies ein Betrieb des Reaktors bei einer relativ hohen Biomassekonzentration von bis zu  $20 \text{ g L}^{-1}$  (eigene Daten, Fraunhofer IGB) und einer hohen Biomasseproduktivität von bis zu  $2,35 \text{ g L}^{-1}$ , abhängig von der eingesetzten Algenspezies und Photonenflussdichte (Meiser et al., 2004). Die erfolgreiche Kultivierung von *P. tricornutum* im FPA-PBR wurde bereits durch Meiser et al. (2004) beschrieben und die dabei generierte Biomasse bezüglich des EPA-Gehaltes analysiert (Meiser et al., 2004). Darüber hinaus untersuchte Seibert (2013) in ihrer Arbeit die Produktion von EPA mit *P. tricornutum* im FPA-Reaktor (Seibert, 2013). Untersuchungen zum Fucoxanthingehalt sowie der volumetrischen Fucoxanthinproduktivität von *P. tricornutum*, sowie anderer Algen wurden erstmals im Rahmen der vorliegenden Arbeit für den FPA-Reaktor untersucht.

Der Reaktor wird von der Subitec GmbH, Stuttgart vermarktet. Er besteht im Wesentlichen aus zwei miteinander verklebten PVC-Halbschalen und ist in Volumina von 6 L, 30 L und 180 L verfügbar. Bei Anlagen im Pilot- und Industriemaßstab werden zur Vergrößerung der Anlagenkapazität meist mehrere 180 L Reaktoren in Reihe geschaltet (siehe Abbildung 12).



Abbildung 12: FPA-Reaktoren (180 L) zur Produktion von *P. tricornutum* Biomasse in der Pilotanlage des Fraunhofer-Zentrums für Chemisch-Biotechnologische Prozesse CBP, Leuna (2015) im Freiland und Gewächshaus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden etwa 30 kg *P. tricornutum*-Biomasse erzeugt um die Aufarbeitung der Biomasse im Hinblick auf die Wertstoffe Fucoxanthin und EPA zu untersuchen.

### 3.3 Aufbereitungsverfahren für eine Mikroalgen-Bioraffinerie

Eine Bioraffinerie bezeichnet ein integriertes, multifunktionelles Gesamtkonzept, das Biomasse als vielfältige Rohstoffquelle für die nachhaltige, simultane Erzeugung eines breiten Spektrums unterschiedlicher Zwischenprodukte und Produkte unter möglichst vollständiger Verwendung aller Rohstoffkomponenten nutzt (BMBF, 2012). Neben der Verwendung von Mikroalgenbiomasse als intakte oder aufgeschlossene Zellen im Nahrungs- und Futtermittelbereich (siehe hierzu Kap. 3.1), kann durch eine gezielte Extraktion bzw. Separation mehrerer Wertstoffe im Sinne einer Bioraffinerie die Wertschöpfung aus der Biomasse wesentlich erhöht werden (siehe Abb. 13). Klassische Vorgehensweisen zur Gewinnung von Öl oder Lipiden aus ölhaltigen terrestrischen Pflanzen, wie z.B. bei Raps oder Soja, eignen sich dabei nur sehr bedingt für Mikroalgen, da diese aus wässrigem Kulturmedium gewonnen werden und äußerst robuste Zellwände besitzen (Cooney et al., 2009). So ist beispielsweise eine Gewinnung der Öl-Fraktion (Lipidfraktion) durch klassische Pressung im Fall der einzelligen Mikroalgen ohne entsprechende Vorbehandlung nur sehr eingeschränkt möglich. Die Aufarbeitung von Mikroalgenbiomasse gestaltet sich dabei aufgrund des großen Produktspektrums und der speziesspezifischen zellulären Beschaffenheit der jeweils eingesetzten Algenspezies sehr unterschiedlich.

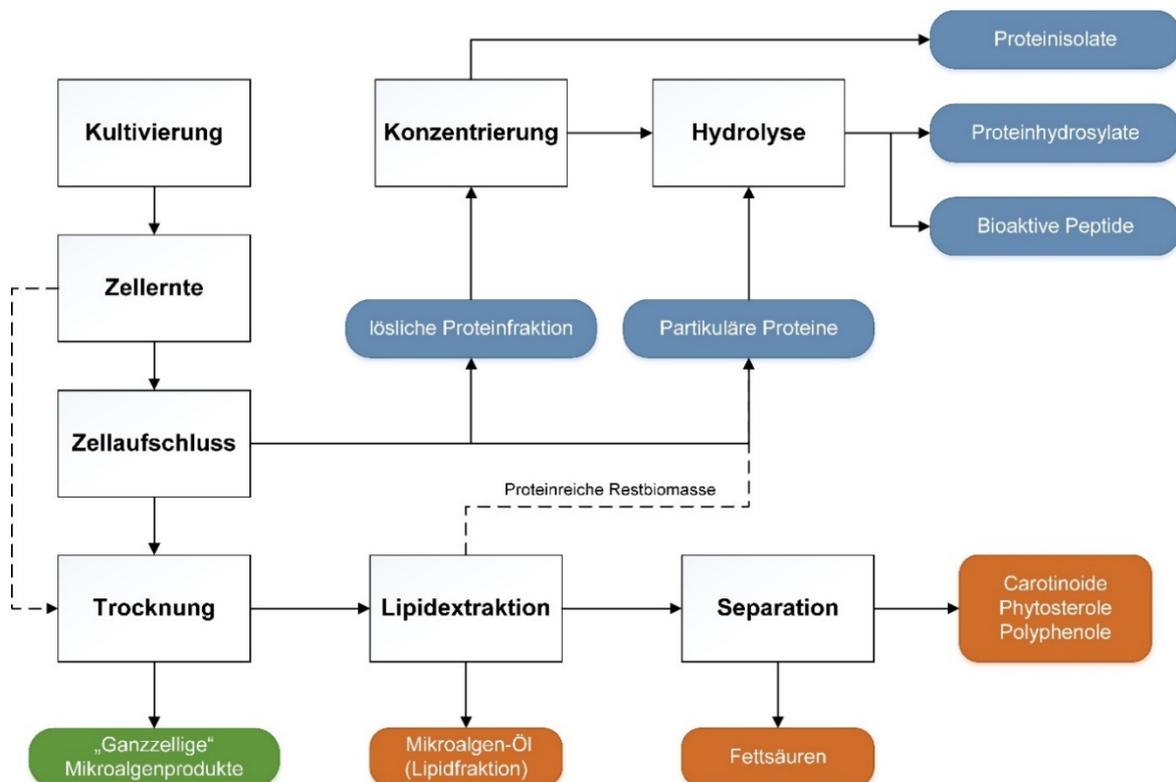


Abbildung 13: Schematische Darstellung möglicher Prozessschritte innerhalb einer Bioraffinerie zur Herstellung verschiedener Mikroalgen-basierter Endprodukte für die Human- und Tierernährung sowie kosmetische Applikationen.

Abbildung 13 gibt einen Überblick über wesentliche Prozessschritte die zur Gewinnung von Produkten für die Anwendung in der Human- und Tierernährung oder im Bereich Kosmetik, führen. Die für diese Arbeit entscheidenden Prozessschritte betreffen insbesondere die Gewinnung einer Lipidfraktion (Mikroalgen-Öl) sowie auch die Fraktionierung der darin enthaltenen Fettsäuren und Carotinoide. Wesentliche Prozessschritte werden im nachfolgenden im Detail diskutiert.

### **3.3.1 Ernte und Entwässerung der Biomasse**

Im Anschluss an die Kultivierung der Mikroalgen erfolgt die Zellernte aus dem wässrigen Medium. Der Anteil des zu entfernenden Wassers ist dabei vergleichsweise hoch, da die Zellkonzentration in photoautotrophen Prozessen verglichen mit heterotrophen Fermentationsprozessen – wie der klassischen Kultivierung von Bakterien, Hefen oder Zellkulturen – meist gering ist (Posten und Feng Chen, 2016). Die Biomassekonzentration liegt je nach Photobioreaktorsystem lediglich bei 1 bis 20 g L<sup>-1</sup>. Es ist daher notwendig die Biomasse zunächst aufzukonzentrieren, wobei die Wahl der Erntemethode vom jeweiligen Zelltyp, der Zelldichte, den Prozessanforderungen nachfolgender Aufarbeitungsverfahren und dem Wert der Endprodukte bestimmt wird (Brennan und Owende, 2010). Es werden Fest-Flüssig-Trennverfahren wie die Flotation, Filtration, Ausflockung sowie Sedimentation und Zentrifugation verwendet, um einen pumpfähigen Slurry für nachfolgende Aufarbeitungsschritte zu erzeugen (Gerardo et al., 2015). Durch Ausflockung, Flotation oder Sedimentation kann dabei in einem ersten Schritt ein Feststoffgehalt von zwei bis sieben Prozent erreicht werden, welcher durch eine nachfolgende Zentrifugation oder Filtration auf 15 bis 25 % erhöht werden kann (Uduman et al., 2010).

### **3.3.2 Zellaufschluss**

Im Anschluss an die Entwässerung folgt der Zellaufschluss zur Freisetzung intrazellulär vorliegender Zielprodukte. Der Zellaufschluss der Biomasse ist insbesondere für nachfolgende Extraktionsverfahren, wie z.B. Fest-Flüssig-Extraktionen, entscheidend. Neben der Anforderung eines möglichst niedrigen Energie- und Zeitbedarfs, eines hohen Zellaufschlussgrades sowie der Vermeidung der Degeneration des Zielproduktes hängt die Wahl des Zellaufschlussverfahrens wesentlich von der morphologischen Beschaffenheit der Zellen und der Struktur der Zellwand ab. Mikroalgenzellen besitzen meist sehr komplexe und stabile Zellwände, deren Zusammensetzung je nach Algenspezies und Kultivierungsbedingung sehr stark variieren kann (Domozych et al., 2012). Der Zellaufschluss von Mikroalgenbiomasse ist daher in vielen Fällen obligatorisch, um intrazelluläre Zielkomponenten nachfolgend effizient extrahieren zu können

und eine hohe Produktausbeute zu erzielen. Dies gilt insbesondere bei der Gewinnung von Zielkomponenten, welche innerhalb der Thylakoidmembran vorliegen, also von einer zweiten Membranschicht eingeschlossen sind. Dies betrifft in dieser Arbeit beide Zielprodukte, sowohl das Fucoxanthin als auch EPA aus Diatomeen (siehe Kap. 2.4.2 und 2.5.2).

Zum Aufschluss von Mikroalgen ist eine Vielzahl physikalischer, chemischer und enzymatischer Verfahren beschrieben (Safi et al., 2014b; Sierra et al., 2017). Für die Gewinnung von Carotinoiden und ungesättigten Fettsäuren werden wegen der besseren Skalierbarkeit trotz der höheren thermischen Belastung und des erhöhten Energieeintrags, meist mechanische Aufschlussverfahren wie (Rührwerks)-Kugelmöhlen (RWKM) oder Hochdruckhomogenisatoren (HDH) eingesetzt (Gong und Bassi, 2016; Taucher und Baer, 2016). Seibert (2013) zeigte bereits, dass sowohl ein HDH als auch eine RWKM zum Zellaufschluss von Diatomeen wie *P. tricornutum* verwendet werden können (Seibert, 2013). Dabei zeigte der Aufschluss feuchter Biomasse mittels RWKM in Bezug auf den maximalen Aufschlussgrad der Zellen und der Extraktion von EPA mittels Mazeration das beste Ergebnis. Auch die Arbeit von Hausmann (2018) zeigt am Beispiel von *P. tricornutum*, dass mit beiden Verfahren prinzipiell ein hoher Aufschlussgrad der Zellen erreicht werden kann (Hausmann, 2018). Wie in Abbildung 13 (Kap. 3.3) illustriert, kann der Zellaufschluss im Kontext eines Bioraffinerieansatzes zur Gewinnung einer ersten Fraktion aus wasserlöslichen Proteinen und anderer Komponenten genutzt werden, welche mittels Filtration oder Zentrifugation der wässrigen Phase von der partikulären Biomasse abgetrennt werden können (Safi et al., 2013, 2014a, 2014b). Safi et al. (2014) zeigten beispielsweise, dass je nach Algenspezies und Aufschlussmethode der Anteil wasserlöslicher Proteine zwischen 27,4 % und 76,1 % des Gesamtproteingehaltes der Algen liegen kann. Schwenzfeier et al. (2011) berichten für *Tetraselmis sp.* von 21 % löslichem Proteinanteil, so dass in dieser Spezies ein Großteil der Proteine nach dem Zellaufschluss partikulär gebunden vorliegen (Schwenzfeier et al., 2011). Vom löslichen Proteinanteil konnten 63 % im Rahmen der Arbeit von Schwenzfeier et al. (2011) mittels Diafiltration gewonnen werden. Ähnliche Untersuchungen zur Gewinnung von sowohl wasserlöslichen als auch partikulär gebundenen Proteinen aus *P. tricornutum*-Biomasse wurden von Hausmann (2018) durchgeführt.

### **3.3.3 Fest-Flüssig-Extraktion von Lipiden**

Eine Vielzahl von Fest-Flüssig-Extraktionsmethoden sind für die Gewinnung einer lipophilen Fraktion (Mikroalgenöl) mit Inhaltsstoffen wie einfach- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren sowie Carotinoiden aus Mikroalgenbiomasse beschrieben (Cooney et al., 2009; Saini und

Keum, 2018). Aufgrund der immensen Diversität der biochemischen Zusammensetzung von Mikroalgen und der Vielzahl von Lipidklassen und Zielprodukten sind die beschriebenen Extraktionsverfahren jedoch nicht ohne weitere Anpassung von Spezies zu Spezies übertragbar (Cooney et al., 2009). Die dabei gewonnenen Lipidfraktionen stellen meist eine Mischung mehrerer Komponenten dar, so dass zur weiteren Aufreinigung zusätzliche Trennschritte erforderlich sind. Als Lösungsmittel für die Fest-Flüssig-Extraktion können dabei verdichtete Gase, organische Lösungsmittel oder „subkritisches“ Wasser verwendet werden.

Für die Extraktion von Carotinoiden und Omega-3-Fettsäuren mit organischen Lösungsmitteln sind die Mazeration und Soxhlet-Extraktion gängige Verfahren. Ein Anwendungsbeispiel dieser beiden Verfahren ist die Extraktion von Lutein aus *Chlorella sorokiniana* (Chen et al., 2016) oder EPA aus *P. tricornutum* (Seibert, 2013). Neben den klassischen Extraktionsmethoden sind für die Extraktion von Lipiden aus Mikroalgen auch Verfahren beschrieben, die durch einen unterstützenden Energieeintrag, z.B. in Form von Mikrowellen (engl. „Microwave-Assited Extraction“, MAE) oder Ultraschall (engl. „Ultrasound-Assisted Extraction“, UAE), die Effizienz der Extraktion von intrazellulären Metaboliten steigern. Die Arbeitsgruppe um Pasquet et al. (2011) extrahierte beispielweise durch Verwendung von MAE und UAE Carotinoide aus den Mikroalgen *C. closterium* und *D. teriolectra*.

Eine weitere Extraktionsmethode stellt der Einsatz von überkritischem Fluiden (engl. „Supercritical Fluid Extraction“, SFE) dar. Hierbei werden meistens Kohlenstoffdioxid oder Propan als Lösungsmittel eingesetzt. Die SFE ist für die selektive Extraktion von neutralen Lipiden, wie Triacylglyceriden (intrazelluläre Speicherlipide) aus Mikroalgen sowie auch die Extraktion von Astaxanthin beschrieben (Reyes et al., 2014; Yen et al., 2015). Für die Extraktion von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren, welche in Diatomeen als polare Glyco- und Phospholipide vorliegen (siehe Kap. 2.5.2), oder die Extraktion von sehr polaren Carotinoiden wie Fucoxanthins (siehe Kap. 2.4.2) eignete sich die Extraktion mit reinem CO<sub>2</sub> jedoch nicht.

Wie durch Seibert (2013) für die Extraktion von EPA aus *P. tricornutum* beschrieben, zeigt hier der Zusatz von polaren Co-Solventen wie Ethanol einen positiven Effekt (Seibert, 2013). Eine vielversprechende Alternative zur SFE für die Extraktion polarer lipophiler Stoffe, zu denen auch Fucoxanthin und EPA gehören, stellt hingegen die druckbasierte subkritische Hochdruckflüssigextraktion auf Basis organischer Lösungsmittel dar (Pieber et al., 2012; Goto et al., 2015).

### 3.3.4 Subkritische Hochdruckflüssigextraktion (PLE)

Die subkritische Hochdruckflüssigextraktion (engl. „Pressurized Liquid Extraction“, PLE) ist eine druckbasierte Fest-Flüssig-Extraktionsmethode mit meist organischen Lösungsmitteln, welche erstmals durch Richter et al. (1996) als „beschleunigte Lösungsmittelextraktion“ beschrieben wurde (Richter et al., 1996). Der wesentlichste Unterschied zu klassischen Fest-Flüssig-Extraktionen unter Atmosphärendruck, wie der Mazeration oder dem Soxhlet-Prinzip, ist die Möglichkeit bei Temperaturen zu extrahieren, die oberhalb des Siedepunktes aber unterhalb des kritischen Punktes des jeweils verwendeten Lösungsmittels liegen (Mustafa und Turner, 2011). Der anliegende Druck hält das organische Lösungsmittel bei Extraktionstemperaturen oberhalb des Siedepunktes im sogenannten subkritischen, flüssigen Aggregatzustand. Gegenüber der Extraktion nahe der Raumtemperatur und bei atmosphärischem Druck ergeben sich dabei nach Richter et al. (1996) verschiedene Vorteile welche die Löslichkeit von Zielkomponenten, den Massentransfer, sowie die Aufhebung von Oberflächengleichgewichten betreffen (Richter et al., 1996).

Eine Temperaturerhöhung in einer Flüssigkeit führt nach Stokes-Einstein zu einer erhöhten Diffusionsrate innerhalb des flüssigen Mediums (Einstein, 1905). Sie kann zudem die Aufnahmekapazität des organischen Lösungsmittels für die zu extrahierenden Substanzen steigern (Richter et al., 1996; Denery et al., 2004). Ebenso verbessert sich die Mischbarkeit von Wasser mit den meisten Lösungsmitteln mit steigender Temperatur. Dies kann vorteilhaft sein, wenn Biomasse mit Restfeuchte extrahiert werden soll oder Poren in der zu extrahierenden Matrix durch Wassereinlagerungen verschlossen und für das Lösungsmittel nur schwer zugänglich sind. Die zugeführte thermische Energie kann zudem zum Aufbrechen von van-der-Waals- oder Wasserstoffbrücken und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Analyt und Matrix führen (Cooney et al., 2009). Die Viskosität und Oberflächenspannung von Flüssigkeiten nimmt bei erhöhter Temperatur ab und kann dazu führen, dass das Lösungsmittel effektiver in die zu extrahierenden Feststoffpartikel eindringen kann (Richter et al., 1996). Der angelegte Druck bei der PLE kann zudem den Transport vom Lösungsmittel zum Analyt in den Poren der Feststoffmatrix gegenüber normalen atmosphärischen Druckverhältnissen verbessern.

Die beschriebenen Aspekte können es ermöglichen, die notwendige Lösungsmittelmenge sowie die notwendige Verweilzeit zwischen Probe und Lösungsmittel gegenüber klassischen Extraktionsverfahren zu reduzieren (Cooney et al., 2009; Saini und Keum, 2018). Aufgrund der Möglichkeit der Reduktion des Extraktionsmittels adressiert die PLE den Nachhaltigkeitsgedanken der „Green Chemistry“ (Chemat et al., 2012) und steht aktuell als alternative, nach-

Tabelle 4: Ausgewählte Anwendungsbeispiele zur Hochdruckflüssigextraktion von Carotinoiden, Antioxidantien und ungesättigten Fettsäuren aus Mikro- und Makroalgen. Eine umfassendere Zusammenstellung weiterer Anwendungsbeispiele finden sich u.a. in Gil-Chávez et al. (2012) und Carabias-Martinez et al. (2005).

Algenspezies	Zielprodukt	Lösungsmittel	Temperatur [°C]	Extraktionszeit [min]	Druck [bar]	Quelle
<i>H. pluvialis</i> <sup>(m)</sup>	Astaxanthin	Aceton, Ethanol, Methanol, Methylenchlorid,	20 – 100	3 x 5	100	[1,2]
<i>C. sorokiniana</i> <sup>(m)</sup>	Carotinoide	Aceton, Ethanol, Ethylacetat, Hexan	20 – 120	5 - 30	100	[3]
<i>S. platensis</i> <sup>(m)</sup>	Antioxidantien	Hexan, Petrolether, Ethanol, Wasser	60 – 170	3 - 15	100	[4]
<i>D. salina</i> <sup>(m)</sup>	Antioxidantien, beta-Carotin	Hexan, Petrol-ether, Ethanol, Wasser	40 – 160	5 - 30	100	[4]
<i>N. oculata</i> <sup>(m)</sup>	Ungesättigte Fettsäuren	Hexan, Propanol, Ethanol	60	10	100 -120	[5]
<i>P. tricornutum</i> <sup>(m)</sup>	Fucoxanthin	Aceton, Ethanol, Wasser, Hexan, Ethylacetat	100	30	100	[6]
<i>Eisenia bicyclis</i> <sup>(M)</sup>	Fucoxanthin	Ethanol (50-100 %)	40 – 100 °C	5 - 15	69, 172	[7]
<i>Himantalia elongata</i> <sup>(M)</sup>	Fucoxanthin	Ethanol, Hexan, Wasser	50 -200 °C	20	100	[8]

[1] Denery et al. 2004; [2] Jaime et al. 2010; [3] Taucher et al. 2016; [4] Herrero et al. 2010; [5] Pieber et al. 2012; [6] Kim et al. 2012; [7] Shang et al. 2011; [8] Plaza et al. 2010;

<sup>(m)</sup> = Mikroalge; <sup>(M)</sup> = Makroalge

haltige Extraktionsmethode im Fokus aktueller Forschungsarbeiten (siehe Tab. 4). Anwendung findet sie bei der Extraktion von bioaktiven, funktionalen Inhaltsstoffen aus Zellmaterial für Lebens- und Futtermittelapplikationen (Castro-Puyana et al., 2013; Herrero et al., 2006, 2015). Bei der Aufarbeitung von Pflanzenmaterial sowie Mikroalgen findet die PLE, wegen der Möglichkeit unter Sauerstoffausschluss zu extrahieren sowie der reduzierten Kontaktzeit zwischen Analyt und Lösungsmittel und der dadurch reduzierten thermischen Belastung des verwendeten Zellmaterials insbesondere bei der Extraktion von temperatur-, sauerstoff- und lichtempfindlichen Substanzen Verwendung. Beispiele sind die Extraktion von Carotinoiden (Cha et al., 2010; Kim et al., 2012a; Taucher und Baer, 2016), Polyphenolen (Carabias-Martínez et al., 2005), Terpenen (Oliveira et al., 2018) und Fettsäuren (Pieber et al., 2012).

Bei der Extraktion von Carotinoiden aus Mikroalgen ist der Einsatz der PLE jedoch bisher relativ wenig erforscht (Poojary et al., 2016). Wesentliche Verfahrensparameter für die Methodenentwicklung sind bei der PLE die Wahl des Lösungsmittels, die Extraktionstemperatur, die Extraktionszeit, die Anzahl der Extraktionszyklen sowie das Verhältnis von Lösungsmittel zu Extraktionsgut. Bei der Auswahl und Charakterisierung des Lösungsmittels wird häufig die Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon$ ) als Maß für die Polarität des Lösungsmittels herangezogen. Die Wahl des Lösungsmittels ist einer der kritischsten Faktoren bei der Extraktion von Carotinoid-haltigen Lipidfraktionen aus Mikroalgenbiomasse (Saini und Keum, 2018) und sehr komplex, da sich die funktionalen Gruppen, Kettenlänge sowie die Probenmatrix für einzelne Spezies stark unterscheiden. Aufgrund der Komplexität und der schlechten Datenlage ist es häufig notwendig, empirische Daten für einzelne Mikroalgenspezies zu ermitteln.

Die PLE wird zurzeit für präparative und analytische Zwecke ausschließlich im Labormaßstab angewandt. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Scale-Up des beschriebenen Hochdruckflüssigextraktionsverfahrens durchgeführt (siehe hierzu Kap. 5.5.5). In diesem Zusammenhang wurde auch die Möglichkeit einer synergetischen Nutzung der hohen Extraktionstemperatur und des angelegten Druckes innerhalb nachfolgender Separationsverfahren untersucht (siehe Kap. 5.5).

### **3.3.5 Separation von Fettsäuren und Fucoxanthin**

Abhängig vom späteren Applikationsbereich der lipophilen Fraktion und im Hinblick auf eine erhöhte Wertschöpfung kann es sinnvoll sein, diese aufzureinigen und z.B. die Fettsäuren von den Carotinoiden zu trennen. Im Fall der Mikroalgen werden hierfür meist mehrstufige Prozessschritte verwendet. In einem ersten Prozessschritt wird häufig eine Verseifung mit KOH

oder NaOH durchgeführt (Gong und Bassi, 2016), da einige Xanthophylle wie z.B. Astaxanthin und Lutein, in Mikroalgen primär in veresterter Form vorliegen (Saini und Keum, 2018). Dies ist bei Fucoxanthin nicht der Fall. Ebenfalls können durch diesen Schritt die Fettsäuren vom nicht-verseifbaren Teilen der Fraktion, wie z.B. Phytosterolen, getrennt werden.

Eine Methode zur Abtrennung von Fettsäuren einer aus *P. tricornutum* mittels Ethanol extrahierten Lipidfraktion wurde von Fajardo et al. (2007) beschrieben (Fajardo et al., 2007). Das beschriebene Verfahren basiert auf der Erzeugung eines flüssigen Zweiphasensystems bestehend aus wässrigem Ethanol und Hexan. Infolge der Erhöhung der Polarität der Ethanolphase durch Wasserzugabe wird die Mischbarkeit mit Hexan reduziert, und es kommt zu einer Verschiebung des Verteilungsgleichgewichtes der Fettsäuren zwischen beiden Phasen. Der Fokus der Untersuchung von Fajardo et al. (2007) lag hierbei auf der Aufreinigung von ungesättigten Fettsäuren, welche sich auf diese Art überwiegend in die Hexanphase transferieren ließen. Kim et al. (2012) wendeten die beschriebene Methode in leicht abgewandelter Form erstmals zur Aufreinigung von Fucoxanthin in ethanolischen Extrakten von *P. tricornutum* an (Kim et al., 2012b).

Eine weitere Möglichkeit zur Abtrennung von Fucoxanthin aus Ethanolextrakten von *I. galbana* und *P. tricornutum* durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde von Gómez-Loredo et al. (2014 und 2015) beschrieben (Gómez-Loredo et al., 2015, 2014). Anders als in der Methode von Fajardo et al. (2007), wird dabei die fucoxanthinhaltige Ethanolphase mit einer definierten wässrigen Kaliumhydrogenphosphatlösung gemischt. Im entstandenen wässrigen Zweiphasensystem (engl. „Aqueous Two-Phase System“, ATPS) konnte das Fucoxanthin in der oberen Phase aggregiert werden. Das Fucoxanthin wurde anschließend mittels Ultrafiltration bei einer Fucoxanthinausbeute von 63 % auf eine Reinheit von 59 % aufgereinigt (Gómez-Loredo et al., 2015).

Eine weitere aufwendige Möglichkeit zur Gewinnung von hochreinem Fucoxanthin stellt die präparative, chromatographische Aufreinigung, z.B. durch Einsatz von Silicagelen oder Festphasenextraktion in Kombination mit Dünnschichtchromatographie, dar (Kim et al., 2012a; Xia et al., 2013; Chen et al., 2017; P. Sun et al., 2019). Xia et al. (2013) erreichten beispielweise mit einer Silicagel-Säule durch mehrere Chromatographieschritte eine Reinheit von über 97 %. Kawee-ai et al. (2013) beschreiben zudem eine Methode zur Aufreinigung von Fucoxanthin auf Basis von mehrstufigen Flüssig-Flüssig-Extraktionen in Kombination mit einer mehrfachen Verdampfung der Lösungsmittel, gefolgt von einer chromatographischen Aufreinigung mit einer Silicagel-Säule bis zu einer Reinheit von 99 % (Kawee-ai et al., 2013). Des Weiteren sind

in der Literatur entsprechende Kombinationen der genannten Methoden beschrieben. So erreichte Zhang et al (2018) beispielweise durch mehrfache Flüssig-Flüssig-Extraktion eines Ethanolextraktes mit n-Hexan und anschließender Silicagel Chromatographie eine Reinheit von 78 % (HPLC) (Zhang et al., 2018). Mittels anschließender präparativer HPLC-Aufreinigung konnte die Reinheit auf 98 % (HPLC) gesteigert werden.

## 4 Materialien und Methoden

Nachfolgend werden alle in dieser Arbeit verwendeten Methoden und Verfahrensschritte beschrieben. Eine ausführliche Liste der verwendeten Materialien, Chemikalien und Geräte befinden sich, genau wie einige Tabellen zur Herstellung von Nährmedien sowie Reagenzien für Assays zur Analyse funktioneller Eigenschaften von Produkten, im Anhang dieser Arbeit (Kap. A1).

### 4.1 Stammhaltung und Vorkulturen

In dieser Arbeit wurden Diatomeen (Bacillariophyceae) sowie der zu den Haptophyta zählende Stamm *Isochrysis sp.* (Prymnesiophyceae) verwendet (siehe Tab. 5). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird in dieser Arbeit für die einzelnen *P. tricornutum*-Stämme nachfolgend die Bezeichnung UTEX 640, UTEX 642 und UTEX 646, analog der Nomenklatur der Stammsammlung für Algen der University of Texas (UTEX), verwendet.

Tabelle 5: Untersuchte Mikroalgenstämme mit Herkunft (Habitat) und der Bezugsquelle.

Mikroalge	Bezeichnung	Herkunft / Habitat	Quelle
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	UTEX 640 / SAG 1090-1b	Großbritannien (Brackwasser)	[1]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	UTEX 642 / SAG 1090-1a	Großbritannien (Brackwasser)	[2]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	UTEX 646 / SAG 1090-6	Finnland (Brackwasser)	[2]
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	CS-13	Australien (Meerwasser)	[3]
<i>Isochrysis species</i>	SAG 927-2	Großbritannien (Meerwasser)	[2]

Legende: [1] = UK National Culture Collection (UKNCC); [2] = Stammsammlung für Algen (SAG) in Göttingen; [3] = Australian National Algae Culture Collection (CSIRO)

Die Stammhaltung erfolgte sowohl auf Agarplatten als auch in 50 ml-Erlenmeyerkolben in VM-Medium (siehe Anhang, Kap. A1.4). Die Lagerung der Kulturen erfolgte bei 4 °C. Ausgehend von 50 ml Flüssigkulturen aus der Stammhaltung wurden für die Versuche im Schüttelkolben und zur Inokulation der Cell-DEG-Membranbioreaktoren 250 ml-Schüttelkolben mit dem entsprechenden Kulturmedium für die jeweiligen Algenspezies angelegt. Um genug Vorkultur für die Inokulation der FPA-Reaktoren (Kap. 4.4) zu erzeugen, wurden Kulturen aus 250 ml-Schüttelkolben bei einer optischen Dichte ( $OD_{750nm}$ )  $\geq 4$  in sterile 5 L-Vorkulturflaschen überführt und in 1 L-Schritten mit frischem Kulturmedium bis auf 5 L aufgefüllt. Die Vorkulturflaschen verfügten über einen Magnetrührer und eine sterile CO<sub>2</sub>-Zufuhr. Zur Inokulation der FPA-Reaktoren erfolgte der Transfer von vier Liter der Vorkultur aus der 5 L-Vorkulturflasche bei einer  $OD_{750nm} \geq 4$  in den jeweiligen FPA-Reaktor.

## 4.2 Nährmedien und Substratlösungen

Die Kultivierung von *P. tricornutum* UTEX 640, UTEX 642 und UTEX 646 erfolgte mit modifiziertem Mann und Myers Kulturmedium (Mann und Myers, 1968). Die Mikroalgen *C. fusiformis* und *Isochrysis sp.* wurden in modifiziertem f/2-Medium kultiviert (Guillard und Ryther, 1962). Die Zusammensetzung beider Kulturmedien ist im Anhang der Arbeit tabellarisch dargestellt (Kap. A1.4). Der wesentliche Unterschied beider Medien liegt im Salzgehalt von 10 g L<sup>-1</sup> (Mann und Myers-Medium, Brackwasser) bzw. 16 g L<sup>-1</sup> (f/2-Medium, etwa halbe Meerwasserkonzentration). Für die Versuche im Schüttelkolbenmaßstab und im Cell-DEG-Membranbioreaktor (siehe Kap. 4.3.1 und 4.3.2) wurden die Substrate (Stickstoff, Phosphat und Eisen) vor Versuchsbeginn im Nährmedium vorgelegt. Bei der Kultivierung im FPA-PBR (siehe Kap. 4.4) erfolgte die Zugabe der Substrate ins Nährmedium hingegen erst während der Versuche. Diese wurden aus konzentrierten Stammlösungen (Zusammensetzung in Kap. A1.4) über Schlauchpumpen gekoppelt mit einer speicherprogrammierbaren Steuerungseinheit (SPS) zudosiert. Die Kulturmedien und Nährlösungen, mit Ausnahme der Ammonium-, Eisen(II)-Citrat- und Spurenelemente-Lösungen, wurden vor der Verwendung bei 121 °C und 1,2 bar für 20 min sterilisiert. Alle weiteren Nährlösungen wurden vor der Verwendung steril filtriert (Porengröße = 0,25 µm).

## 4.3 Kultivierungsmethoden im kleinen Maßstab

Zur Auswahl eines potentiellen Produktionsstammes und zur Untersuchung des Einflusses der Lichtverfügbarkeit sowie der Nährstoffkonzentration im Kulturmedium auf den Fucoxanthin- und EPA-Gehalt der Mikroalgen wurden Versuche in einem Screening-Membranreaktorsystem (HDC 33.10, Firma Cell-DEG) und in Schüttelkolben durchgeführt. Beide Methoden werden nachfolgend beschrieben.

### 4.3.1 Kultivierung im Cell-DEG HDC-Membranbioreaktor

Zum Vergleich der spezifischen Wachstumsraten der verwendeten Stämme wurden diese in einer Screening-Plattform (HDC 33.10) der Firma Cell-DEG auf einem Orbitalschüttler (DOS-10L, Neonlab) bei 250 rpm und 20 °C kultiviert. Als Lichtquelle diente ein Panel mit LEDs (Nichia, NSSL157AT-H3, Farbtemperatur 4000 K) bei einer konstanten Photonenflussdichte von 10 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> auf der Bioreaktoroberseite. Die verwendeten Bioreaktoren (V = 10 ml) wurden für den Vergleich der potentiellen Produktionsstämme mit einer OD<sub>750nm</sub> = 1 inokuliert und basieren, wie im Detail durch Bähr et al. (2016) beschrieben, auf einer porösen hydrophoben, CO<sub>2</sub>-durchlässigen Membran, oberhalb derer sich die flüssige Mikroalgenkultur

befindet (Bähr et al., 2016). Unterhalb der Membran wird eine Atmosphäre aus mit CO<sub>2</sub> angereicherter Luft (7,5 %<sub>v/v</sub> CO<sub>2</sub>) angelegt. Das CO<sub>2</sub> kann folglich blasenfrei durch die Membran in die Mikroalgenkultur diffundieren. Um eine Akkumulation des während der Kultivierung gebildeten Sauerstoffs im Bioreaktor zu vermeiden, kann dieser durch eine Membran oberhalb der Kultur entweichen. Die Aufnahme von Wachstumskurven für die Membranbioreaktoren erfolgte nichtinvasiv mittels zugehörigem High-Range-Transmission-Turbidity-Sensor (HRTTS, Cell-DEG), dessen Signal mit der optischen Dichte (OD<sub>750nm</sub>) der Kultur korreliert wurde. Die klassische invasive photometrische Bestimmung der OD<sub>750nm</sub> erfolgte gemäß Kap. 4.6.1.

### **4.3.2 Kultivierung im Schüttelkolben**

Zur Ermittlung von geeigneten Kultivierungsparametern für die angestrebte Kultivierung von *P. tricornutum* UTEX 640 im Reaktormaßstab wurden Versuche im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt. Hierbei sollte der Einfluss der Lichtintensität sowie der NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>- und Fe<sup>2+</sup>-Konzentration im Kulturmedium auf den biomassespezifischen Wertstoffgehalt und die spezifische Wachstumsrate des Stammes *P. tricornutum* UTEX 640 evaluiert werden. Die Kultivierung in den Schüttelkolben mit einem Volumen von 250 ml erfolgte bei 20 °C in 100 ml M&M-Medium auf einem Orbitalschüttler (HT, Infors) bei 130 rpm. Die Schüttelkolben wurden über Edelstahlröhrchen mit einem sterilen CO<sub>2</sub>/Luft-Gemisch (3 %<sub>v/v</sub> CO<sub>2</sub>) begast. Zur Untersuchung des Einflusses der Photonenflussdichte wurden die Schüttelkolben mit unterschiedlichem horizontalen Abstand zum vertikalen LED-Panel (Nichia, NSSL157AT-H3, Farbtemperatur 4000 K) platziert, die jeweilige Photonenflussdichte mittels SPS eingestellt und diese durch einen PAR-Lichtsensor (Meteon, Kipp und Zonen) überprüft. Für die Versuche mit unterschiedlichen Nährstoffkomponenten wurde zuvor unter gleichen Bedingungen erzeugte Vorkultur (Wachstumsphase) abzentrifugiert, um das alte Kulturmedium zu entfernen. Die Biomasse wurde anschließend in das frische Medium mit den entsprechenden Nährstoffkomponenten transferiert. Nach einer Adaptionszeit von 24 h an das neue Medium wurden die Versuche über einen Zeitraum von 96 h durchgeführt. Die Kolben wurden im Anschluss vollständig geerntet und die Biomasse wie in Kap. 4.6.4 und Kap. 4.6.5 beschrieben, analysiert. Die Berechnung der spezifischen Wachstumsraten erfolgte gemäß Gleichung 3 (Kap. 4.8.1).

## **4.4 Kultivierung im Flachplatten-Airlift-Photobioreaktor**

Für die Experimente in dieser Arbeit wurden Flachplatten-Airlift-Photobioreaktoren (FPA-PBR) der Firma Subitec mit einem Volumen von 6 und 30 Liter mit einer Schichtdicke von

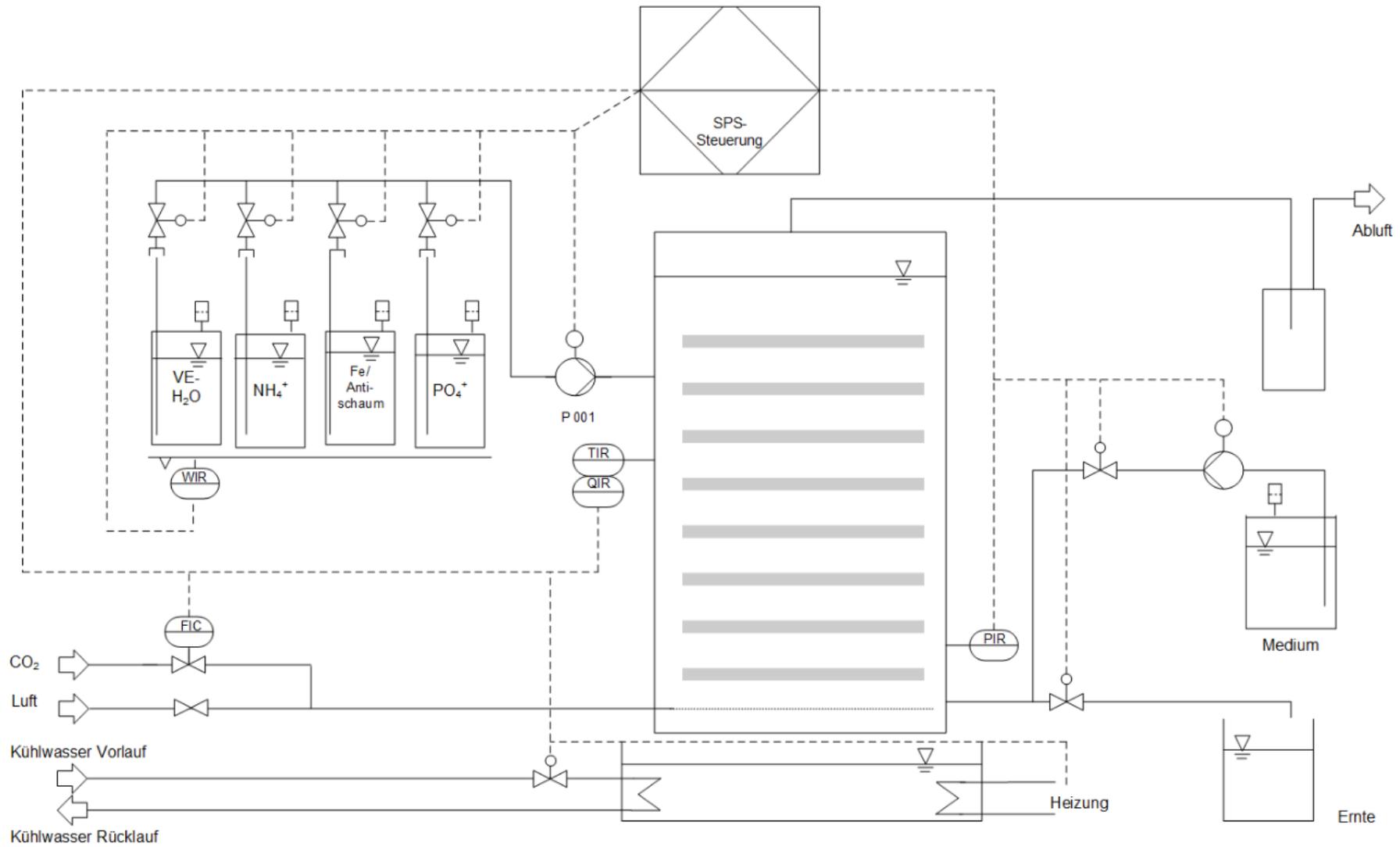


Abbildung 14: RI-Fließschema eines FPA-Photobioreaktors mit Steuerungseinheit (SPS) und angeschlossener Peripherie. In dieser Arbeit wurden jeweils zwei FPA-Reaktoren über eine SPS gesteuert.

jeweils 3 cm verwendet (siehe Abb. 14). Sie waren jeweils als Doppelstand mit einer speicherprogrammierbaren Steuerungseinheit (SPS, Siemens) mit Bedienpanel versehen. Zur Kühlung der FPA-PBR diente jeweils ein getrenntes Wasserbad mit Kühlschlange sowie einem Heizstab, in welches der untere Teil der Reaktoren eingetaucht wurde. Über eine an die SPS angeschlossene Temperatursonde konnte hierdurch eine konstante Temperatur im FPA-PBR gewährleistet werden. Als Lichtquelle kamen warmweiße LEDs (Nichia, NSSL157AT-H3) mit einer Farbtemperatur von 4000 K zum Einsatz, deren Photonenflussdichte ebenfalls über die SPS angepasst werden konnte. Die Photonenflussdichte wurde zudem über einen PAR-Lichtsensoren (Meteon, Kipp und Zonen) auf Höhe der Außenfläche der lichtzugewandten Seite des FPA-PBR überprüft. Über einen Drucksensor (BD-Sensors, OMK331) im unteren Teil des Reaktors erfolgte die Füllstandsregelung, so dass bei Bedarf steriles Kulturmedium über eine Pumpe (530U, Watson-Marlow) bis zum Sollwert nachgepumpt werden konnte.

Um einen konstanten pH-Wert im Reaktor zu ermöglichen, wurde eine pH-Sonde (Endress-Hauser, CPS71) an die SPS angeschlossen und der CO<sub>2</sub>-Anteil über einen Massendurchflussregler (MFC) in der Zuluft reguliert. Über den CO<sub>2</sub>-Anteil in der Zuluft wurde der pH-Wert im FPA-PBR geregelt. Zur Begasung diente ein CO<sub>2</sub>/Luft-Gemisch, welches durch Sterilfilter über eine im Boden des Reaktors befindliche Silikonmembran eingebracht wurde. Die sterilen Nährlösungen wurden auf einer an die SPS angeschlossene Waage (Kern, KFS-T) in unmittelbarer Nähe der FPA-PBR platziert. Über eine Pumpe (Watson-Marlow, 101U) und ein mit dem Reaktor verbundenes Schlauchsystem konnten somit definierte Mengen der jeweiligen Nährlösung (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-</sup> und Fe(II)) bei Bedarf zugeführt werden.

### **4.4.1 Vorbereitung und Innokulation der Reaktoren**

Vor der Inokulation mit den Vorkulturen wurde der FPA-PBR mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %) über Nacht gereinigt, das sterile autoklavierte Schlauchsystem mit Sterilkupplungen angeschlossen und der Reaktor anschließend dreimal mit sterilem bi-distilliertem Wasser gespült. Um das Eindringen von unsteriler Umgebungsluft während der Spülung zu verhindern, erfolgte die Spülung unter Begasung mit CO<sub>2</sub>/Luft über die Silikonmembran. Nachfolgend wurde die pH-Sonde, welche aufgrund des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zunächst entfernt wurde, mit Ethanol (70%) gereinigt und eingesetzt. Die Inokulation des Reaktors erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, mit etwa vier Litern Vorkultur (OD<sub>750nm</sub> = 4 – 5) aus einer 5L-Vorkulturflasche (Kap. 4.1) mittels Sterilkupplung durch eine Schlauchpumpe (530U, Watson-Marlow). Das verbleibende Reaktorvolumen wurde durch die automatisierte Füllstandsregelung mit Nährmedium auf das Endvolumen aufgefüllt.

#### 4.4.2 Batch-Kultivierung potentieller Produktionsstämme

Zur Evaluation, welche der ausgewählten Mikroalgen sich prinzipiell für die Kultivierung im FPA-PBR eignen, wurden die ausgewählten Stämme bei einer relativen Lichtverfügbarkeit  $I_{rel}$  von  $5 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$  im jeweiligen in Kap. 4.2 beschriebene Kulturmedium im FPA-PBR kultiviert. Die rel. Lichtverfügbarkeit wurde dabei täglich im Intervall von 24 h an die neue Biomassekonzentration  $c_X$  angepasst. Die Ammonium- und Phosphatkonzentration im FPA-PBR lag über den kompletten Versuchszeitraum im Bereich von 80 bis  $150 \text{mg}_{(\text{NH}_4)} \text{L}^{-1}$  bzw. 50 bis  $100 \text{mg}_{(\text{PO}_4)} \text{L}^{-1}$ . Bei Bedarf erfolgte die Zugabe der beiden Substrate aus konzentrierten Stammlösungen (siehe Kap. A1.4) über die entsprechende Schlauchpumpe. Den Kulturen wurde zudem  $1 \text{ml d}^{-1}$  der Fe(II)-Citrat-Lösung zudosiert. Der pH-Wert lag über die gesamte Kultivierungsdauer bei  $7,3 \pm 0,2$ . Die Temperatur betrug  $20 \pm 1,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Der  $\text{CO}_2$ -Anteil in der Zuluft lag bei 5-7 %<sub>v/v</sub>.

#### 4.4.3 Untersuchungen zur Langzeit-Photoakklimatisation von *P. tricornutum*

Vor Beginn der Versuche zur Photoakklimatisation von *P. tricornutum* UTEX 640 im FPA-PBR wurden die Mikroalgenkulturen mehrere Tage unter gleichbleibenden Bedingungen mit  $I_{rel} = 5 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$  im Reaktor kultiviert, um eine Akklimatisation an das Reaktorsystem zu ermöglichen. Wie in Abb. 15 illustriert, erfolgten die Versuche im FPA-Reaktor in drei Phasen bei jeweils unterschiedlicher relativer Lichtverfügbarkeit ( $I_{rel}$ ) von 2, 5 und  $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ , beginnend bei  $5 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ , als „repeated fed-batch“ Prozess.

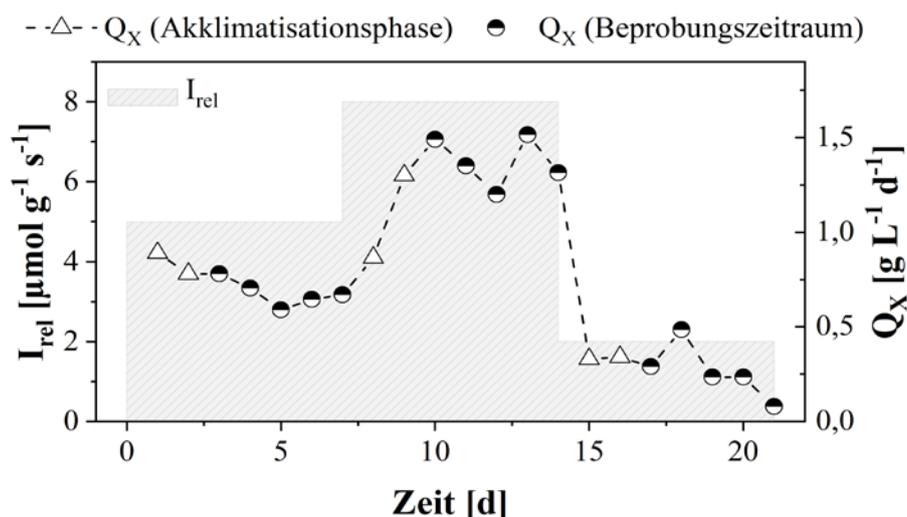


Abbildung 15: Beispielhafte Darstellung einer Kultivierung von *P. tricornutum* UTEX 640 zur Photoakklimatisation mit 48 h Akklimatisationszeit bei konstanter Biomassekonzentration  $c_X$ . Die Bewertung der Phasen erfolgte lediglich mit den Messwerten (hier dargestellt ist die volumetrische Biomasseproduktivität) nach Ablauf der Akklimatisationszeit (halbgefüllte Kreise). Die graue Schattierung zeigt die verwendete relative Lichtverfügbarkeit. Legende:  $I_{rel}$  = relative Lichtverfügbarkeit;  $Q_X$  = volumetrische Biomasseproduktivität (über 24 h).

Bei einer Biomassekonzentration von  $c_x = 6 \text{ g L}^{-1}$ , welche täglich angepasst wurde, entspricht dies nach Gleichung 7 (Kap. 4.8.1) einer Photonenflussdichte (PFD) von 343, 857 und  $1371 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Vergleichend wurden auch Versuche mit einer Biomassekonzentration von  $c_x = 3 \text{ g L}^{-1}$  bei derselben Lichtverfügbarkeit durchgeführt. Durch die wachstumsbedingte Zunahme der Biomassekonzentration im Bioreaktor im Verlauf von 24 h bis zur nächsten Probennahme und der nachfolgenden Verdünnung verändert sich über den Zeitraum von 24 h auch die relative Lichtverfügbarkeit, weshalb zur Interpretation der Ergebnisse zusätzlich die durchschnittliche relative Lichtverfügbarkeit  $\bar{\Phi}_{\text{rel}}$  nach Gleichung 8 (Kap. 4.8.1) berechnet wurde.

In Anlehnung an die Arbeit von Nymark et al. (2009) erfolgte die Probennahme ( $V_{\text{Probe}} = 50 \text{ ml}$ ) für die Fettsäure-Analytik (Kap. 4.6.4) und die Carotinoid-Analytik (Kap. 4.6.5) nach einer Akklimatisationsphase von 48 h an die neue Lichteinstellung (Nymark et al., 2009). Die Probennahme erfolgte täglich vor der erneuten Verdünnung. Vor und nach jeder Verdünnung wurde zusätzlich die Biotrockenmasse bestimmt (Kap. 4.6.1), sowie die Ammonium- und Phosphatkonzentration im FPA-PBR kontrolliert (Kap. 4.6.2). Die Ammoniumkonzentration wurde für den kompletten Versuchszeitraum im Bereich von 80 bis  $150 \text{ mg L}^{-1}$  gehalten. Die Phosphatkonzentration lag zwischen 50 bis  $100 \text{ mg L}^{-1}$  und wurde ebenfalls bei Bedarf täglich angepasst. Der pH-Wert lag über die gesamte Kultivierungsdauer bei  $7,3 \pm 0,2$ . Die Temperatur betrug  $20 \pm 1,5 \text{ }^\circ\text{C}$  und der  $\text{CO}_2$ -Anteil in der Zuluft lag bei 5-7 %<sub>v/v</sub>. Um möglichst repräsentative Ergebnisse zu erhalten, wurden die Versuche zur Photoakklimatisierung in drei FPA-PBR über einen Zeitraum von jeweils 21 Tagen (zwei Tage Adaptionszeit und fünf Tage Probezeitraum für jede der drei Lichteinstellungen) durchgeführt. Alle gewonnenen Daten (jeweils 45 Stichproben pro Reaktor) wurden nachfolgend anhand der drei Lichteinstellungen gruppiert und verglichen (siehe hierzu Kap. 4.8.3).

#### **4.4.4 Freilandkultivierung von *P. tricornutum* im Pilotmaßstab**

Für die Durchführung der umfangreichen Experimente zur subkritischen Hochdruckflüssigextraktion von Fucoxanthin und EPA aus *P. tricornutum* UTEX 640 und des Scale-Up der Methode waren mehrere Kilogramm *P. tricornutum*-Biomasse erforderlich. Die Biomasse wurde im Rahmen dieser Arbeit in einer Freilandanlage, bestehend aus 24 FPA-PBR mit einem Volumen von 180 L, im Zeitraum vom März bis September 2015 am Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse CBP hergestellt (Brintzer, 2019). Die Kultivierung erfolgte analog zu Kap. 4.4.1 und 4.4.2, jedoch im Freiland, ohne zusätzlichem Einsatz künst-

licher Beleuchtung. Die im Produktionszeitraum geerntete Biomasse wurde vereint und wie in Kap. 4.5.1 beschrieben, aufgeschlossen.

## 4.5 Aufarbeitung der Biomasse

Nachfolgend sind alle Methoden und Untersuchungen zum Zellaufschluss sowie zur Extraktion und Trennung der Wertstoffkomponenten Fucoxanthin und EPA beschrieben. Wie zuvor erwähnt, diente als Ausgangsbiomasse für alle Versuche *P. tricornutum* UTEX 640 Biomasse, welche nach Kap. 4.4.4 am Fraunhofer CBP im Freiland auf Basis von FPA-Bioreaktoren produziert wurde. Die Lagerung der Biomasse erfolgt als gefrorene Paste bei -20 °C.

### 4.5.1 Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle

Der Zellaufschluss der *P. tricornutum* Biomasse erfolgte mittels Rührwerkskugelmühle (RWKM) basierend auf den von Seibert (2013) und Haussmann (2018) optimierten Aufschlussparametern (Seibert, 2013; Haussmann, 2018). Die RWKM (PML-2, Bühler) war ausgestattet mit der Mahlkammer Centrex S1 mit einem Mahlvolumen von 0,22 dm<sup>3</sup>. Als Mahlkörper dienten stabilisierte Keramikugeln (Draion Ytterium Ultra Power, Bühler) mit einem Durchmesser von 0,3 mm und einer Dichte von 5.95 g cm<sup>-3</sup>. Der Mahlkörperfüllgrad betrug 80 %. Drei Liter der Zellsuspension wurden kontinuierlich aus einem Vorlagebehälter (5 L) durch eine Pumpe (PSF 3, Ragazzini) bei 3500 rpm in den Mahlraum gefördert. In Anlehnung an Seibert (2013) wurden die geerntete Biomasse vor dem Aufschluss auf ein BTM-Anteil 10 %<sub>w/w</sub> verdünnt und anschließend über einen Zeitraum von 3,5 Stunden aufgeschlossen (Seibert, 2013).

Die Kontrolle des Aufschlussgrades erfolgte durch Messung der Proteinkonzentration im wässrigen Überstandes mittels FTIR-Spektroskopie (Kap. 4.6.3) sowie durch begleitende Lichtmikroskopie. Die aufgeschlossene Biomasse wurde bis zur Extraktion der Wertstoffe bei -20 °C eingefroren und anschließend über 24 h gefriergetrocknet (VaCo 5, Zirbus). Da sich die Zusammensetzung sowie die Zellwand von Mikroalgen nicht nur speziesspezifisch, sondern auch abhängig von den verwendeten Kultivierungsbedingungen und damit ggf. auch innerhalb einzelner Chargen unterscheiden kann, wurde durch Schäfer (2018) im Rahmen dieser Arbeit eine Aufschlusskinetik für die in dieser Arbeit verwendete *P. tricornutum* UTEX 640 Biomassecharge aufgenommen (im Anhang, Kap. A2.1).

### 4.5.2 Subkritische Hochdruckflüssigextraktion im Labormaßstab

Die Experimente zur subkritischen Hochdruckflüssigextraktion (PLE) von lipophilen Fraktionen mit Fettsäuren und Fucoxanthin wurden im Labormaßstab mit einem Accelerated

Solvent Extraction System (ASE 350, Thermo-Fisher) durchgeführt. Als Extraktionsreaktor dienten abhängig vom jeweiligen Experiment Extraktionszellen aus Edelstahl, bestehend aus Mantel, Sinterplatte und Schraubverschluss mit einem Volumen von 5 bzw. 100 ml. Die 5 ml Zellen wurden primär für die Ermittlung geeigneter Extraktionsparameter (z.B. Lösungsmittel, Temperatur und Verweilzeit) verwendet, während die größeren Zellen zur Erzeugung von Probenmaterial für weiterführende Versuche, wie z.B. für die spätere Fucoxanthinfällung, verwendet wurden. Extrahiert wurde bei einem konstanten Druck von 100 bar im Temperaturbereich von 0 bis 200 °C. Abhängig vom jeweiligen Experiment wurde eine statische Extraktionszeit im Bereich von 0 min (nur technisch bedingte Aufheizphase) bis 60 min gewählt. Die eingesetzte Mikroalgenbiomasse wurde zuvor mittels RWKM aufgeschlossen und entweder lyophilisiert (nach Kap.4.5.1) oder als wässriger Slurry mit definiertem Wassergehalt von 70 %<sub>w/w</sub> in die Extraktionszelle überführt. Als Extraktionshilfsmittel kam Diatomeenerde (392545, Sigma-Aldrich) zum Einsatz, um eine homogenere Verteilung der Probe innerhalb der Extraktionszelle zu gewährleisten. Die Diatomeenerde wurde, wenn nicht anders erwähnt, im Verhältnis 1:1 (w/w) mit der Mikroalgenbiomasse vermischt.

Tabelle 6: Physikalische Kenngrößen der für die Extraktion verwendeten Lösungsmittel (Rumble, 2017).

<b>Lösungsmittel</b>	<b>Dielektrizitätskonstante <math>\epsilon</math></b> [bei 20 °C]	<b>Siedepunkt <math>P_s</math> bei</b> <b>Normaldruck [°C]</b>	<b>Kritischer Punkt <math>P_c</math></b> <b>(T, p)</b>
Wasser	81,1	100	374 °C, 221 bar
Ethanol	25,3	78,2	241 °C, 63 bar
Aceton	21,5	56	235 °C, 48 bar
Ethylacetat	6,1	77,1	250 °C, 39 bar
n-Hexan	1,9	69,0	234 °C, 30 bar

Bei der PLE wird das Volumen der Extraktionszelle zunächst mit einer Hochdruckpumpe vollständig mit Lösungsmittel befüllt, bis der eingestellte Druck von 100 bar erreicht ist. Anschließend wird die Extraktionszelle im integrierten Ofen bis zum Erreichen der Solltemperatur erhitzt. Nach dieser Aufheizphase startet der eigentliche Extraktionsvorgang für die zuvor festgelegte statische Extraktionszeit (Verweilzeit). Die erzeugten Lösungsmittel-Extrakte werden anschließend unter Zurückhaltung der partikulären Biomasse (0,25 µm) in lichtgeschützte Auffanggefäße mit Septum überführt. Im Anschluss an den Extraktionsvorgang wird die Extraktionszelle für 300 s mit Stickstoffdioxid durchströmt, um einen vollständigen Transfer des Lösungsmittel-extraktes in die Auffanggefäße zu gewährleisten. Im Fall der

Extraktion wässriger Biomasse, wurde die Extraktionszelle nach Ablauf der eingestellten Extraktionszeit und der Druckabsenkung zusätzlich mit dem zuvor verwendeten Lösungsmittel (60% v/v des Zellvolumens) nachgespült. Für die Analyse der Carotinoide und Fettsäuren wurde ein Teil des flüssigen Extraktes aliquotiert und zum Schutz vor Oxidation mit 250 ml L<sup>-1</sup> Butylhydroxytoluol (BHT) versetzt. Die Lagerung der Proben bis zur Analyse erfolgte unter Lichtausschluss bei -18 °C.

### **4.5.3 Subkritische Hochdruckflüssigextraktion im technischen Maßstab**

Um die subkritische Extraktion in einem größeren Maßstab durchführen zu können und größere Mengen der Extrakte sowie der aufgereinigten Produkte als Produktmuster erzeugen zu können, wurde das Verfahren der PLE im Rahmen dieser Arbeit, in Kombination mit der ebenfalls beschriebenen Fällung zur Gewinnung von Fucoxanthin, in den Technikumsmaßstab skaliert (siehe Abb. 16). Hierfür wurde am Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse CBP eine Anlage auf Basis der zuvor evaluierten Extraktions- und Fällungsbedingungen (siehe Kap. 4.5.2 und 4.5.4) konzipiert und Experimente als „Proof of Concept“ durchgeführt. Die Skalierung erfolgte im Rahmen des durch die EU geförderten Projektes (Horizon 2020): „Microalgae as a green source for nutritional ingredients for food/feed and ingredients for cosmetics by cost-effective new technologies“ (MAGNIFICENT).

Wie in Abb. 16 illustriert, wurde in der Technikumsanlage zur subkritischen Fest-Flüssig-Extraktion ein Reaktor (BR1000, Berghof) mit einem maximalen Volumen von 1,24 L verwendet, welcher mit einem Rührwerk, einem Drucksensor und einem Temperatursensor versehen war. Anders als bei der Laboranlage erfolgte der Aufbau des notwendigen Drucks technisch bedingt nicht über eine Lösungsmittelpumpe, sondern über eine Stickstoffflasche mit 200 bar Überdruck. Die Temperierung auf bis zu 100 °C erfolgte über den Heizmantel des Reaktors. Die Extraktion erfolgte, anders als im Labormaßstab, bei einem Überdruck von 40 bar. Im Anschluss an den Extraktionsvorgang wurde die partikuläre Biomasse über eine Edelstahlfilterkartusche mit einer Porengröße von 0,25 µm abgetrennt und das lipidhaltige Filtrat über eine Leitung mit Heizmantel (T = 85 °C) in einen zweiten Reaktor (PARR) transferiert. Als treibende Kraft wurde hierbei eine Druckdifferenz von 10 bar angelegt. Im zweiten Reaktor wurde das Lösungsmittel zur Fällung des Fucoxanthins auf 25 °C abgekühlt. Nach der Abkühlung konnte der Extrakt mit Hilfe des Restdrucks in einem Auffangbehälter aufgefangen werden. Die nachfolgende Filtration des ausgefällten partikulären Fucoxanthins erfolgte gemäß Kap. 4.5.4. Das EPA-haltige Filtrat wurde gemäß Kap. 4.6.4 hinsichtlich der enthaltenen Fettsäuren untersucht.

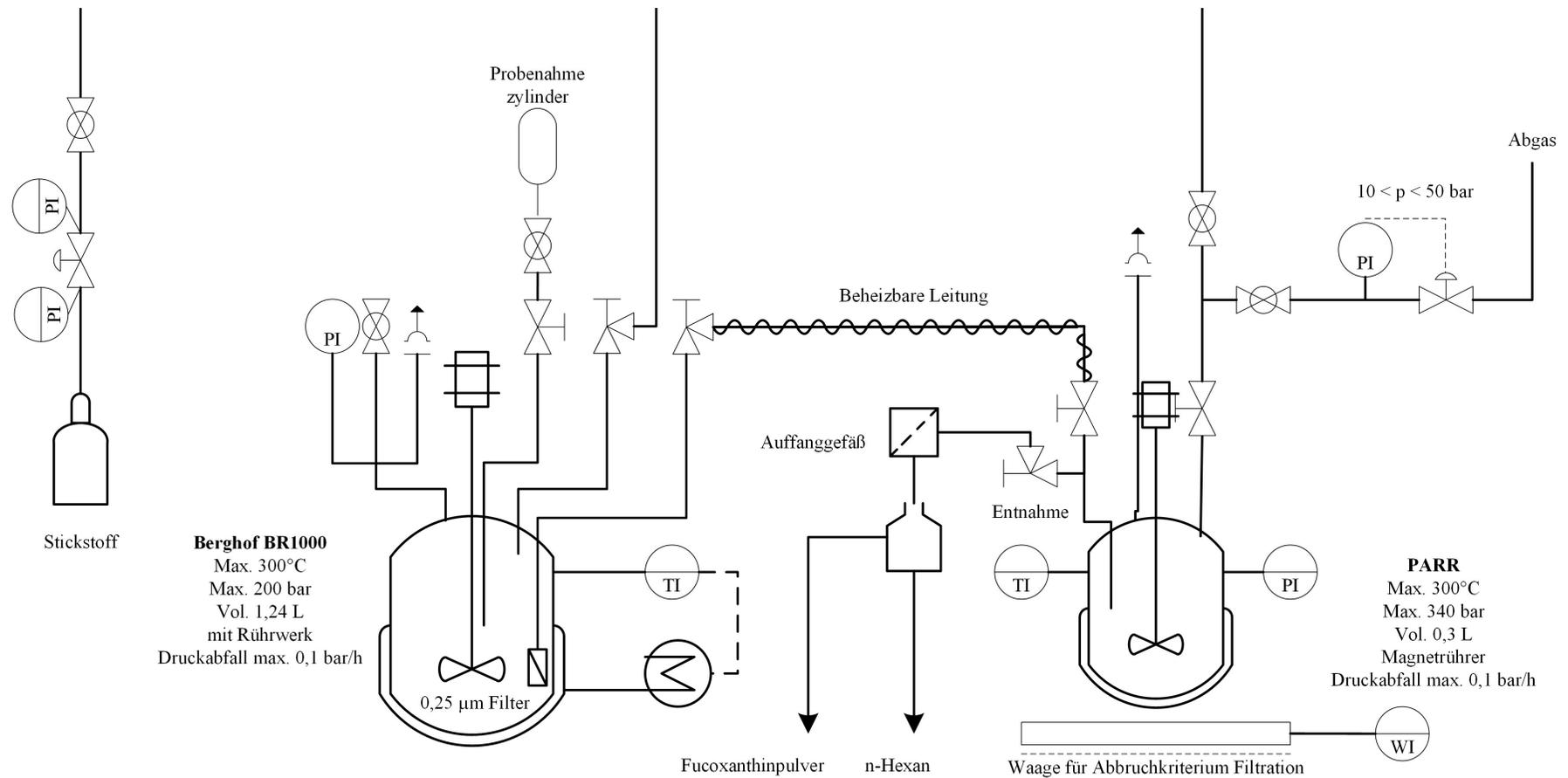


Abbildung 16: RI-Fließbild der Technikumsanlage zur Hochdruckflüssigextraktion von *P. tricornutum*-Biomasse und anschließender Fällung von partikulärem Fucoxanthin am Fraunhofer CBP in Leuna.

#### 4.5.4 Vakuumfiltration von Lösungsmittelextrakten

Die Vakuumfiltration zur Separation des Fucoxanthin-Präzipitats aus den mittels PLE erzeugten n-Hexan-Lipidfraktionen erfolgte mit einer Drucknutsche mit Vakuumpumpe (CVC-2, Vakuubrand). Der hierfür verwendete Lipidextrakt wurde, wie zuvor in Kap. 4.5.2 beschrieben, extrahiert. Hierfür wurden 5 g aufgeschlossene und lyophilisierte *P. tricornutum*-Biomasse bei  $T = 100\text{ °C}$  ( $t = 20\text{ min}$ ) und  $p = 100\text{ bar}$  unter Verwendung von Extraktionszellen mit einem Volumen von 100 ml extrahiert. Als Filter dienten zuvor tarierte PTFE-Filtermembranen (N-1690-52/56/60, BOLA) mit einem Durchmesser von 4,7 mm und einer Dicke von 0,2 mm. Es wurden Filter mit einer Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$ ; 0,45  $\mu\text{m}$ ; 1  $\mu\text{m}$  und 5  $\mu\text{m}$  untersucht. Die Filtration erfolgte bei einem Solldruck von 800 mbar. Zur Bestimmung der Menge des fucoxanthinhaltigen Retentats wurde die zuvor tarierten Filter nachfolgend getrocknet (30  $\text{°C}$ ) und gewogen. Das gewonnene Pulver wurde bei -18  $\text{°C}$  gelagert. Um etwaige Verluste, z. B. bedingt durch Adhäsion des Fucoxanthin an der Glasoberfläche der Nutsche, quantifizieren zu können, wurde die Apparatur nachfolgend mit einer Ethanol-Lösung (99%) mit 250  $\text{mg L}^{-1}$  Butylhydroxytoluol (BHT) gespült. Das fucoxanthin-haltige partikuläre Retentat wurde hinsichtlich des Masseanteils an Fucoxanthin und Fettsäuren analysiert. Es wurde zudem zusätzlich die Konzentration beider Zielkomponenten im Permeat untersucht.

#### 4.5.5 Untersuchungen zur Löslichkeit von Fucoxanthin in n-Hexan

Um Daten zur Löslichkeit von Fucoxanthin in n-Hexan in Abhängigkeit von der Temperatur zu gewinnen, wurden übersättigte Lösungen hergestellt. Hierfür wurde eine Konzentration von 3  $\text{mg ml}^{-1}$  Fucoxanthin in n-Hexan in gasdichten und druckfesten Glasgefäßen (Pyrex) vorgelegt. Es wurden zudem vergleichend unaufgereinigte Lipidfraktionen in n-Hexan aus der PLE mit zusätzlichem Fucoxanthin (3  $\text{mg ml}^{-1}$ ) versetzt. Anschließend wurde die Temperatur in einem Heizblock (TR-L 288) graduell bis auf 100  $\text{°C}$  erhöht. Die Probenentnahme aus dem Überstand erfolgte im Bereich von 20  $\text{°C}$  bis 100  $\text{°C}$ . Das n-Hexan in den Proben wurde nachfolgend verdampft, der Rückstand in Ethanol mit 250  $\text{mg L}^{-1}$  BHT resuspendiert und die Proben bei -18  $\text{°C}$  bis zur Analyse gelagert. Die Fucoxanthinkonzentration der Proben und der Ausgangslösung wurde mittels HPLC (Kap. 4.6.5) bestimmt.

#### 4.5.6 Untersuchungen zur thermischen Stabilität von Fucoxanthin

Zur Untersuchung der Stabilität von Fucoxanthin in Abhängigkeit von der Temperatur wurde ausgehend von einer Stammlösung mit 0,04  $\text{mg ml}^{-1}$  Fucoxanthin in Ethanol jeweils 1 ml der Lösung in druckdichte Glasgefäße (Pyrex) aliquotiert. Die Aliquote wurden in einem vorgeheizten Heizblock (TR-L 288) über einen Zeitraum von 0 bis 300 min auf 100, 150 und

200 °C erhitzt und anschließend im Eisbad abgekühlt. Der Fucoxanthingehalt der Ausgangslösung und der Proben wurden mittels HPLC bestimmt (Kap. 4.6.5).

## **4.6 Analytische Methoden**

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten analytischen Methoden beschrieben, welche zur Quantifizierung und qualitativen Bewertung der Mikroalgenbiomasse, der Mikroalgenextrakte und den isolierten Produkten eingesetzt wurden.

### **4.6.1 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration**

Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration im FPA-Bioreaktor erfolgte durch Filtration der Proben mit einer Keramiknutsche, wie bereits durch Holdmann (2018) beschrieben (Holdmann, 2018). Hierfür wurden getrocknete, tarierte Rundfilter (MN 85/70, Machery-Nagel) in einer Kermiknutsche platziert und mit 5 ml Probensuspension benetzt. Die Flüssigkeit wurde durch eine Vakuumpumpe abgezogen. Zur Entfernung der im Kulturmedium enthaltenen Salze wurde der entstandene Filterkuchen im Anschluss zweimal mit je 5 ml bidestilliertem Wasser gespült. Der Filter mit Filterkuchen wurde anschließend bei 105 °C in einer Trockenwaage (E 2000 D, Sartorius) getrocknet und in einer Analysenwaage (Entris 224L-1S, Satorius) gewogen. Um die Biotrockenmasse der eingesetzten Mikroalgenstämme bei Experimenten mit einem geringen Kulturvolumen bzw. einer geringen Biomassekonzentration (z.B. im Schüttelkolben) verfolgen zu können, wurde für einige Mikroalgenspezies zusätzlich ein OD/BTM-Korrelationsfaktor zur Berechnung der Biotrockenmassekonzentration anhand von Vergleichsmessungen bestimmt. Hierzu wurde die optische Dichte (OD) bei 750 nm gemessen und mit der zuvor beschriebenen Biotrockensubstanzbestimmung korreliert.

### **4.6.2 Bestimmung der Ammonium- und Phosphatkonzentration im Nährmedium**

Die Bestimmung der Ammonium- und Phosphatkonzentration im Nährmedium erfolgte mittels Fließinjektionsanalyse (FIA), wie bereits in vorherigen Arbeiten von Münkel (2015) und Holdmann (2018) beschrieben (Münkel, 2015; Holdmann, 2018). Für die Analyse wurden 5ml Probe mittels Spritzenvorsatzfilter (0,25 µm) filtriert. In der FIA wird das Filtrat automatisiert in einen Trägerstrom injiziert und über den Reaktionsbereich zum Detektor geleitet. Das enthaltene Ammonium wird dabei zu Ammoniak umgewandelt, welches durch eine gasdurchlässige Membran in ein mit Bromthymolblau (pH-Indikator) versetztes Lösungsmittel diffundiert und bei 620 nm photometrisch erfasst werden kann. Die Bestimmung der Phosphatkonzentration erfolgte über die Reaktion mit Ammoniummolybdat. Der dabei entstandene gelbe Farbkomplex kann durch Ascorbinsäure in einen blauen Farbkomplex umgewandelt und

bei 880 nm photometrisch detektiert werden. Mittels Kalibriergerade können beide Extinktionen in die entsprechende Ionenkonzentration umgerechnet werden. Aufgrund der zeitaufwendigen Durchführung der FIA-Messung wurden während der laufenden Kultivierung der Mikroalgen zusätzliche standardisierte Schnelltests der Firma Machery-Nagel (Quantofix 91313, 91315 und 91320) eingesetzt und im Analysegerät (Quantofix-Relax, Machery-Nagel) ausgelesen. Entsprechende Rückstellproben von selben Probezeitpunkt wurden mittels FIA nachträglich analysiert.

### **4.6.3 Quantifizierung von Proteinen mittels FTIR-Spektroskopie**

Die Quantifizierung der Gesamtproteine in der Mikroalgenbiomasse erfolgte spektrometrisch mit einem FTIR-Spektroskop (DirectDetect, Merck-Millipore) durch Messung der Anzahl der Amid-Bindungen, wie durch Strug et al (2014) beschrieben (Strug et al., 2014). Die Methode wurde in ähnlicher Form bereits durch Trautmann (2018) zur Quantifizierung von Proteinen in Mikroalgen eingesetzt (Trautmann, 2018). Die zuvor gefriergetrocknete Biomasse wurde in PBS-Puffer resuspendiert und mittels Precellys Homogenisator (Precellys 24, Bertin Technologies) in drei Durchgängen mit einer Dauer von je einer Minute bei 5500 rpm lysiert. Die Lysate wurden entsprechend des Messbereiches ( $0,2 - 5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) des FTIR-Spektrometers verdünnt und gegen den jeweiligen Puffer-Blank auf hydrophobe PTFE-Membranen (Merck Millipore) aufgetragen. Nach der geräteinternen Trocknung der einzelnen Probenspots erfolgte die Quantifizierung über die Amid I-Bande bei 1600 bis  $1690 \text{ cm}^{-1}$  gegen die geräteinterne Kalibrierung (AM1) mit bovinem Serumalbumin (BSA).

### **4.6.4 Bestimmung von Fettsäureprofilen mittels FAME-GC**

Die Quantifizierung der Fettsäuren in der Mikroalgenbiomasse und den erzeugten Extrakten erfolgte als Fettsäuremethylester (FAME) basierend auf der Methode zur Transesterifizierung von Fettsäuren von Lepage und Roy (1984) (Lepage und Roy, 1984). Die anschließende Gaschromatographie der FAME wurde in ähnlicher Form bereits durch Meiser et al. (2004) und Münkler (2015) beschrieben und geringfügig modifiziert (Meiser et al., 2004; Münkler, 2015). Zur Kontrolle der Umesterungsrate wurden die Proben vor der Transesterifizierung zusätzlich mit einem C13-Fettsäure-Standard (freie Fettsäure) versetzt. Die Umwandlung der freien Fettsäuren in den Proben in Fettsäuremethylester (FAME) erfolgte durch eine saure Umesterung in Acetylchlorid und Methanol im Verhältnis 1:20 (v/v) bei  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$  für 1,5 h in druckfesten Pyrex-Röhrchen. Zur Entfernung von Verunreinigungen wurde die transesterifizierte Probe (1,5 ml) anschließend mit 1,5 ml Wasser sowie einem C15-Methylester-Standard (2 ml gelöst in Hexan) versetzt und diese für 1 min gevortext. Nach Zentrifugation bei 4000 rpm für 10 min wurde die

Hexanphase (Überstand) in GC-Vails überführt. Die Auftrennung der entstandenen FAME erfolgt in einer Supelco SPB-PUFA Säule (Supelco, USA) in einem Agilent 7890A (Agilent, USA) Gaschromatograph mit FID. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl mit einer Helium-Flussrate von 50 ml min<sup>-1</sup> und dem in Tab. 7 dargestellten Temperaturverlauf.

Tabelle 7: Temperaturprofil der eingesetzten FAME-GC-Methode.

Temperatur [°C]	Haltezeit [min]	Gradient [°C min <sup>-1</sup> ]
60	4,0	0
60	2,8	35
160	12,5	2
185	15,0	1
200	6,7	3
220	15,5	0

Die von Lepage und Roy (1984) beschriebene Methode zur Umesterung und Quantifizierung von Fettsäuren in der Biotrockenmasse von Mikroalgen dienten in dieser Arbeit auch zur Ermittlung eines Referenzwerts für die in den Mikroalgen maximal verfügbare Fettsäuremenge und damit zur Berechnung der EPA-Ausbeute  $Y^*_{EPA}$  (in %<sub>w/w</sub>) nach Gleichung 10 (Kap. 4.8.2).

#### 4.6.5 Quantifizierung von Carotinoiden mittels HPLC

Die Analyse der Carotinoidgehalte der mittels PLE gewonnenen Extrakte erfolgte auf Basis der Methode von Gille et al. (2016) mit geringfügigen Modifikationen (Gille et al., 2016). Als HPLC diente eine Agilent 1200 Infinity ausgestattet mit einer Suplex pKb 100 (5 mm, 250 x 4,6 mm) Säule (Supelco, USA) und einem Multiwellenlängen-Detektor. Die mobile Phase A bestand aus Methan/Acetonitril/2-Propanol im Verhältnis 54/44/2 (v/v/v). Phase B bestand aus Phase A mit bi-distilliertem H<sub>2</sub>O im Verhältnis 85/15 (v/v). Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml min<sup>-1</sup> nach dem in Tabelle 8. aufgeführten Lösungsmittelgradienten. Das Injektionsvolumen betrug 5 µl. Die Carotinoide wurden entsprechend ihrer jeweiligen Absorptionsmaxima bei einer Wellenlänge von 430, 450 und 460 nm erfasst.

Um einen maximalen Fucoxanthingehalt bezogen auf die Biomasse bestimmen zu können und angesichts der Tatsache, dass in der Literatur bisher keine Referenzmethode für die Extraktion von Fucoxanthin aus Mikroalgen beschrieben ist, wurde für diese Arbeit die bereits in Derwenskus et al. (2019) beschriebene PLE-Methode zur Bestimmung eines maximalen Fucoxanthingehaltes in der Biomasse herangezogen (Derwenskus et al., 2019), wobei die statische Extraktionszeit in den einzelnen Extraktionszyklen entgegen der publizierten Methode von 20

auf 5 min reduziert wurde, um einem thermischen Abbau des Fucoxanthins entgegenzuwirken. Die Methode diente auch zur Ermittlung eines Referenzwerts für die in den Mikroalgen maximal verfügbare Fucoxanthinmenge und damit zur Berechnung der prozentualen Fucoxanthin-Ausbeute  $Y_{FX}^*$  (in %<sub>w/w</sub>) nach Gleichung 10 (Kap. 4.8.2).

Tabelle 8: Lösungsmittelgradient der HPLC-Methode zur Quantifizierung der Carotinoide.

Zeit [min]	Lösungsmittel A [%]	Lösungsmittel B [%]
0	60	40
10	20	80
20	0	100
28	0	100
29	60	40
38	60	40

#### 4.6.6 Massenspektroskopische Analyse von Fucoxanthin mittels UHPLC-MS

Die massenspektroskopischen Untersuchungen der gewonnenen Extrakte und des präzipitierten Fucoxanthins erfolgte mittels UHPLC-DAD (1290 Infinity, Agilent Technologies) mit einer Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm) Säule (Agilent Technologies) mit einer Partikelgröße von 1,8  $\mu$ m. Als Eluent diente bi-distilliertes H<sub>2</sub>O mit 0,1 % Ameisensäure (Eluent A) und Methanol mit 0,1 % Ameisensäure (Eluent B) bei einem Fluss von 0,2 ml min<sup>-1</sup>. Das Injektionsvolumen betrug 2  $\mu$ L. Gemessen wurde bei Wellenlängen von jeweils 450 nm und 460 nm. Die Ionisierung im Massenspektrometer LTQ XL (Thermo Scientific) erfolgte mittels ESI-Quelle im Full-Scan Modus von 200 bis 1000 m/z bei einer Temperatur von 275 °C (Kapillare) und einer Spannung von -9,0 V. Die erhaltenen Spektren wurden sowohl mit einem kommerziell erhältlichen all-trans-Fucoxanthin Standard verglichen (16337, Sigma-Aldrich) als auch mit Spektren aus der Literatur (Zhang et al., 2015). Für die UHPLC wurde der in Tab. 9 beschriebene Lösungsmittelgradient verwendet.

Tabelle 9: Lösungsmittelgradient zur Analyse von Fucoxanthin mittels UHPLC-MS.

Zeit [min]	Lösungsmittel A [%]	Lösungsmittel B [%]
0	70	30
8	3	97
11	3	97
11,1	70	30
14	70	30

#### **4.6.7 Partikelgrößenbestimmung von Fucoxanthinpartikeln mittels Laserbeugung**

Eine Abschätzung der Partikelgrößenverteilung der Fucoxanthinpartikel in den übersättigten n-Hexan-Lösungen erfolgte mittels Laserbeugung in einem Partikelgrößenmessgerät (Mastersizer 2000, Malvern Instruments) mit Dispersionsmodul. Als Lichtquelle diente ein Helium-Neon-Laser. Die Messungen erfolgten in einem Messintervall von 15 s in der Größenordnung von 0,02 bis 2000  $\mu\text{m}$ . Der verwendete Partikelabsorptionsindex betrug 1,565 und der Suspensionsbrechungsindex 1,380. Die Abschätzung der Partikelgröße diente der Auswahl geeigneter Filter zur Vakuumfiltration der mittels PLE gewonnenen n-Hexan-Extrakte (Kap. 4.5.4).

#### **4.6.8 Rasterelektronenmikroskopie (REM) von Fucoxanthinpartikeln**

Die Aufnahmen im Rasterelektronenmikroskop (REM) erfolgten in einem Leo Gemini 1530 VP (Zeiss) bei einer Beschleunigungsspannung von 5 kV und diente der Abschätzung der Partikelgröße sowie der Oberflächenbeschaffenheit der Fucoxanthinpartikel im Bereich von 20  $\mu\text{m}$  bis 100 nm. Das aus n-Hexan präzipitierte Fucoxanthinpulver wurde hier zuvor auf den Probenträgern mit Teflon-Klebestreifen fixiert und für eine geeignete elektrische Leitfähigkeit bzw. ausreichenden Kontrast vor der Messung mit Platin gesputtert.

### **4.7 Assays zur Bestimmung von ernährungsphysiologischen Eigenschaften**

Nachfolgend werden die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten photometrischen Assays zur Bestimmung von ernährungsphysiologischen Eigenschaften der gewonnenen Extrakte und des aufgereinigten Fucoxanthinpulvers beschrieben. Die Assays dienten der Bestimmung der enthaltenen phenolischen Antioxidantien (Kap. 4.7.1), der Bestimmung der Radikalfängereigenschaften (Kap. 4.7.2) sowie der Bestimmung der anti-oxidativen Kapazität (Kap. 4.7.3).

#### **4.7.1 Folin-Ciocalteu-Assay zur Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes**

Der Folin-Ciocalteu-Assay wurde basierend auf der Methode von Singleton et al. (1999), welche durch Blainski et al. (2013) weiterentwickelt wurde, durchgeführt und wird für die kolorimetrische Bestimmung der in einer Probe enthaltenen phenolischen Antioxidantien in Lebensmitteln, Pflanzenextrakten und auch Algen eingesetzt (Singleton et al., 1999; Blainski et al., 2013). In der Probe enthaltene phenolische Hydroxylgruppen bilden mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz (Merck Millipore, Zusammensetzung im Anhang, Kap. A1.5) ein blaues Chromophor, bestehend aus einem Phosphorwolframphosphormolybdän-Komplex, welcher photometrisch bei 765 nm detektiert werden kann. Hierdurch kann auf die Gesamtheit der in

der Probe enthaltenen Phenole rückgeschlossen werden. Die Stärke des Farbumschlags kann mit dem Farbumschlag der Referenzsubstanz Gallussäure (GA) verglichen werden und die reduzierende Wirkung in Form von Gallussäure-Äquivalenten (engl. „Gallic acid equivalents“, GAE) angegeben werden. Der Assay wurde in 96-Well-Mikrotiterplatten aus Polysterol (Flat Bottom, Greiner) durchgeführt. Hierfür wurden 150  $\mu\text{L}$  des Reagenz vorgelegt und anschließend mit 120  $\mu\text{L}$   $\text{NaHCO}_3$  und 30  $\mu\text{L}$  Probe vermischt. Nach 120 min Inkubationszeit unter Lichtausschluss erfolgte die photometrische Messung bei 765 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader (M200 Pro, Tecan) gegen Lösungsmittel-Blanks und Blanks der Probe ohne Reagenz.

### **4.7.2 DPPH-Assay zur Bestimmung der Radikalfängereigenschaften**

Der 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)-Assay wurde durch Blois (1958) entwickelt und dient der Charakterisierung der antioxidativen Aktivität bzw. des Potentials einer Probe bzw. Substanz zur Eliminierung freier Radikale (engl. „free radical scavenging activity“) (Blois, 1958). Der Assay wurde durch Brand-Williams et al. (1995) weiterentwickelt und findet, wie auch in dieser Arbeit, meist in der vereinfachten Form, zur Analyse von Mikroalgenextrakten Verwendung (Brand-Williams et al., 1995; Feller et al., 2018). Der Assay basiert auf dem stabilen Radikal 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Durch ein delokalisiertes Elektron weist DPPH eine violette Färbung auf. Durch in der Probe vorhandene Antioxidantien verliert DPPH diese Färbung, wobei die reduzierte Form gelblich ist. Die Farbänderung kann bei 520 nm photometrisch detektiert werden. Das Ergebnis wird durch Vergleich mit Referenzsubstanzen, typischerweise Vitamin-C, Trolox oder  $\alpha$ -Tocopherol, in Form von Äquivalenten angegeben.

In einer 96-Well Mikrotiterplatte (Flat Bottom, Greiner) wurde die verdünnte Probe in Methanol mit 150  $\mu\text{L}$  DPPH-Arbeitslösung (siehe Anhang, Kap. A1.5) vermischt. Als Blank diente Methanol und Algenextrakt ohne DPPH sowie Methanol und DPPH in Methanol ohne Probe. Die Platte wurde anschließend lichtgeschützt 30 min bei 20 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte im Photometer (M200 Pro, Tecan) bei 520 nm gegen eine Kalibrierungskurve mit Trolox-Standard (gelöst in Methanol) vermessen. Die photometrischen Daten wurden in Trolox-Äquivalente (TE) in  $\text{mg g}^{-1}$  bezogen auf die im Extrakt enthaltene Biotrockensubstanz umgerechnet.

### **4.7.3 FRAP-Assay zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität**

Der “Ferric Ion Reducing Antioxidant Power” (FRAP)-Assay wurde nach Benzie und Strain (1996) durchgeführt und dient der Untersuchung des antioxidativen Potentials einer Probe (Benzie und Strain, 1996). Der Assay basiert auf der Reduktion eines  $\text{Fe(III)}$ - 2,4,6-Tri(2-

pyridyl)-s-triazine-Komplexes (Fe(III)-TPTZ) zu Fe(II)-TPTZ. Der entstandene Fe(II)-TPTZ-Komplex weist eine blaue Färbung auf und kann bei 593 nm photometrisch detektiert werden. Der Farbumschlag stellt somit ein Maß dar, wie gut in der Probe vorhandene Antioxidantien Elektronen aufnehmen können. Die Ergebnisse werden typischerweise in Äquivalenten zu bekannten Antioxidantien wie Vitamin C, Trolox oder  $\alpha$ -Tocopherol angegeben. Zur Durchführung wurden 220  $\mu$ L der FRAP-Lösung (siehe Anhang, Kap. A1.5) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte aus Polystyrol (Flat Bottom, Greiner) vorgelegt und mit 10  $\mu$ L der entsprechend des Messbereiches verdünnten Probe vermischt. Im Anschluss an die Inkubation für 90 min bei einer Temperatur von 37 °C erfolgte die photometrische Messung bei 593 nm im Mikrotiterplatten-Reader (M200 Pro, Tecan). Gemessen wurde gegen eine Messreihe mit einem Eisen(II)sulfat-Standard und gegen Blanks der FRAP-Lösung sowie der verdünnten Probe ohne FRAP-Lösung.

## 4.8 Definition von Sekundärgrößen aus direkten Messwerten

Zur Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Prozesse wurden Sekundärgrößen berechnet, welche nachfolgenden definiert werden. Einige der Größen betreffen primär die Kultivierungsprozesse (Kap. 4.8.1) andere die Extraktion und Aufreinigung der Wertstoffe (Kap. 4.8.2). Sie werden daher in separaten Kapiteln beschrieben. Es erfolgte zudem eine Fehlerbetrachtung der aus den direkten Messwerten errechneten Sekundärgrößen (Kap. 4.8.3).

### 4.8.1 Sekundärgrößen zur Beschreibung der Kultivierungsprozesse

Die Berechnung der volumetrischen Biomasseproduktivität  $Q_X$  und der volumetrischen Produktivität einzelner Wertstoffkomponenten  $Q_i$  (Dimension:  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) erfolgte nach Gleichung 2 anhand der Konzentration der Biotrockenmasse bzw. der Konzentration der Wertstoffkomponente zum Zeitpunkt  $t$  und zum Zeitpunkt  $t_0$  innerhalb eines betrachteten Prozessintervalls.

$$Q_X = \frac{c_X(t) - c_X(t_0)}{t - t_0} \quad \text{bzw.} \quad Q_i = \frac{c_i(t) - c_i(t_0)}{t - t_0} \quad (2)$$

Die Berechnung der biomassespezifischen Wachstumsrate  $\mu_X$  (Dimension:  $\text{h}^{-1}$  bzw.  $\text{d}^{-1}$ ) als Zunahme der Zellmasse pro Zeiteinheit einer Kultur erfolgte nach Gleichung 3 unter Annahme von exponentiellem Wachstum.

$$\mu_X = \ln\left(\frac{c_X(t)}{c_X(t_0)}\right) \cdot \frac{1}{t - t_0} \quad (3)$$

Zusätzlich kann die biomassespezifische Wachstumsrate  $\mu_{X,L}$  (Dimension:  $\text{h}^{-1}$  bzw.  $\text{d}^{-1}$ ) für Mikroalgen als normalisierte Biomasseproduktivität nach Bitaubé Pérez et al. (2008) unter Annahme von linearem Wachstum nach Gleichung 4 berechnet werden (Bitaubé Pérez et al., 2008).

$$\mu_{L,X} = \frac{Q_X}{\bar{c}_{X(t-t_0)}} \quad (4)$$

Die Berechnung vom biomassespezifischen Massenanteil  $\omega$  eines Produktes  $i$  (Wertstoffgehalt) erfolgte nach Gleichung 5 (Dimension:  $\text{mg g}^{-1}$ ; alternativ auch  $\%_{\text{w/w}}$  bezogen auf eine Referenzmethode).

$$\omega_i = \frac{m_i}{m_X} \text{ bzw. } \omega_i = \frac{m_i}{m_X} \cdot 100(\%_{\text{w/w}}) \quad (5)$$

Die biomassespezifische Produktbildungsrate  $q_i$  (Dimension:  $\text{mg g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) als Indikator für die Produktbildungsleistung der Biomasse errechnet sich nach Gleichung 6.

$$q_i = \frac{c_i(t) - c_i(t_0)}{c_X(t) \cdot (t - t_0)} \quad (6)$$

Die relative Lichtverfügbarkeit  $I_{\text{rel}}$  (Dimension:  $\mu\text{mol}_{(\text{Photonen})} \text{g}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) stellt den Quotienten aus der Photonenflussdichte auf der Reaktoroberfläche  $A$  und der Biomassekonzentration  $c_X$  im Bioreaktorvolumen  $V$  dar (Gleichung 7). Im Gegensatz zur Photonenflussdichte PFD, welche die Anzahl der Photonen pro Flächeneinheit und Zeiteinheit (Dimension:  $\mu\text{mol}_{(\text{Photonen})} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) beschreibt, ist sie somit ein Maß für die Lichtmenge, welche jedem Gramm Biomasse im Reaktorsystem theoretisch als Energiequelle zur Verfügung steht. Die gegenseitige Beschattung von Zellen im Photobioreaktor, der Einfluss der Strömungsmechanik, und die Eindringtiefe bedingt durch die Reaktorgeometrie, wird dabei nicht berücksichtigt. Angaben zur relativen Lichtverfügbarkeit sind somit spezifisch für das untersuchte Reaktorsystem gültig. Die relative Lichtverfügbarkeit wurde nach Gleichung 7 berechnet.

$$I_{\text{rel}} = \frac{\text{PFD} \cdot A}{V \cdot c_X} \quad (7)$$

Durch die wachstumsbedingte Zunahme der Biomassekonzentration im Photobioreaktor verändert sich  $I_{\text{rel}}$  über ein betrachtetes Zeitintervall  $\Delta t$  bis zur erneuten Anpassung von  $I_{\text{rel}}$  an die aktuelle Biomassekonzentration  $c_X$ . Dies findet vereinfacht in der durchschnittlichen rela-

tiven Lichtverfügbarkeit  $\Phi I_r$  (Dimension:  $\mu\text{mol}_{(\text{Photonen})} \text{g}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) nach Gleichung 8 Berücksichtigung:

$$\Phi I_{rel} = \frac{PFD \cdot A}{V \cdot \frac{(c_{X,t} + c_{X,t_0})}{2}} \quad (8)$$

Die Lichtausbeute  $Y_I$  (Dimension:  $\text{g} \mu\text{mol}_{(\text{Photonen})}^{-1}$ ) ist der Quotient aus der über einem Zeitraum  $\Delta t$  gebildeten Biomasse  $c_X$  und der im Zeitraum zur Verfügung stehenden Lichtmenge  $I$ . Sie stellt ein Maß dafür dar, wie effizient das zur Verfügung stehende Licht in Biomasse umgesetzt wird. Die Berechnung erfolgte nach Gleichung 9.

$$Y_I = \frac{c_X(t) \cdot c_X(t_0)}{I} \quad \text{mit} \quad I = \frac{PFD \cdot A \cdot (t - t_0)}{V} \quad (9)$$

#### 4.8.2 Sekundärgrößen zur Beschreibung der Extraktion und Produktaufreinigung

Die Extraktionsausbeute  $Y_i$  bzw.  $Y_i^*$  bei der Fest-Flüssig-Extraktion wurde entweder als Quotient der absolut extrahierten Produktmenge und der für die Extraktion eingesetzten Biotrockenmasse (Dimension:  $\text{mg} \text{g}^{-1}$ ), oder als Anteil der theoretisch verfügbaren Produktmenge ( $Y_i^*$ ) in der eingesetzten Biotrockenmasse, basierend auf einer Referenzmethode, nach Gleichung 10 berechnet (Dimension:  $\%_{\text{w/w}}$ ).

$$Y_p = \frac{m_i}{m_X} \quad \text{bzw.} \quad Y_p^* = \frac{m_i}{m_{i,verf\u00fcgbar}} \cdot 100 \quad (10)$$

Zur quantitativen Beschreibung der Produktreinheit eines Stoffes wurde der Massenanteil  $\omega_i$  der Produkte als Anteil an Trockenmasse der extrahierten Fraktionen nach Gleichung 11 berechnet (Dimension:  $\text{g} \text{g}^{-1}$  bzw.  $\%_{\text{w/w}}$ ).

$$\omega_i = \frac{m_i}{m_{Extr.}} \quad \text{mit} \quad 0 \leq \omega_i \leq 1 \quad \text{bzw.} \quad \omega_i = \frac{m_i}{m_{Extr.}} \cdot 100 (\%) \quad (11)$$

Die Beladung  $X_p$  des Lösungsmittels (LM) nach der Extraktion bezogen auf eine gelöste Komponente wurde nach Gleichung 12 berechnet (Dimension:  $\text{mg} \text{ml}^{-1}$  bzw.  $\text{g} \text{g}^{-1}$ ).

$$X_{i/LM} = \frac{m_i}{m_{LM}} = \frac{m_i}{V_{LM} \cdot \rho_{LM}} \quad (12)$$

### 4.8.3 Fehlerbetrachtung und Signifikanzanalyse

Direkt gemessene Messwerte unterliegen Messabweichungen. Ist eine Größe nicht direkt messbar, sondern wird aus mehreren messbaren Größen durch eine mathematische Beziehung abgeleitet, werden auch die Fehler über die verwendete Formel übertragen. Es wurde daher eine Fehlerfortpflanzung für errechnete Sekundärgrößen nach Gleichung 13 durchgeführt.

$$y = y(x_1, x_2, \dots) \Rightarrow \Delta y = \frac{\delta y}{\delta x_1} \cdot \Delta x_1 + \frac{\delta y}{\delta x_2} \cdot \Delta x_2 + \dots \quad (13)$$

Wenn nicht anders angegeben, wurden in dieser Arbeit für jede unterschiedliche Versuchsbedingung mindestens drei biologische Replikate ( $n = 3$ ) durchgeführt. Für jedes biologische Replikat wurde ein Mittelwert der technischen Replikate (z. B. mehrfache analytische Messungen derselben „biologischen“ Probe) berechnet. Die verschiedenen Gruppen ( $k$ ) aus den biologischen Replikaten ( $n$ ) einer Versuchsbedingung wurden mittels einfacher Varianzanalyse (one-way ANOVA) auf signifikante Unterschiede gegenüber Gruppen mit abweichenden Versuchsparametern untersucht. Zur Bestimmung von statistisch signifikanten Unterschieden zwischen zwei betrachteten Gruppen ( $k = 2$ ) wurde zusätzlich der Student-T-Test für zwei Stichproben sowohl ohne, als auch mit Welch-Korrektur unter Annahme ungleicher Varianz (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ), angewendet. Die statistische Auswertung wurde mit der Software OriginPro 2019b (OriginLab) durchgeführt.

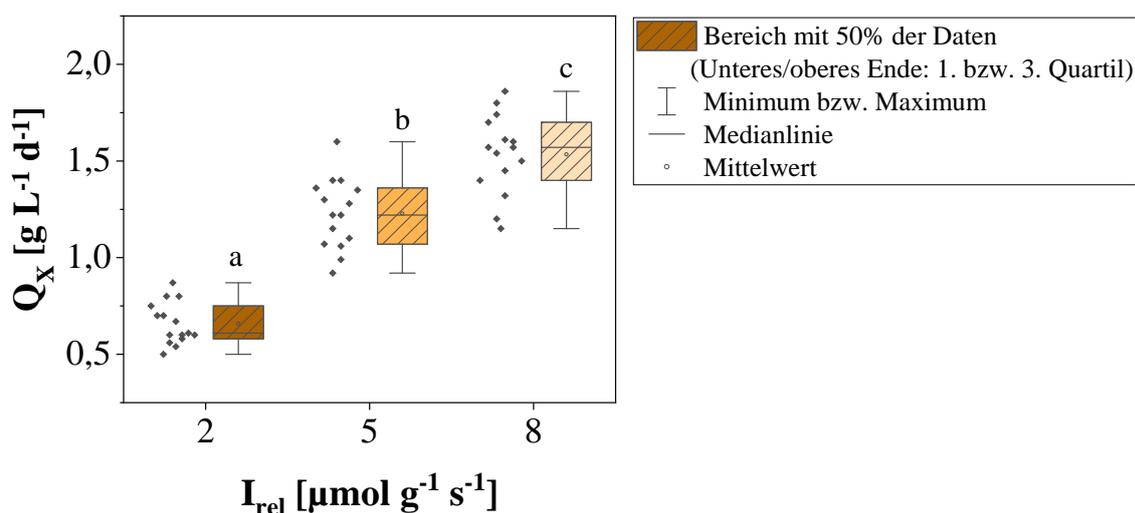


Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung der Verteilung von drei Datenmengen als Box-Plot (Whisker-Plot) mit jeweils  $n = 16$  Datenpunkten. Unterschiedliche Buchstaben über den Boxen zeigen signifikante Unterschiede (T-Test, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) zwischen den Gruppen. Bei gleichen Buchstaben über mehreren Boxen liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Datenmengen vor. Im Beispiel unterscheiden sich alle Gruppen signifikant.

Zur Darstellung und möglichst einfachen Erfassung einer Werte-Verteilung aus mehreren Messerwerten ( $n > 15$ ) in einer Gruppe mit einem bestimmten Merkmal wurden in dieser Arbeit Box-Plots (s.g. Whisker-Plots) nach Abb. 17 verwendet. Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen wurden mittels unterschiedlichen Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

## **4.9 Ökonomische Bewertung der Produktionsszenarien**

Auf Grundlage der experimentell ermittelten Daten zur Kultivierung von *P. tricornutum* im FPA-PBR sowie zur Extraktion und Separation der Wertstoffe Fucoxanthin und EPA erfolgte eine erste ökonomische Bewertung eines möglichen Herstellungsverfahrens (siehe Kap. 5.7). Die hierfür verwendete Methodik zur Abschätzung der Produktionsgesamtkosten für drei verschiedene Produktionsszenarien orientiert sich an der Studie von Acién et al. (2012). In Anlehnung an die Veröffentlichung von Thomassen et al. (2016) zur Produktion von Astaxanthin und  $\beta$ -Carotin mit photoautotrophen Mikroalgen wurde für die Szenarien im Industriemaßstab eine Produktionskapazität von  $170 \text{ t a}^{-1}$  gewählt (Thomassen et al., 2016).

### **4.9.1 Abschätzung der Investitions- und Betriebskosten (CAPEX und OPEX)**

Zur Berechnung der Investitionskosten (engl. „Capital expenditures“, CAPEX) wurden zunächst die Preise der notwendigen Großgeräte (engl. „Major equipment costs, MEC), inklusive der Preise für zugehörigen Peripherie, für die Kultivierung und Aufarbeitung der Biomasse bis hin zu den Endprodukten Fucoxanthin sowie EPA erfasst (siehe hierzu Tab. 29 bis 38, Kap. A2.2). Für alle erfassten Geräte wurden, spezifisch für jedes Produktionsszenario, Angebote von entsprechenden Herstellern eingeholt. Wie auch durch Acién et al. (2012) beschrieben, wurden die zusätzlichen anlagenspezifischen Investitionskosten, wie z.B. Installationskosten für die Geräte und Kosten für die Verrohrung sowie die Abnahme der Elektrik, von den MEC anhand feststehender Faktoren abgeleitet (siehe Anhang, Kap. A2.3 bis A2.5). Die Grundstückspreise für gewerblich genutztes Bauland, sowie Kosten für Strom und Wasser wurden spezifisch für den Standort Deutschland ermittelt.

Für die Berechnung der Betriebskosten (engl. „operational expenditures“, OPEX) wurde der Stromverbrauch der Großgeräte aus den zugehörigen Betriebsanleitungen der Hersteller oder aus Literaturangaben ermittelt (siehe Anhang, Kap. A2.2). Zudem wurden anhand der wesentlichen Massenströme die notwendigen Chemikalien und Verbrauchsmaterialien, z.B. für Nährmedien, zur Reinigung der Reaktoren oder zur Extraktion der Wertstoffe, erfasst. Die Preise wurden zuvor eingeholten Angeboten von entsprechenden potentiellen Lieferanten entnommen.

Aus CAPEX und OPEX wurden für eine Laufzeit der jeweiligen Anlage von 20 Jahren, die Produktionskosten für die Endprodukte Fucoxanthin und EPA sowie die Kosten zur Verarbeitung von jeweils einem Kilogramm *P. tricornutum* Biotrockenmasse ermittelt. Eine Zusammenfassung der für die ökonomische Bewertung getroffenen Annahmen und Vereinfachungen findet sich nachfolgend in Kap. 4.9.2.

### **4.9.2 Wesentliche Annahmen und Vereinfachungen**

Für die ökonomische Bewertung aller Szenarien wurden, ausgehend vom neuentwickelten Verfahren (siehe Kap. 5.7) folgende Annahmen bzw. Vereinfachungen getroffen:

- Die Kultivierung erfolgt in Modulen von jeweils fünf FPA-PBR mit gleichem Volumen, welche miteinander über sog. Multi-Downcomer verbunden sind (Laug, 2014). Diese werden über die Peripherie (z.B. Drucksensor, pH-Sonde und Temperaturfühler) eines Hauptreaktors gesteuert. Dieses Konzept wurde bereits am Fraunhofer IGB, Stuttgart, sowie am Fraunhofer CBP, Leuna, getestet und patentiert (Laug, 2014; Brinitzer, 2019).
- Die Sterilisation des Nährmediums erfolgt in allen Szenarien nicht wie im Labor durch Autoklavieren bzw. Hitzesterilisation sondern durch Sterilfiltration, wie es in größeren Anlagen zur Mikroalgenkultivierung auf Basis geschlossener Photobioreaktoren klassischerweise der Fall ist (Brinitzer, 2019).
- Es existiert nach Kenntnisstand des Autors bisher keine PLE zur Extraktion von Mikroalgen im Pilot- oder Industriemaßstab. Es wird daher von einer Skalierbarkeit der subkritischen Fest-Flüssig-Extraktion anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten, sowie einer synergetischen Nutzung des Druckes als treibende Kraft für die nachfolgenden beiden Filtrationsstufen, wie in Kap. 4.5.3 beschrieben, ausgegangen. Ferner wird, wie in Kap. 5.5.5 vorgeschlagen, ein zusätzlicher Reaktionsbehälter zum Vorheizen des Lösungsmittels und damit zur Verringerung der Kontaktzeit zwischen Lösungsmittel und Biomasse vorgesehen. Folglich wird durch die Entkopplung der Temperierung des Lösungsmittels im separaten Reaktor vom Extraktionsschritt auch die täglich prozessierbare Biomassemenge in einer entsprechenden Anlage erhöht.
- Es wird in Anlehnung an Thomassen et al. (2016) von einer Rezyklierung des zur Extraktion verwendeten Lösungsmittels unter Berücksichtigung von technisch bedingten Verlusten während der Destillation ausgegangen (Thomassen et al., 2016).

- In allen Produktionsszenarien wird abweichend von der in den durchgeführten Experimenten verwendeten Gefriertrocknung eine Sprühtrocknung der Mikroalgenbiomasse betrachtet.
- Die zur Kultivierung der Mikroalgen (USP, „Upstream Processing“) notwendige Grundfläche wurde anhand der Stellflächen der Kühlbecken der FPA-PBR berechnet. Zwischen den aneinandergereihten Kühlbecken einzelner Module, bestehend aus fünf FPA-PBR, wurde ein Abstand von 1,50 m angenommen. Die benötigten Stellflächen für die Aufarbeitung der Biomasse (DSP, „Downstream Processing“) wurden anhand der Angaben der Gerätehersteller einberechnet und verdoppelt, um einen geeigneten Abstand zwischen den Geräten zu gewährleisten. Die Gesamtfläche der jeweiligen Anlage ist die Summe aus den Flächen für USP und DSP.
- Die Anzahl benötigter Arbeitskräfte für die Kultivierung der Mikroalgenbiomasse wurde anhand der produzierten Trockenbiomasse berechnet. Als Grundlage für die getroffenen Annahmen dienten persönliche Informationen und Angaben aus der Algenproduktionsanlage in Klötze, Sachsen-Anhalt ([www.algomed.de](http://www.algomed.de), Brinitzer 2019). Es wurde angenommen, dass sieben Mitarbeiter zur Produktion von  $80 \text{ t a}^{-1}$  getrockneter Mikroalgenbiomasse benötigt werden. Die Berechnung der benötigten Arbeitskräfte im Bereich des DSP erfolgte nach den Tabellen aus der Veröffentlichung von Peters und Timmerhaus (1991) für das Anlagendesign chemischer Prozesse, welche die benötigten Arbeitskräfte pro Schicht nach den jeweils zu bedienenden Geräten auflistet (Peters und Timmerhaus, 1991). Das Bruttogehalt einer Arbeitskraft wurde auf 36.000 €pro Jahr festgelegt.
- Die Berechnung der Investitions- und Betriebskosten (CAPEX und OPEX) erfolgte anhand der Methode von Acién et al. (2012). Entsprechende Daten zur Ermittlung der Steuerabgaben (Grund-, Umsatz und Gewerbesteuer) wurden übernommen (Acién et al., 2012). Eine exakte Anpassung an die Steuergesetzgebung des Standortes Deutschland ist daher nicht erfolgt.
- Der Kühlwasserbedarf für die Kühlbecken der FPA-PBR wurde anhand einer Laboranlage ermittelt und für größere Produktionsanlagen auf Basis äquivalenter Kühlbecken berechnet. Ob der Kühlwasserbedarf und der damit verbundene Stromverbrauch einschließlich der entstehenden Kosten auf eine industrielle Produktionsanlage übertragbar ist, muss noch evaluiert werden. Diese Evaluation erfolgt innerhalb des vom BMEL geförderten Projektes „Ökonomische und ökologische Bewertung eines Bioraffinerieansatzes zur Produktion von Fucoxanthin und EPA im Pilotmaßstab und transdisziplinär entwickelter Szenarien im

Industriemaßstab in Deutschland“ im Anschluss an die vorliegende Arbeit. Ebenfalls wurde der Kühlwasserbedarf der Geräte im DSP in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Die Berechnung des Energiebedarfs und der verbundenen Kosten der Klimatisierung des jeweiligen Gewächshauses basiert auf der Veröffentlichung von Vadiée und Martin (2013) (Vadiée und Martin, 2013).

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden alle Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt und diskutiert. Kap. 5.1 umfasst dabei Untersuchungen verschiedener potentieller Fucoxanthin- und EPA-Produktionsstämme unter definierten Kultivierungsbedingungen hinsichtlich ihrer spezifischen Wachstumsrate, dem biomassespezifischen Wertstoffgehalt und deren prinzipieller Kultivierbarkeit im Flachplatten-Airlift-Photobioreaktor-System (FPA-PBR).

In Kap. 5.2 werden nachfolgend Ergebnisse zur Optimierung der Stickstoff- und Eisenkonzentration im Nährmedium sowie dem Einfluss der relativen Lichtverfügbarkeit auf die biomassespezifische Wertstoffzusammensetzung für den zuvor ausgewählten Stamm *P. tricornutum* UTEX 640 im Schüttelkolbenmaßstab vorgestellt. Darauf aufbauend umfasst Kap. 5.3 Versuche zur gezielten Langzeit-Photoakklimatisation des Stammes im FPA-PBR. Dabei wird insbesondere der Einfluss der relativen Lichtverfügbarkeit auf wesentliche Prozessparameter wie die volumetrische Produktivität, die Lichtausbeute sowie den biomassespezifischen Wertstoffgehalt hinsichtlich der Zielkomponenten Fucoxanthin und EPA diskutiert.

Die in Kap. 5.4 dargestellten Untersuchungen beschäftigen sich mit der Fest-Flüssig-Extraktion beider lipophilen Substanzen aus *P. tricornutum* Biomasse mittels subkritischer Hochdruckflüssigextraktion. Hierbei war es das Ziel, Extrakte mit einer möglichst hohen Produktausbeute und eines möglichst hohen Massenanteils beider Substanzen zu erzeugen. Auf Basis dieser Ergebnisse wird in Kap. 5.5 eine neuartige synergetische Methode zur Trennung beider Substanzen aus lipophilen Extrakten mittels Fällung und Filtration vorgestellt.

Die funktionalen Eigenschaften der lipophilen Extrakte und des aufgereinigten Fucoxanthinpulvers werden nachfolgend in Kap. 5.6 evaluiert. Im Fokus stehen dabei die anti-oxidativen Eigenschaften. Es werden aber auch Ergebnisse weiterführender ernährungsphysiologischer Untersuchungen aus in-vitro und in-vivo Experimenten vorgestellt.

Kap. 5.7 umfasst schließlich einen Vorschlag für ein Herstellungsverfahren für Fucoxanthin- und EPA basierend auf den zuvor gewonnenen Erkenntnissen und eine Bewertung des entwickelten Verfahrens unter ökonomischen Gesichtspunkten. Durch Ermittlung von Massen- und Energieeinträgen erfolgte hierbei eine Abschätzung der wesentlichen Investitions- und Betriebskosten für Szenarien im Pilot- und Industriemaßstab.

## 5.1 Vergleich potentieller Produktionsstämme

Die wenigen in der Literatur verfügbaren Angaben zum Fucoxanthingehalt spezifischer Mikroalgen variieren deutlich und sind – wie auch der EPA-Gehalt – sehr stark abhängig von den jeweiligen Kultivierungsbedingungen (u.a. von dem Reaktorkonzept, den Lichtverhältnissen im System und der Stickstoff- und Phosphatkonzentration) sowie dem jeweiligen Stamm bzw. Isolat. Es wurden daher im Rahmen eines Screenings fünf Fucoxanthin- und EPA-bildende Mikroalgen zur Auswahl eines Produktionsstammes in einem Membran-Photobioreaktor (MBR) unter definierten Bedingungen verglichen. Der Fokus lag dabei auf der spezifischen Wachstumsrate sowie dem biomassespezifischen Wertstoffgehalt der Stämme. Es erfolgte zudem ein Transfer aller fünf Stämme in den Flachplatten-Airlift-Photobioreaktor (FPA-PBR), um die generelle praktische Eignung der Stämme für dieses industriell genutzte Photobioreaktorsystem, insbesondere im Hinblick auf die im System vorliegenden Strömungseigenschaften und damit verbundene mechanische Beanspruchung der Zellen, zu evaluieren. Hierfür standen im Rahmen dieser Arbeit drei verschiedene Isolate der pennaten Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) zur Verfügung. Als Vergleich wurde zudem mit *Cyclindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae) und *Isochrysis sp.* eine weitere Diatomee, sowie ein Vertreter der Haptophyta (Prymnesiophyceae) herangezogen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Vertreter beider Gattungen einen sehr hohen Fucoxanthingehalt von 18,2 bis 25,5 mg g<sup>-1</sup> sowie hohe Anteile mehrfach-ungesättigter Fettsäuren wie EPA und DHA aufweisen können (Kim et al., 2012b; Gladyshev et al., 2013; Qiao et al., 2016; H. Wang et al., 2018).

### 5.1.1 Spezifische Wachstumsrate und volumetrische Biomasseproduktivität

Zum Vergleich der ausgewählten Stämme wurden diese zunächst im MBR kultiviert (siehe Kap. 4.3.1) und die spezifische Wachstumsrate  $\mu_x$  nach Gleichung 2 auf Basis photometrischer Daten berechnet (Abb. 18 A). Anschließend erfolgte der Transfer der Stämme in den FPA-PBR und ein Vergleich der jeweils im Reaktor erzielten volumetrischen Produktivität (Abb. 18 B). Aufgrund der Verfügbarkeit von ausreichend Probenmaterial, wurde für den FPA-PBR eine tägliche gravimetrische Biotrockenmassebestimmung durchgeführt (Kap. 4.6.1).

Die untersuchten Stämme zeigten im MBR spezifische Wachstumsraten im Bereich von  $\mu_x = 0,24$  bis  $0,31 \text{ d}^{-1}$ . Diese Werte korrelieren mit bisherigen für Diatomeen publizierten Daten, liegen jedoch niedriger als die Wachstumsraten verschiedener Grünalgen (Krzemińska et al., 2014; Sahin et al., 2019). Es war somit prinzipiell möglich, alle Stämme im MBR zu kultivieren. Der Transfer der Stämme in den FPA-PBR zeigte, dass sich in der Praxis jedoch

nicht alle Stämme, trotz gleichbleibender Kultivierungsbedingungen (Kulturmedium, pH-Wert, Temperatur und Substratkonzentrationen) wie im MBR, für die Kultivierung im FPA-PBR eignen.

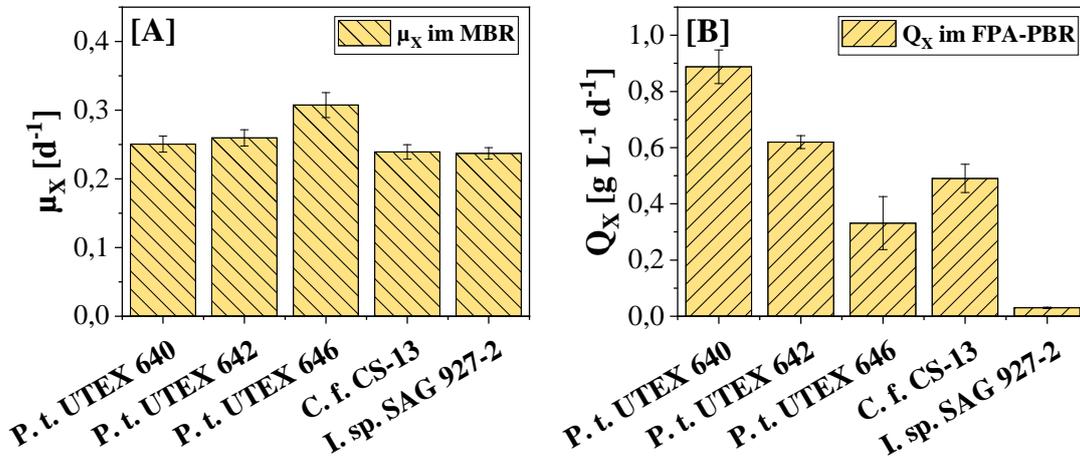


Abbildung 18: [A] Spezifische Wachstumsrate  $\mu_x$  der ausgewählten Stämme im Cell-DEG-Membranphotobioreaktor (MBR) und [B] volumetrische Produktivität  $Q_x$  im Flachplatten-Airlift-Photobioreaktor (FPA-PBR) über einen Prozesszeitraum von 120 h. Kultiviert wurde jeweils im Satz-Betrieb analog der Kap. 4.3.1 (Abb. A) und Kap. 4.4.2 (Abb. B).

Die ermittelte volumetrische Produktivität der Stämme im FPA-PBR variierte sehr stark (Abb. 18 B). Eine denkbare Ursache könnten die Strömungsverhältnisse und damit verbunden eine mechanische Beanspruchung der Zellen, wie z.B. einwirkende Scherkräfte, darstellen. Scherkräfte können bei Mikroalgen zu einer erhöhten Zellmortalität, einer verringerten Wachstumsrate sowie Zellviabilität bzw. Zellyse führen (Wang und Lan, 2018). Scherkräfte entstehen im FPA-PBR insbesondere am Gaseinlass der Membran und als platzende Luftblasen im Kopfraum des Reaktors. Sie sind somit abhängig von der verwendeten Begasungsrate. Für den hier gezeigten Vergleich wurde der FPA-PBR bereits mit einer für das System eher niedrigen Begasungsrate von 0,33 vvm bzw.  $180 \text{ L h}^{-1}$  betrieben (Meiser et al., 2004; Schmid-Staiger et al., 2009).

Prinzipiell ist es möglich, das System auch mit noch niedrigeren Begasungsraten zu betreiben, was sich jedoch im Hinblick auf eine effiziente Lichtversorgung bzw. Durchmischung der Mikroalgen insbesondere bei hohen Zelldichten negativ auswirkt. Eine niedrigere Begasungsrate wirkt dem grundlegenden Vorteil des Systems gegenüber klassischen Flachplatten-Reaktoren, in Form eines schnellen gerichteten Transportes der Zellen von der lichtzugewandten Reaktorseite zur lichtabgewandten Seite des Reaktors durch die mittels integrierten statischen Mischer erzeugte Walzenströmung, entgegen.

Während die *P. tricornutum*-Stämme die dargebotene mechanische Scherbeanspruchung offenbar tolerieren, zeigte insbesondere *Isochrysis sp.* im FPA-PBR im Gegensatz zum MBR nahezu kein Wachstum (vgl. Abb. 18 A und B). Bereits Michels et al. (2016) stellte in ihren Untersuchungen mit *Isochrysis galbana* in einem Röhrenreaktor fest, dass sich diese verglichen mit anderen Mikroalgenpezies sehr empfindlich gegenüber Scherkräften verhält, wie sie z.B. durch Pumpen verursacht werden, und sich der Stamm daher nur sehr bedingt zur Kultivierung in geschlossenen PBR eignet (Michels et al., 2016).

Die höchste volumetrische Biomasseproduktivität im FPA-PBR mit  $Q_x = 0,89 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  zeigte der Stamm *P. tricornutum* UTEX 640, welche damit deutlich höher als die der anderen beiden *Phaeodactylum*-Stämme UTEX 642 und UTEX 646 lag.

### 5.1.2 Biomassespezifischer Fucoxanthingehalt

Ausgehend von der im vorherigen Kapitel beschriebenen Kultivierung im MBR, in welchen alle untersuchten Stämme eine für Diatomeen typische spezifische Wachstumsrate zeigten, wurde der biomassespezifische Fucoxanthingehalt nach einer Wachstumsphase von 120 h im MBR bestimmt (S. Wang et al., 2018).

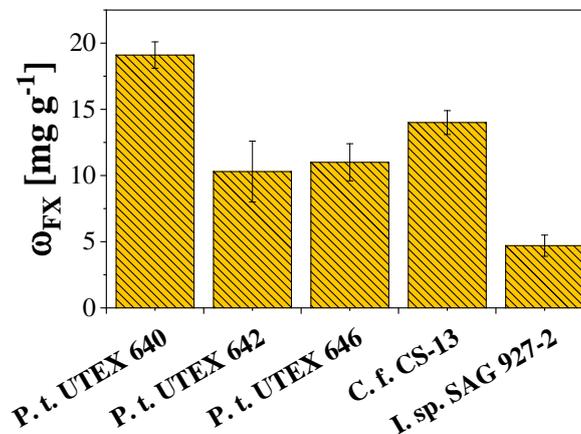


Abbildung 19: Biomassespezifischer Fucoxanthingehalt  $\omega_{FX}$  der untersuchten Stämme im Cell-DEG Membranbioreaktor nach einer Kultivierungsdauer von 120 h (Wachstumsphase) bei einer konstanten Photonenflussdichte von  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  im Satzbetrieb analog der in Kap. 4.3.1 beschriebenen Methode.

Der ermittelte biomassespezifische Fucoxanthingehalt (siehe Abb. 19) für die Stämme *P. tricornutum* UTEX 642 und 646 stehen mit  $10,3 \pm 2,3 \text{ mg g}^{-1}$  bzw.  $11,0 \pm 1,4 \text{ mg g}^{-1}$  im Einklang mit den durch Guo et al. (2016) für den Stamm UTEX 646 veröffentlichten Fucoxanthingehalt von etwa 1 %<sub>w/w</sub> bzw. umgerechnet etwa  $10 \text{ mg g}^{-1}$  (Guo et al., 2016). Gou et al. (2016) kultivierten dabei verschiedene Diatomeen in Schüttelkolben bei einer

Photonenflussdichte von  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die hier gezeigten Daten für beide Stämme korrelieren ebenfalls sehr gut mit dem durch Petrushkina et al. (2017) für den Stamm UTEX 642 publizierten Fucoxanthingehalt von  $10,2 \pm 0,6 \text{ mg g}^{-1}$  (Petrushkina et al., 2017). Auffällig ist hingegen der mit  $19,1 \pm 1,0 \text{ mg g}^{-1}$  höhere Fucoxanthingehalt der Biomasse von *P. tricornutum* UTEX 640 gegenüber den beiden zuvor genannten *P. tricornutum*-Stämmen aber auch gegenüber *Isochrysis sp.* ( $4,7 \pm 0,8 \text{ mg g}^{-1}$ ) und *C. fusiformis* CS-13 ( $14,0 \pm 0,9 \text{ mg g}^{-1}$ ). Der Gehalt liegt deutlich über den bisher einzigen für den Stamm UTEX 640 von Reboloso-Fuentes et al. (2001) veröffentlichten Daten von lediglich  $1,81 \text{ mg g}^{-1}$  (Reboloso-Fuentes et al., 2001). Insgesamt liegt der Gehalt jedoch deutlich unterhalb des bisher für die Spezies *P. tricornutum* veröffentlichten maximalen biomassespezifischen Fucoxanthingehaltes von  $57,4 \pm 14,4 \text{ mg g}^{-1}$  (McClure et al., 2018). McClure et al. (2018) verwendeten dabei den Wildtyp-Stamm *P. tricornutum* CS-29 in einem Flachplatten-PBR. Wie bereits zuvor erwähnt, ist ein direkter Vergleich der biomassespezifischen Fucoxanthingehalte mit der Literatur generell nur mit Einschränkungen möglich, da in den genannten Publikationen meist unterschiedliche Reaktorsysteme und sehr unterschiedliche Kultivierungsbedingungen verwendet wurden oder entscheidende Daten zur Kultivierung der Mikroalgen sowie Angaben zum jeweils verwendeten Mikroalgenstamm fehlen. Der Fucoxanthingehalt wiederum ist sehr stark abhängig von den verwendeten Kultivierungsbedingungen (Gómez-Loredo et al., 2016; McClure et al., 2018). Eine detaillierte Übersicht zum Fucoxanthingehalt verschiedener Mikroalgenstämme in unterschiedlichen Photobioreaktoren findet sich nachfolgend in Kap. 5.3.2.

### 5.1.3 Fettsäureprofil und biomassespezifischer EPA-Gehalt

Tab. 10 zeigt das Fettsäureprofil der untersuchten Stämme während der Kultivierung im FPA-PBR (Satzbetrieb, siehe Abb. 18 B). Zu erkennen ist, dass sich das Profil der *P. tricornutum* Stämme in der gezeigten Wachstumsphase nur punktuell unterscheidet. Es konnte zudem kein signifikanter Unterschied im biomassespezifischen EPA-Gehalt festgestellt werden. Der EPA-Gehalt ( $\omega_{\text{EPA}}$ ) aller drei Stämme lag etwas über  $4 \text{ \%}_{\text{w/w}}$  und damit höher als der von *C. fusiformis*. Auch der biomassespezifische Gesamtfettsäuregehalt der *P. tricornutum* Stämme variierte nur geringfügig im Bereich von  $11,4$  bis  $13,8 \text{ \%}_{\text{w/w}}$ . Die Unterschiede sind im Wesentlichen auf die jeweils enthaltene Menge an Palmitoleinsäure (C16:1) zurückzuführen, welche neben EPA und Palmitinsäure (C16:0), die in *P. tricornutum* überwiegende Fettsäure darstellt. Wie aus Tab. 10 ersichtlich ist, konnte, anders als es beispielsweise von Molina Grima et al. (1992) für *Isochrysis galbana* berichtet wurde, für die Mikroalge *Isochrysis sp.* kein EPA im Fettsäureprofil nachgewiesen werden (Molina Grima et al., 1992). Die gezeigten Ergebnisse stehen jedoch im Einklang mit den Daten von Custódio et al. (2014) und Liu et al. (2013). In

beiden zuvor genannten Studien zu *I. galbana* lag ebenfalls wenig bzw. kein EPA im Fettsäureprofil der Mikroalge vor (Custódio et al., 2014; Liu et al., 2013).

Aus Tab. 10 wird ebenfalls deutlich, dass der hier untersuchte Stamm *Isochrysis sp.* über 5 %<sub>w/w</sub> Docosahexaensäure (DHA) enthält. Dies stimmt mit Literaturdaten überein (Liu et al., 2013). Aufgrund des schlechten Wachstums von *Isochrysis sp.* im FPA-PBR (siehe hierzu Kap. 5.1.1, Abb. 18 B) ist das gezeigte Profil jedoch kritisch zu hinterfragen. Insbesondere der hohe Anteil an ungesättigten Fettsäuren kann hier auf eine etwaige Substratlimitierung und damit eine Kohlenstoffakkumulation in Form von Triacylglyceriden hindeuten.

Tabelle 10: Fettsäurezusammensetzung (%<sub>w/w</sub> bezogen auf die Biotrockenmasse) der untersuchten Mikroalgenstämme.

Fettsäure	<i>UTEX 640</i>	<i>UTEX 642</i>	<i>UTEX 646</i>	<i>CS-13</i>	<i>I. sp.</i>
<b>C14:0</b>	0,59 ± 0,06	0,79 ± 0,09	1,07 ± 0,06	1,67 ± 0,19	4,89 ± 0,26
<b>C14:1</b>	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,04	0,10 ± 0,02	n.d.
<b>C15:1</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>C16:0</b>	2,37 ± 0,16	2,24 ± 0,39	2,57 ± 0,35	4,52 ± 0,90	3,62 ± 0,17
<b>C16:1</b>	3,18 ± 0,04	3,43 ± 0,39	4,45 ± 0,28	5,86 ± 0,84	1,98 ± 0,13
<b>C16:3</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>C18:0</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>C18:1n9</b>	0,20 ± 0,03	0,23 ± 0,06	0,38 ± 0,05	0,45 ± 0,11	3,22 ± 0,63
<b>C18:2n6</b>	0,17 ± 0,01	0,32 ± 0,07	0,17 ± 0,04	0,14 ± 0,06	2,08 ± 0,14
<b>C18:3n3</b>	n.d.	0,07 ± 0,04	n.d.	n.d.	2,55 ± 0,18
<b>C18:3n6</b>	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,32 ± 0,05	n.d.
<b>C20:3n3</b>	0,31 ± 0,04	0,35 ± 0,06	0,08 ± 0,08	1,84 ± 0,31	n.d.
<b>C20:5n3 (EPA)</b>	<b>4,28 ± 0,07</b>	<b>4,25 ± 0,39</b>	<b>4,45 ± 0,23</b>	<b>2,19 ± 0,40</b>	<b>n.d.</b>
<b>C22:6n3 (DHA)</b>	n.d.	0,29 ± 0,04	0,32 ± 0,03	n.d.	5,64 ± 0,51
<b>C24</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>ΣGesamt</b>	<b>11,37 ± 0,36</b>	<b>12,26 ± 1,17</b>	<b>13,77 ± 0,61</b>	<b>17,23 ± 2,18</b>	<b>23,98 ± 1,89</b>

n.d. = nicht detekierbar (unterhalb der Bestimmungsgrenze)

## 5.2 Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf den Wertstoffgehalt von *P. tricornutum*

Über den Einfluss von Kultivierungsparametern auf den EPA- und Fucoxanthingehalt in Diatomeen ist bisher relativ wenig bekannt (McClure et al., 2018). In aktuellen Publikationen wird jedoch vom Einfluss verschiedener Nährmedienbestandteile auf die makromolekulare Zusammensetzung sowie auf die Biomasseproduktivität von *P. tricornutum* berichtet (McClure et al., 2018; Qiao et al., 2016). Wesentliche Einflussfaktoren in Bezug auf die Bildung von Fucoxanthin und EPA stellen dabei, neben der zur Kultivierung verwendeten Lichtintensität,

die Konzentration der verfügbaren Eisenquelle und der Stickstoffquelle ( $\text{NO}_3^-$  bzw.  $\text{NH}_4^+$ ) im Nährmedium dar (Guo et al., 2016; McClure et al., 2018). Auch im Hinblick auf die volumetrische Biomasseproduktivität kann sich sowohl eine zu niedrige als auch zu hohe Nährstoffkonzentration dieser Komponenten inhibierend auf das Wachstum auswirken.

Es wurden daher im Rahmen dieser Arbeit Vorversuche mit *P. tricornutum* UTEX 640 im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt und die Eisencitratkonzentration sowie die Ammonium- und Nitratkonzentration im Flüssigmedium variiert, um nachfolgend eine möglichst optimale Konzentration der Nährstoffe im Reaktormaßstab gewährleisten zu können. Eine mögliche Reduktion der Medienbestandteile ist zudem auch unter ökonomischen Gesichtspunkten von Interesse.

### 5.2.1 Einfluss der $\text{NH}_4^+$ -, $\text{NO}_3^-$ - und Eisenkonzentration

Wie in Abb. 20 A dargestellt, zeigt eine  $\text{NO}_3^-$ -Konzentration im Nährmedium ab  $2 \text{ g L}^{-1}$  einen negativen Einfluss auf die spez. Wachstumsrate von *P. tricornutum* UTEX 640. Für  $\text{NH}_4^+$  hingegen zeigten bereits Konzentrationen über  $500 \text{ mg L}^{-1}$  eine vollständige Inhibierung des Wachstums. Vergleicht man für beide Substrate den im Nährmedium vorliegenden elementaren Stickstoff, so ist in beiden Fällen ab einem Stickstoffgehalt im Bereich von  $411 \text{ mg L}^{-1}$  (für  $500 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ ) und  $452 \text{ mg L}^{-1}$  (für  $2 \text{ g L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ) eine deutliche Reduktion der spezifischen Wachstumsrate  $\mu_X$  festzustellen. Insgesamt lag  $\mu_X$  bei niedrigeren Stickstoffkonzentrationen mit  $\text{NO}_3^-$  etwas höher als bei  $\text{NH}_4^+$ , obwohl Ammonium aus energetischer Sicht das für Mikroalgen einfachere zu verwertende Substrat darstellt (Sanz-Luque et al., 2015; Glibert et al., 2016). Nitrat muss metabolisch zunächst über Stickstoffdioxid zu Ammonium reduziert werden, wofür zusätzlich zwei Äquivalente  $\text{NADPH}^+$  benötigt werden (Glibert et al., 2016). Diese Energie muss in der Lichtreaktion gewonnen werden. Im Bereich einer niedrigen Biomassekonzentration, wie es bei den vorliegenden Versuchen im Schüttelkolben der Fall war (hier etwa  $0,15$  bis max.  $0,55 \text{ g L}^{-1}$ ) und einer damit hohen Lichtverfügbarkeit, scheint dieser Umstand die Wachstumsrate zunächst nicht zu mindern. Denkbar wäre jedoch, dass sich dieser zusätzliche Energieaufwand im Fall einer höheren Biomassekonzentration, wie z.B. bei einer Kultivierung im FPA-PBR, sowie einer folglich schlechteren Lichtverteilung negativ auswirkt und für die Algen schwerer zu kompensieren ist.

Aus technischer Sicht spricht für die Verwendung von  $\text{NH}_4^+$  als Stickstoffquelle in einem Prozess im FPA-PBR zudem die Möglichkeit, über Ammonium und die Zugabe von  $\text{CO}_2$  den pH-Wert im Reaktor zu regeln und damit einhergehend die Möglichkeit, Ernte und Fütterungs-

zyklen über bereits etablierte Steuerungskonzepte weitestgehend zu automatisieren (Münkel et al., 2013).

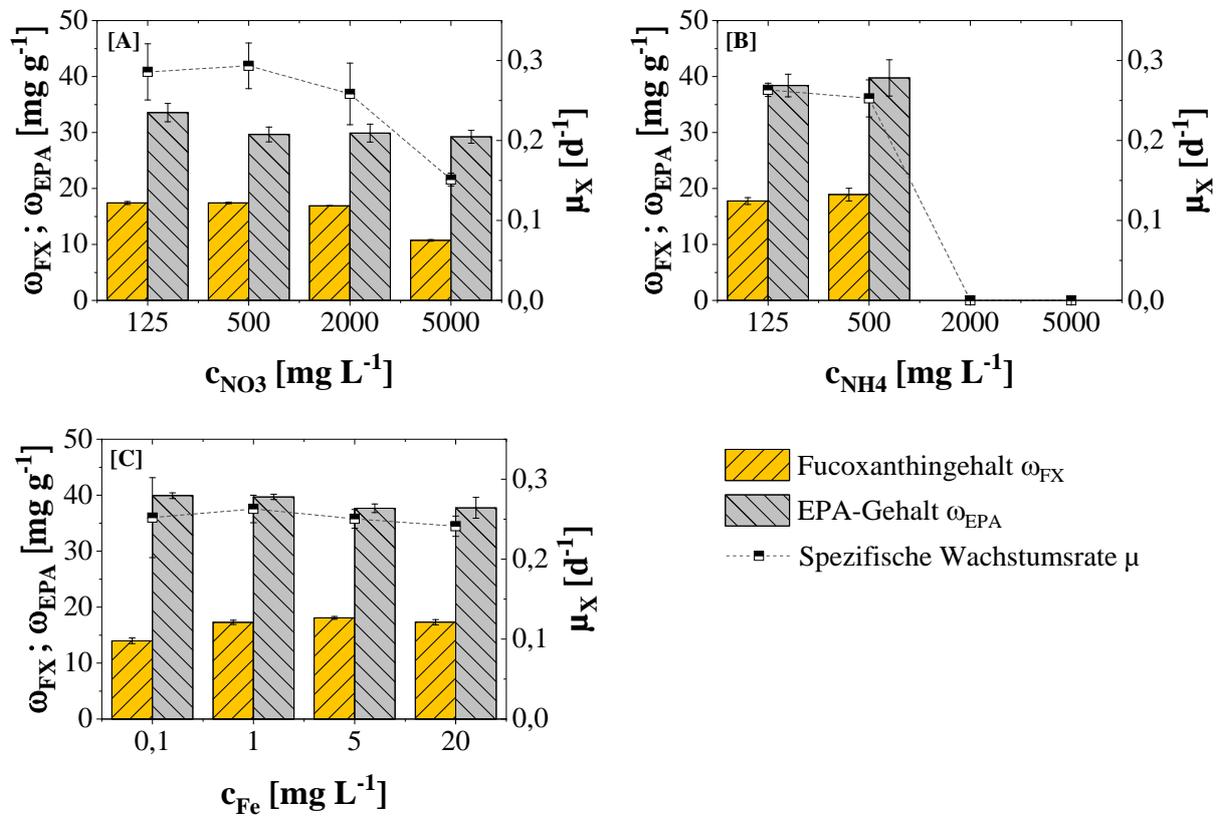


Abbildung 20: Vergleich der spezifischen Wachstumsrate  $\mu_x$  und des biomassespezifischen Fucoxanthin- und EPA-Gehaltes  $\omega_{FX/EPA}$  von *P. tricornutum* im Schüttelkolben bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Variiert wurde jeweils der Nitratgehalt im Medium [A], der Ammoniumgehalt [B] als auch die Eisenkonzentration [C]. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 96 h nach Kap. 4.3.2.

Anders als durch McClure et al. (2018) beobachtet, führte eine Erhöhung des Stickstoffgehaltes in den Versuchen für beide Substrate nicht zu einer Erhöhung des biomassespezifischen Fucoxanthingehaltes (McClure et al., 2018). Wie in Abb. 20 A zu erkennen bewegt sich der Fucoxanthingehalt der Biomasse, sofern keine grundlegende Inhibition des Wachstums vorliegt bis zu einer Nitrat-Konzentration von  $2\ g\ L^{-1}$  im Bereich von  $16,9$  bis  $17,4\ mg\ g^{-1}$ . Insgesamt zeigte *P. tricornutum* mit Ammonium als Stickstoffquelle gegenüber Nitrat einen leicht erhöhten Fucoxanthingehalt mit einem Maximum bei  $18,92 \pm 1,1\ mg\ g^{-1}$ . Die ermittelten Werte stehen insgesamt im Einklang mit dem im MBR für *P. tricornutum* UTEX 640 ermittelten Fucoxanthingehalt (Kap. 5.1.2) und auch mit bisherigen Publikationen (Kim et al., 2012a).

Auch eine Variation der Eisenkonzentration im Nährmedium (Abb. 20 C), als wichtiger Co-Faktor u.a. im Silikatstoffwechsel, der Chlorophyllbiosynthese und Stickstoffassimilation von Diatomeen, im Bereich von  $1$  bis  $20\ mg\ L^{-1}$  führte zu keiner signifikanten Änderung des

Fucoxanthingehaltes oder der spezifischen Wachstumsrate (Greene et al., 1992; Zhao et al., 2017). Eine Eisenlimitierung der Zellen sollte generell im Hinblick auf die möglichen negativen Auswirkungen auf die Photosyntheseeffizienz sowie eine mögliche Reduktion des zellulären Pigmentgehaltes vermieden werden (Greene et al., 1992). In den hier gezeigten Untersuchungen resultierte lediglich eine sehr geringe Eisenkonzentration von  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  in einer signifikanten Reduktion gegenüber höheren Eisenkonzentrationen. Es erscheint somit im Hinblick auf einen späteren Produktionsprozess sinnvoll, eine Konzentration  $\geq 1 \text{ mg L}^{-1}$  im Medium zu gewährleisten, wengleich Diatomeen wie *P. tricornutum* dafür bekannt sind, äußerst tolerant gegenüber geringen Eisenkonzentrationen zu sein und somit auch in der Lage sind, Phasen mit einer Eisenlimitierung zu überdauern (Allen et al., 2008).

Im Hinblick auf den biomassespezifischen EPA-Gehalt wirkt sich Ammonium als Substrat gegenüber Nitrat vorteilhaft auf den Produktgehalt aus. So lag der EPA-Gehalt mit Ammonium ( $125 \text{ mg L}^{-1}$ ) mit  $39,8 \pm 3,3 \text{ mg g}^{-1}$  etwa 20 % über dem Maximalwert mit Nitrat ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ). Die untersuchten Eisen-Konzentrationen führten zu keiner Änderung des biomassespezifischen EPA-Gehaltes, anders als es z.B. Sahin et al. (2019) für die Diatomeen *Nitzschia sp.* und *Nanofrustulum shiloi* beobachteten (Sahin et al., 2019). Sahin et al. stellten in beiden Fällen einen Anstieg des Gesamtlipidgehaltes und des EPA-Gehaltes als Reaktion auf eine Erhöhung des Eisengehaltes im Nährmedium (BG-11) fest.

Unter Abwägung der Gesamtheit der Ergebnisse scheint Ammonium die für den angedachten Prozess geeignetere Stickstoffquelle darzustellen. Wengleich die maximale spezifische Wachstumsrate von *P. tricornutum* in den durchgeführten Versuchen auf Nitrat etwas höher lag, so war sowohl der biomassespezifische Fucoxanthingehalt als auch der EPA-Gehalt in der Biomasse signifikant erhöht. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass eine Erhöhung der Eisenkonzentration auf über  $1 \text{ mg L}^{-1}$  zu keiner wesentlichen Steigerung des biomassespezifischen Wertstoffgehaltes im Hinblick auf EPA- und Fucoxanthin führt.

### 5.2.2 Einfluss der relativen Lichtverfügbarkeit

Abb. 21 zeigt den Einfluss der relativen Lichtverfügbarkeit  $I_{\text{rel}}$  auf den spezifischen EPA- und Fucoxanthingehalt. Es ist zu erkennen, dass der Fucoxanthingehalt mit steigender relativer Lichtverfügbarkeit sinkt. So reduzierte sich der Gehalt ausgehend von  $18,5 \pm 0,4 \text{ mg g}^{-1}$  bei  $I_{\text{rel}} = 2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$  um etwa 20 % auf  $14,7 \pm 0,7 \text{ mg g}^{-1}$  bei  $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Auch die ermittelten spezifischen Wachstumsraten sinken deutlich bei reduzierter  $I_{\text{rel}}$ , es scheint somit eine zunehmende Substrat-Limitierung vorzuliegen. Die Ergebnisse legen nahe, dass *P. tricornutum* unter starker Lichtlimitierung im Rahmen einer Photoakklimatisation zusätzliches Fucoxanthin

synthetisiert, um mehr Photonen aufnehmen zu können bzw. die Photosyntheseleistung zu steigern. Bereits Nymark et al. (2009) berichten von einer Änderung des Pigmentgehaltes von *P. tricornutum* CCMP632-Zellen als Reaktion auf eine Reduktion der zur Verfügung gestellten PFD von 500 auf  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  über einen Zeitraum von 48 h (Nymark et al., 2009). Zudem zeigten Chandrasekaran et al. (2014) in ihrer Studie mit der Diatomee *Skeletonema marinoi* eine Erhöhung sowohl des Fucoxanthingehalts als auch des Chlorophyllgehalts bei einer niedrigeren PFD  $< 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Chandrasekaran et al., 2014). Entsprechende Beobachtungen besitzen offenbar auch für den vorliegenden Stamm *P. tricornutum* UTEX 640 Gültigkeit.

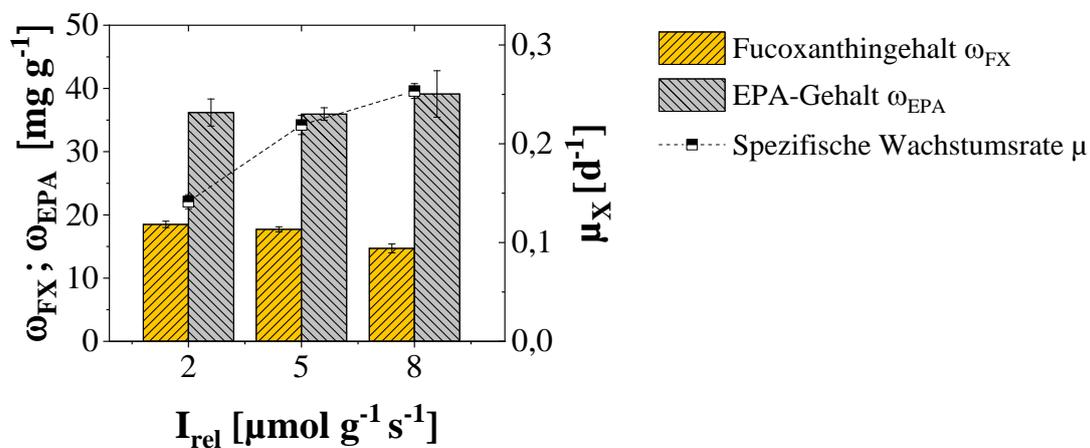


Abbildung 21: Vergleich der spezifischen Wachstumsrate  $\mu_x$  und des biomassespezifischen Fucoxanthin- und EPA-Gehaltes  $\omega_{\text{FX/EPA}}$  von *P. tricornutum* UTEX 640 im Schüttelkolben bei unterschiedlicher relativer Lichtverfügbarkeit  $I_{\text{rel}}$  nach einem Zeitraum von 96 h. Die Kultivierung erfolgte nach Kap. 4.3.2.

Betrachtet man den biomassespezifischen EPA-Gehalt des Stammes, so war lediglich bei der höchsten  $I_{\text{rel}}$  von  $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$  ein signifikanter Unterschied gegenüber den niedrigeren Lichtverfügbarkeiten festzustellen. Der maximal erreichte EPA-Gehalt lag bei  $39,1 \pm 3,7 \text{ mg g}^{-1}$  und damit im Bereich publizierter Literaturwerte (Rodolfi et al., 2017). Die Ergebnisse zeigen, dass die hier untersuchte relative Lichtverfügbarkeit im Bereich von 2 bis  $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$  ein generelles Wachstum des untersuchten Stammes gewährleistet, weshalb die ermittelten Werte nachfolgend auch für den Transfer des Stammes in den FPA-PBR herangezogen wurden. Eine Kultivierung bei noch niedrigeren  $I_{\text{rel}} < 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  war nicht möglich und führte zur vollständigen Inhibition des Wachstums. Auf eine Untersuchung von Lichtverfügbarkeiten  $> 8 \mu\text{E} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wurde aufgrund der hierfür notwendigen sehr hohen Photonendichten bei höheren Biomassenkonzentrationen ( $c_x > 3 \text{ g L}^{-1}$ ), wie sie typischerweise im Betrieb des FPA-PBR erreicht werden, verzichtet. Derartig hohe Photonendichten lassen sich zudem

technisch nicht über die aktuell zur Verfügung stehenden LED-Panel und das verwendete Kühlungssystem des FPA-PBR realisieren.

### **5.3 Untersuchungen zur Photoakklimatisation von *P. tricornutum* im FPA-PBR**

Nachfolgend wurden die zuvor in Kap. 5.2.1 und 5.2.2 ermittelten Parameter im Rahmen einer „repeated Fed-Batch“-Kultivierung bei konstanter Biomassekonzentration im FPA-PBR untersucht. Hierbei wurde zunächst der Einfluss der relativen Lichtverfügbarkeit im Hinblick auf die volumetrische Biomasseproduktivität und die Lichtausbeute betrachtet (Kap. 5.3.1). Für den Stamm *P. tricornutum* UTEX 640 erfolgten anschließend Untersuchungen zur Langzeit-Photoakklimatisation an unterschiedliche relative Lichtverfügbarkeiten. Es wurden insbesondere die Auswirkungen auf die volumetrische Wertstoffproduktivität, die Produktbildungsrate und die produktspezifische Lichtausbeute betrachtet (Kap. 5.3.2 bis Kap. 5.3.4). Nachfolgend werden schließlich Ansätze zur prozesstechnischen Nutzung der Photoakklimatisation im FPA-PBR im Freiland diskutiert (Kap. 5.3.5 und 5.3.6).

#### **5.3.1 Auswirkung der relativen Lichtverfügbarkeit auf die volumetrische Biomasseproduktivität und Lichtausbeute**

Um die Photoakklimatisation prozesstechnisch im FPA-PBR nutzen zu können, wurde ein „repeated Fed-Batch“ Prozess bei zwei verschiedenen initialen Biomassenkonzentrationen von  $c_X = 3$  bzw.  $6 \text{ g L}^{-1}$  sowie bei unterschiedlicher relativer Lichtverfügbarkeit  $I_{\text{rel}}$  von 2, 5 und  $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$  gemäß Kap. 4.4.3 etabliert. Die Biomassekonzentration  $c_X$  wurde dabei täglich auf die initiale Ausgangskonzentration verdünnt. Abb. 22 zeigt, dass sich die volumetrische Produktivität im FPA-PBR abhängig von der relativen Lichtverfügbarkeit und auch der verwendeten Biomassekonzentration unterscheidet.

Mit der doppelten initialen Biomassekonzentration von  $6 \text{ g L}^{-1}$  (Abb. 22 B) wird die höchste volumetrische Tagesproduktivität von  $1,53 \pm 0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  bei  $I_{\text{rel}} = 8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$  erreicht. Die volumetrische Produktivität korreliert damit mit den von Meiser et al. (2004) für *P. tricornutum* UTEX 640 veröffentlichten Daten (Meiser et al., 2004). Meiser et al. erreichten in einem älteren Modell des gleichen FPA-PBR abhängig von der Begasungsrate eine volumetrische Produktivität zwischen  $1,2$  und  $2,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , bei einer vergleichbaren Biomassekonzentration im Bereich von  $6-8 \text{ g L}^{-1}$ . Neben der volumetrischen Biomasseproduktivität waren auch Unterschiede in der spezifischen Wachstumsrate der Kieselalge bei unterschiedlichen  $c_X$  festzustellen.

Die Berechnung der mittleren täglichen spezifischen Wachstumsrate bei unterschiedlichen  $I_{rel}$  erfolgte nach Gleichung 3 (Kap. 4.8.1). Die erreichte Wachstumsrate  $\mu_X$  bei  $c_X = 6 \text{ g L}^{-1}$  und maximaler  $I_{rel}$  ( $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) lag, im Gegensatz zur volumetrischen Biomasseproduktivität, mit  $0,22 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$  insgesamt niedriger als unter gleichen Bedingungen bei  $c_X = 3 \text{ g L}^{-1}$  ( $0,32 \pm 0,06 \text{ d}^{-1}$ ). Die relative Wachstumsgeschwindigkeit der Diatomee ist somit im FPA-PBR bei einer niedrigen Biomassekonzentration höher, was sich auch in der insgesamt besseren Lichtausbeute bzw. besseren Substratversorgung bei einer niedrigen  $c_X$  und maximaler Lichtverfügbarkeit ( $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) bzw. hoher PFD widerspiegelt (vgl. Abb. 22 C und D).

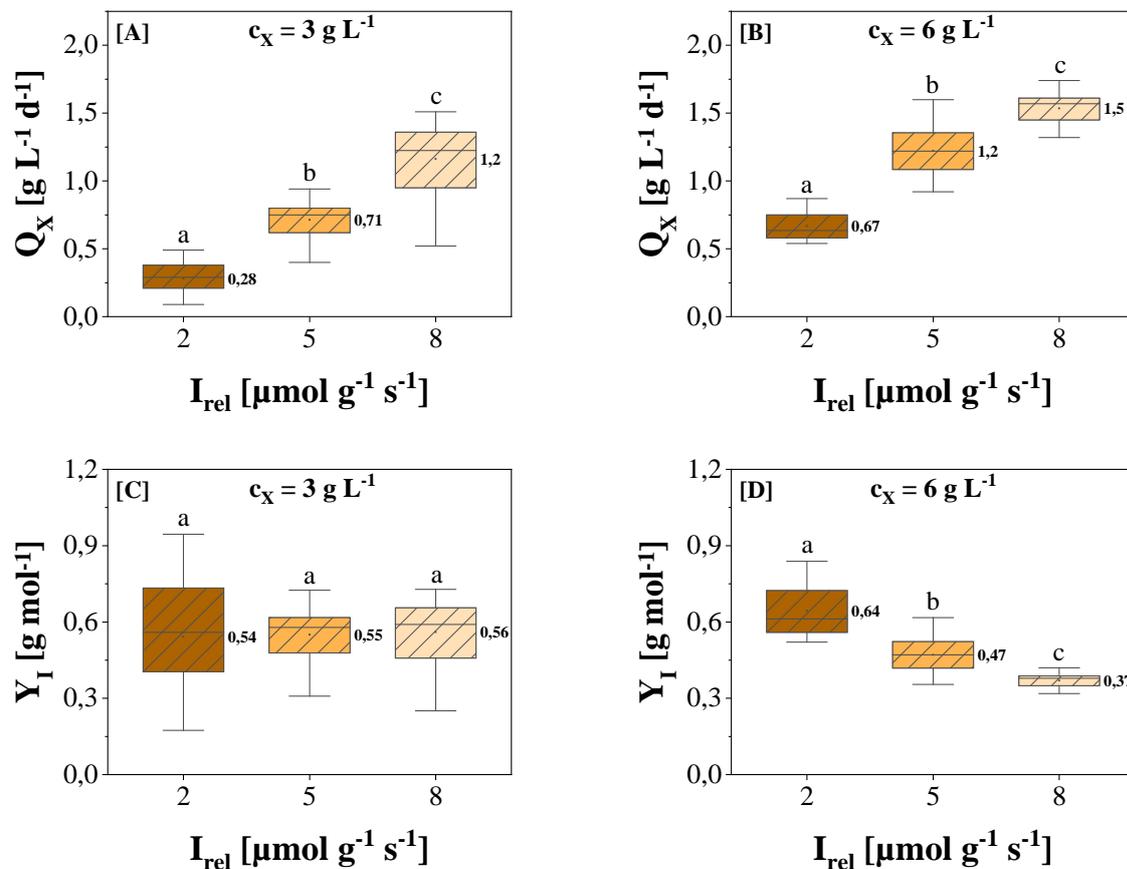


Abbildung 22: Volumetrische Biomasseproduktivität  $Q_X$  [A,B] und Lichtausbeute  $Y_I$  [C,D] von *P. tricornutum* UTEX 640 bei unterschiedlicher relativer Lichtverfügbarkeit  $I_{rel}$  im FPA-PBR bei einer Biomassekonzentration von [A,C]  $3 \text{ g L}^{-1}$  und [B,D]  $6 \text{ g L}^{-1}$ . Kultiviert wurde jeweils als repeated Fed-Batch-Prozess, wie in Kap. 4.4.3 beschrieben. Unterschiedliche Buchstaben über den Boxen zeigen signifikante Unterschiede (Signifikanzniveau  $\leq 0,05$ ). Zahlenwerte zeigen den jeweiligen Mittelwert.

Generell muss zum Erreichen der gleichen  $I_{rel}$  bei einer Erhöhung der Biomassekonzentration auch der in den FPA-PBR eingebrachte Photonenfluss in gleichem Maße wie  $c_X$  erhöht werden. Im konkreten Fall von  $3$  auf  $6 \text{ g L}^{-1}$  entspricht dies also einer Verdopplung der eingestrahlenen PFD auf der Reaktoroberfläche. Wie aus Abb. 22 D ersichtlich, sinkt der Grad der Konversion des Lichts in Biomasse hierbei insbesondere bei hoher  $I_{rel}$  und hoher  $c_X$  ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ), was sich

wiederum in einer verminderten Lichtausbeute  $Y_1$  niederschlägt. Wie in Abb. 22 B und 22 D zu erkennen, verhält sich  $Q_X$  bei  $c_X = 6 \text{ g L}^{-1}$  nahezu diametral zu  $Y_1$ . Dieses Phänomen wurde bereits durch Holdmann (2018) für die Grünalge *C. sorokiniana* im FPA-PBR beschrieben (Holdmann, 2018). Bei einer hohen  $c_X$  und gleichzeitig hoher  $I_{\text{rel}}$  wird das eingebrachte Licht im FPA-PBR somit weniger gut auf die Zellen verteilt. Zellen, welche sich kurzfristig an der lichtzugewandten Reaktoroberfläche befinden, werden von einer hohen Anzahl von Photonen getroffen und können diese offenbar weniger effizient verwerten. Sie sind an die exzessiven Lichtbedingungen an der Reaktoroberfläche und die extremen Fluktuationen scheinbar nur unzureichend adaptiert, da sie einen Großteil der Zeit in der Dunkelzone des FPA-PBR verweilen. Ungenutzte Energie geht entsprechend durch Wärme und Fluoreszenz verloren (Lohr, 2000; Muller, 2001). Es kann in diesem Zusammenhang zudem vermutet werden, dass eine ineffiziente Konversion des Lichts auch zu einer erhöhten Temperaturentwicklung im FPA-PBR führt, was neben dem hohen Energieeintrag für den Photonenfluss wiederum eine effektivere Kühlung des Reaktors erforderlich macht.

Wie durch Holdmann (2018) vorgeschlagen, könnte eine bessere Lichtausbeute und damit ggf. auch eine Steigerung der volumetrischen Produktivität bei einer hohen Biomassekonzentration durch eine Erhöhung der Begasungsrate erreicht werden, da diese die treibende Kraft für die Durchmischung im FPA-PBR darstellt. Insgesamt liegt die für *P. tricornutum* ermittelte Lichtausbeute im Bereich von  $0,36 \pm 0,04$  bis  $0,64 \pm 0,1 \text{ g mol}^{-1}$  etwas höher als die von Holdmann et al. (2018) für die Grünalge *C. sorokiniana* im FPA-PBR ermittelte Lichtausbeute von etwa  $0,4 \text{ g mol}^{-1}$  bei einer vergleichbaren Biomassekonzentration ( $c_X = 4$  bis  $7 \text{ g L}^{-1}$ ;  $I_{\text{rel}} = 3$  bis  $9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) und 24-stündiger Beleuchtung (Holdmann et al., 2018).

### 5.3.2 Auswirkung der relativen Lichtverfügbarkeit auf die Fucoxanthinsynthese

Analog zum vorherigen Kapitel wurde, um die volumetrische Fucoxanthinproduktivität  $Q_{\text{FX}}$  von *P. tricornutum* in Abhängigkeit unterschiedlicher  $I_{\text{rel}}$  im FPA-PBR zu ermitteln, bei einer Biomassekonzentration von  $c_X = 6 \text{ g L}^{-1}$ , welche täglich angepasst wurde, kultiviert und Biomasse über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert (siehe Kap. 4.4.3). Um eine Langzeit-Photoadaptation der Diatomee an unterschiedliche  $I_{\text{rel}}$  zu ermöglichen, erfolgte die Probennahme in Anlehnung an die Veröffentlichungen von Nymark et al. (2009) sowie Ragni und d'Alcalà (2007) nach einer Adaptionszeit von 48 h (Nymark et al., 2009; Ragni und d'Alcalà, 2007). Der biomassespezifische Fucoxanthingehalt  $\omega_{\text{FX}}$ , die tägliche volumetrische Produktivität  $Q_{\text{FX}}$  sowie die biomassespezifische Produktbildungsrate  $q_{\text{FX}}$  und die Fucoxanthinausbeute  $Y_{\text{FX}}$  in Abhängigkeit von  $I_{\text{rel}}$  sind in Abb. 23 A bis D dargestellt.

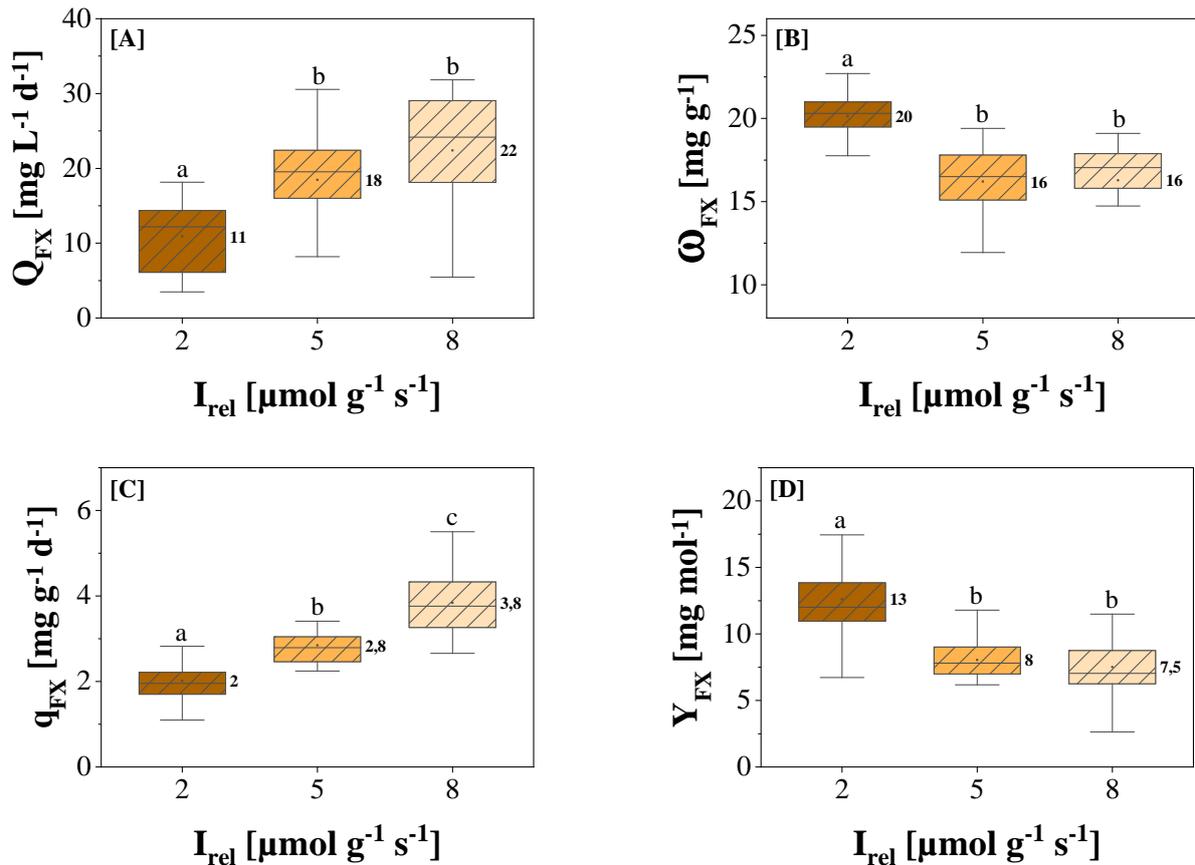


Abbildung 23: Volumetrische Fucosanthinproduktivität  $Q_{FX}$  [A], biomassespezifischer Fucosanthingehalt  $\omega_{FX}$  [B], biomassespezifische Fucosanthinbildungsrate  $q_{FX}$  [C] sowie die produktspezifische Lichtausbeute  $Y_{FX}$  [D] von *P. tricorutum* UTEX 640 im FPA-PBR bei unterschiedlicher relativer Lichtverfügbarkeit  $I_{rel}$  und einer initialen Biomassekonzentration  $c_X = 6 \text{ g L}^{-1}$ . Kultiviert wurde jeweils als repeated Fed-Batch-Prozess, wie in Kap. 4.4.3 beschrieben. Unterschiedliche Buchstaben über den Boxen zeigen signifikante Unterschiede (Signifikanzniveau  $\leq 0,05$ ). Zahlenwerte zeigen den jeweiligen Mittelwert.

Zu erkennen ist, dass die maximale Fucosanthinproduktivität von  $22,4 \pm 7,6 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$  bei  $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ , also maximaler  $I_{rel}$  erreicht wurde. Aufgrund der ebenfalls mit der Lichtintensität ansteigenden Produktbildungsrate  $q_{FX}$  (Abb. 23 C) und des unter 5 und  $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$  konstanten Fucosanthingehaltes (Abb. 23 B) kann vermutet werden, dass ein Großteil des täglich „de novo“ produzierten Fucosanthins nicht aus der in-vivo Synthese von Fucosanthin in der bereits bestehenden Biomasse kommt, sondern vielmehr durch die Bildung von Fucosanthin als Bestandteil neugebildeter „adaptierter“ Zellen. Abb. 23 B zeigt, dass sich der biomasse-spezifische Fucosanthinanteil  $\omega_{FX}$  bei niedrigem  $I_{rel}$  bis zu einem Maximalwert von  $20,1 \pm 1,6 \text{ mg g}^{-1}$  erhöht, was einer Steigerung von etwa 20 % gegenüber den untersuchten höheren Lichtverfügbarkeiten entspricht. Generell scheint *P. tricorutum* somit als Reaktion auf die sehr geringe Lichtverfügbarkeit mehr Fucosanthin zu synthetisieren und somit den Photosynthese-Apparat an den Lichtmangel anzupassen. Die Ergebnisse deuten somit daraufhin, dass es möglich ist, das zuvor auf zellulärer Ebene beschriebene Phänomen der

Langzeit-Photoadaption von Diatomeen für die Produktion von Fucoxanthin mit *P. tricornutum* im FPA-PBR prozesstechnisch zu nutzen, um den biomassespezifischen Produktgehalt zu steigern (Falkowski und Chen, 2003; Nymark et al., 2009). Der Fucoxanthingehalt in der Biomasse kann insbesondere unter ökonomischen Gesichtspunkten im Hinblick auf eine Mikroalgen-Bioraffinerie von Bedeutung sein, da der Carotinoidgehalt einen kritischen Faktor bezüglich der Wirtschaftlichkeit eines solchen Gesamtprozesses darstellt (Thomassen et al., 2016).

Zwischen der untersuchten mittleren und hohen Lichtverfügbarkeit  $I_{rel}$  von 5 und 8  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$  war kein signifikanter Einfluss auf den biomassespezifischen Fucoxanthingehalt nachzuweisen. Ursächlich hierfür könnte die unter beiden Einstellungen sehr hohe tägliche volumetrische Biomasseproduktivität von 1,2 bis 1,5  $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$  sein (siehe vorheriges Kap. 5.3.1). Da die Biomassekonzentration  $c_X$  und somit auch  $I_{rel}$  im Intervall von 24 h angepasst wurde, sinkt die initial eingestellte  $I_{rel}$  bei einem starken zeitlichen Anstieg von  $c_X$  im Verlauf der 24 h in höherem Maße als bei niedrigerem  $I_{rel}$ . Unter Berücksichtigung der Biomasseproduktivität sinkt  $I_{rel}$  somit im zeitlichen Verlauf von ursprünglich 5 auf etwa 4,1  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$  bzw. von 8 auf etwa 6,3  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ . Somit sinkt auch die tatsächliche Differenz zwischen beiden Lichteinstellungen über 24 h. Abhilfe könnte hier beispielsweise eine prädiktive Steuerung der Lichtverfügbarkeit und somit eine Anpassung von  $I_{rel}$  an  $c_X$  in kürzeren Zeitintervallen schaffen. Die hier gewonnenen Daten liefern hierfür erste Ansatzpunkte und können daher die Grundlage für nachfolgende Arbeiten darstellen. Versuche zum Betrieb des FPA-PBR bei einer höheren Lichtverfügbarkeit von 11  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$  ( $c_X = 3 \text{ g L}^{-1}$ ) führten in dieser Arbeit zu einem Absterben der Zellen. Eine höhere Lichtverfügbarkeit lässt sich technisch mit dem vorliegenden Versuchsaufbau aufgrund der dafür notwendigen sehr hohen PFD ( $>1380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) auch nur für eine Biomassekonzentration  $< 6 \text{ g L}^{-1}$  realisieren.

Wenngleich bei hohem  $I_{rel}$  mehr Fucoxanthin pro Volumen und Zeiteinheit gebildet wird, so ist auch der für jedes mg Fucoxanthin in den FPA-PBR eingebrachte Licht- bzw. Energieeintrag erhöht. Begründet ist dies u.a. durch die schlechtere Lichtausbeute (siehe auch vorheriges Kap. 5.3.1, Abb 22 D) in Verbindung mit dem hier gezeigten verringerten biomassespezifischen Produktgehalt. So zeigt Abb. 23 D, dass pro eingebrachtes Mol Photonen unter Schwachlichtbedingungen etwa 65 % mehr Fucoxanthin ( $12,6 \pm 2,9 \text{ mg mol}^{-1}$ ) generiert werden kann, als es unter Starklichtbedingungen ( $7,5 \pm 2,7 \text{ mg mol}^{-1}$ ) der Fall ist. Diese ineffiziente Energieverwertung bei hoher Photonenflussdichte ist auch aus ökonomischen Gesichtspunkten interessant, da der artifizielle Lichteintrag einen wesentlichen Kostenfaktor

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 11: Vergleich der ermittelten Prozesskenngrößen (volumetrische Fucoxanthinproduktivität  $Q_{FX}$ , dem biomassespezifischen Fucoxanthingehalt  $\omega_{FX}$  und dem maximalen Fucoxanthintiter  $c_{FX}$ ) mit Maximalwerten aus verfügbaren Veröffentlichungen zur photoautotrophen Produktion von Fucoxanthin mit verschiedenen Mikroalgen und verschiedenen Photobioreaktorsystemen (\* = Maximalwert, n.a. = nicht angegeben).

Mikroalgenpezies	Photobioreaktor-Typ (Volumen) und Betriebsweise	PFD / optische Schichtdicke (SD)	$Q_{FX}$ [ $mg L^{-1} d^{-1}$ ]	$\omega_{FX}$ [ $mg g^{-1}$ ]	$c_{FX,max}$ [ $mg L^{-1}$ ]	Quelle
<i>P. tricornutum</i>	Flachplatten-PBR (6 L) (repeated-fed-batch)	SD = 3 cm PFD = $1371 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ ( $I_{rel} = 8 \mu mol g^{-1} s^{-1}$ )	22,4*	16,3	123	<i>Diese Arbeit</i>
<i>P. tricornutum</i>	Flachplatten-PBR (6 L) (repeated-fed-batch)	SD = 3 cm PFD = $343 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ ( $I_{rel} = 2 \mu mol g^{-1} s^{-1}$ )	10,9	20,5	134*	<i>Diese Arbeit</i>
<i>P. tricornutum</i>	Flachplatten-PBR (55 L) (batch)	SD = 4 cm PFD = $300 \mu mol m^{-2} s^{-1}$	4,73	10,32	n.a.	(Gao et al., 2017)
<i>P. tricornutum</i>	Flachplatten-PBR (5 L) (batch)	SD = 5 cm PFD = $155 \mu mol m^{-2} s^{-1}$	2,3	59,2*	20,5	(McClure et al., 2018)
<i>Odontella aurita</i>	Röhren-PBR (320 ml) (batch)	$\varnothing = 3$ cm, L = 60 cm PFD = $300 \mu mol m^{-2} s^{-1}$	7,96	12,5	79,6	(Xia et al., 2013)
<i>Odontella aurita</i>	Flachplatten-PBR (75 L) (batch)	SD = 3 cm PFD = $300 \mu mol m^{-2} s^{-1}$	6,92	19,6	69,2	(Xia et al., 2013)
<i>Mallomonas sp.</i>	Schüttelkolben (50 ml) (batch)	SD = n.a. PFD = $140 \mu mol m^{-2} s^{-1}$	n.a.	22,7	90	(Petrushkina et al., 2017)
<i>Cyclotella cryptica</i>	Schüttelkobeln (400 ml) (batch)	SD = n.a. PFD = $30 \mu mol m^{-2} s^{-1}$	5,6	12,9	n.a.	(Guo et al., 2016)
<i>Cylindrotheca closterium</i>	„Plastic-Bag“-PBR (800 ml) (batch)	SD = n.a. PFD = $80 \mu mol m^{-2} s^{-1}$	1,4	25,5	n.a.	(S. Wang et al., 2018)
<i>Isochrysis sp. (CCMP1324)</i>	Röhren-PBR (250 ml) (semi-konti)	$\varnothing = 3$ cm, L = n.a. PFD = $60 \mu mol m^{-2} s^{-1}$	7,96	14,5	n.a.	(Z. Sun et al., 2019)

beim Betrieb von Photobioreaktoren darstellt (Blanken et al., 2013).

Ein Vergleich der gewonnenen Prozessdaten mit bisherigen Veröffentlichungen zur photoautotrophen Fucoxanthinproduktion ist in Tab. 11 dargestellt. Es wird insbesondere die vergleichsweise hohe volumetrische Fucoxanthinproduktivität im FPA-PBR deutlich. Eine mittlere tägliche  $Q_{FX} = 22,4 \pm 7,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  bei  $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ist nach aktuellem Kenntnisstand des Autors der bisher höchste publizierte Wert für Mikroalgen in Photobioreaktoren, was insbesondere auf die hohe Biomasseproduktivität zurückgeführt werden kann. Die Produktivität übersteigt sogar den durch Lu et al. (2018) für die heterotroph kultivierte Kieselalge *Nitzschia laevis* publizierten Wert von  $16,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Lu et al., 2018).

Wie zuvor beschrieben, sinkt  $Q_{FX}$  bei niedriger  $I_{rel}$ , wenngleich der biomassespezifische Fucoxanthingehalt ansteigt. Mit  $\omega_{FX} = 20,1 \pm 1,6 \text{ mg g}^{-1}$  liegt der erzielte Fucoxanthingehalt über den von Kim et al. (2012) und Goa et al. (2017) für *P. tricornutum* publizierten Werten, jedoch deutlich unterhalb den von McClure et al. (2019) publizierten Daten (Kim et al., 2012a; Gao et al., 2017; McClure et al., 2018). Wie in Tab. 11 ersichtlich, arbeitete die Gruppe um McClure et al. (2018) dabei ebenfalls in einem Flachplattenbioreaktor, jedoch bei einer deutlich geringeren Biomassekonzentration, was in einem deutlich geringeren Produkttiter und einer deutlich geringeren volumetrischen Fucoxanthinproduktivität von lediglich  $2,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  resultierte. Selbst unter der niedrigsten relativen Lichtverfügbarkeit liegt die in dieser Arbeit im FPA-PBR erreichte Produktivität von  $10,9 \pm 4,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  somit um etwa den Faktor 4 höher.

### 5.3.3 Auswirkung der relativen Lichtverfügbarkeit auf die EPA-Synthese

Bisher veröffentlichte Studien zur Abhängigkeit des EPA-Gehaltes und der EPA-Produktivität von den zur Kultivierung der Diatomeen verwendeten Lichtverhältnissen kommen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Chrismadha und Borowitzka (1994) berichten beispielweise von einer Erhöhung der volumetrischen EPA-Produktivität mit *P. tricornutum* (MUR 136) bei einer erhöhten PFD (Chrismadha und Borowitzka, 1994). Die Gruppe um Qiao et al. (2016) stellte keinen Einfluss der Photonenflussdichte auf den EPA-Anteil im Fettsäureprofil von *P. tricornutum* fest (Qiao et al., 2016). Die durch Liang et al. (2006) veröffentlichten Daten wiederum zeigen eine Reduktion des EPA-Anteils am Gesamtfettsäureprofil während der Batch-Kultivierung von *P. tricornutum* bei konstanter PFD sowie steigender Biomassekonzentration und folglich sinkender  $I_{rel}$  (Liang et al., 2006). In dieser Arbeit wurde eine maximale volumetrische EPA-Produktivität von  $54,2 \pm 15,3 \text{ mg L d}^{-1}$  bei maximaler Lichtverfügbarkeit erreicht (Abb. 24 A).

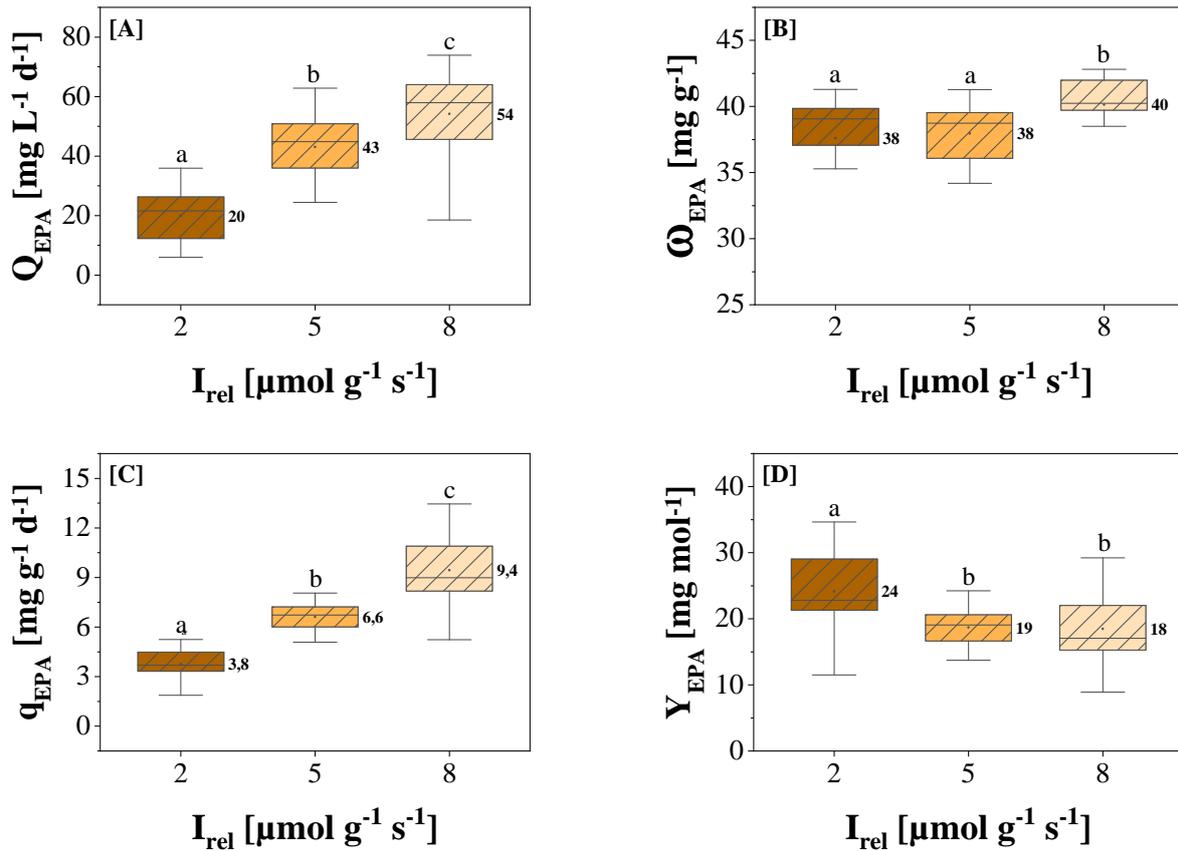


Abbildung 24: Volumetrische EPA-Produktivität  $Q_{EPA}$  [A], biomassespezifischer EPA-Gehalt  $\omega_{EPA}$  [B], biomassespezifische Produktbildungsrate  $q_{EPA}$  [C], sowie die produktspezifische Lichtausbeute  $Y_{EPA}$  [D] von *P. tricornutum* UTEX 640 im FPA-PBR bei unterschiedlicher relativer Lichtverfügbarkeit  $I_{rel}$ . Kultiviert wurde jeweils als repeated Fed-Batch-Prozess, wie in Kap. 4.4.3 beschrieben. Unterschiedliche Buchstaben über den Boxen zeigen signifikante Unterschiede (Signifikanzniveau  $\leq 0,05$ ). Zahlenwerte zeigen den jeweiligen Mittelwert.

Sie liegt damit im Bereich der bisher für dieses Reaktorsystem publizierten Literaturwerte (Meiser et al., 2004; Seibert, 2013). Der biomassespezifische EPA-Gehalt wies lediglich im Bereich hoher Lichtverfügbarkeit einen geringfügig erhöhten Wert verglichen mit niedrigeren Einstellungen auf und erreichte sein Maximum von  $40,2 \pm 2,2 \text{ mg g}^{-1}$  bei  $I_{rel} = 8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$  (Abb. 24 B). Wie zuvor beschrieben, korrespondiert diese Beobachtung mit den Daten der Gruppe um Liang et al. (2006), aber auch mit den Experimenten von Guihéneuf et al. (2008), die einen maximalen EPA-Massenanteil in der Biomasse der Diatomee *Skeletonema costatum* bei Lichtsättigung erreichten (Guihéneuf et al., 2008).

Eine Ursache hierfür könnte eine Anpassung der Thylakoidmembranen-Zusammensetzung als Reaktion auf die erhöhte Lichtverfügbarkeit darstellen. Nach dem durch Petit et al. (2012) postulierten Arbeitsmodell erfolgt in *P. tricornutum* unter Starklichtbedingungen eine Anreicherung von Sulfoquinosyl-diacylglycerol (SQDG) in der Thylakoidmembran, deren genaue Funktion jedoch weitestgehend ungeklärt ist (Lepetit et al., 2012). Als SQDG wiederum

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 12: Prozessdaten zur photoautotrophen Produktion von EPA mit Mikroalgen unter Verwendung verschiedener Photobioreaktoren.

Mikroalgenspezies	Photobioreaktor-Typ (Volumen) und Betriebsweise	PFD / optische Schichtdicke (SD)	Q <sub>EPA</sub> [mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	Ω <sub>EPA</sub> [mg g <sup>-1</sup> ]	C <sub>EPA</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]	Quelle
<i>P. tricornutum</i>	Flachplatten-PBR (6 L) (repeated-fed-batch)	SD = 3 cm PFD = 1371 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> (I <sub>rel</sub> = 8 μmol g <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	54,2*	40,1	238,2*	Diese Arbeit
<i>P. tricornutum</i>	Flachplatten-PBR (6 L) (repeated-fed-batch)	SD = 3 cm PFD = 343 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> (I <sub>rel</sub> = 2 μmol g <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	20,4	37,9	204,1	Diese Arbeit
<i>P. tricornutum</i>	Flachplatten-PBR (30 L) (batch)	SD = 3 cm PFD = 590 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	41,3	59*	n.a.	(Seibert, 2013)
<i>P. tricornutum</i>	FPA-PBR (6 L) (kontinuierlich)	SD = 3 cm PFD = 1000 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	52	50	n.a.	(Meiser et al., 2004)
<i>P. tricornutum</i>	Greenwall Panel (40L) GWP-III (batch)	Freiland n.a.	9,8	44	n.a.	(Steinrücken et al., 2018)
<i>P. tricornutum</i>	Greenwall Panel (40L) GWP-III, (batch)	Freiland n.a.	n.a.	28,1	n.a.	(Rodolfi et al., 2017)
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Röhren-PBR (100 L) (batch)	Freiland n.a.	32	40	n.a.	(Zittelli et al., 1999)
<i>N. oceanica</i>	Plastik-Bag-PBR (5 L) (semi-konti)	SD = n.a. PFD = 150 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	9,9	41	n.a.	(Chen et al., 2018)

Tabelle 13: Prozessdaten zur heterotrophen Produktion von DHA mit kommerziell genutzten Mikroalgenstämmen.

Mikroalgenspezies	Bioreaktor-Typ (Volumen)	Q <sub>DHA</sub> [mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	Ω <sub>DHA</sub> [mg g <sup>-1</sup> ]	C <sub>DHA</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]	Quelle
<i>Schizochytrium sp.</i>	Rührkessel-Fermenter (5 L) (Batch, heterotroph)	662,4	210	4.220	(Q. Wang et al., 2018)
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Rührkessel -Fermenter (1 L) (Batch, heterotroph)	864	200	3000	(Ratledge et al., 2001)

findet sich nach Yang et al. (2017) der wesentliche Teil des in *P. tricornutum* vorhandenen EPA (etwa 32 %) wieder (Yang et al., 2017). Insgesamt ist der in dieser Arbeit beobachtete Anstieg des EPA-Gehaltes in *P. tricornutum* von etwa 5 %, verglichen mit der Änderung des Fucoxanthingehaltes (siehe Kap. 5.3.2), jedoch eher gering. Da im Vergleich zu anderen Arbeiten mit einer sehr hohen PFD gearbeitet wurde, stehen die Beobachtungen auch nicht zwangsläufig in Widerspruch zu den Daten der Gruppe um Qiao et al. (2016), welche bei einer deutlich geringeren PFD arbeiteten (Liang et al., 2006; Qiao et al., 2016). Insgesamt lag der erreichte biomassespezifische EPA-Anteil unterhalb der von Seibert 2013 und Meiser 2004 erreichten Maximalwerte von 5 bis 5,5 %<sub>w/w</sub> (Meiser et al., 2004; Seibert, 2013).

Wie bereits in Kap. 3.1.2 beschrieben, werden zur gezielten kommerziellen Produktion von Omega-3-Fettsäuren - anders als im Fall des Fucoxanthin - bereits Mikroalgen kommerziell eingesetzt, welche jedoch heterotroph kultiviert werden (siehe Tab. 13). Primär sind dies die DHA-synthetisierenden Stämme *Schizochytrium sp.* und *Cryptocodinium cohnii*, wobei DHA anders als EPA in *P. tricornutum* intrazellulär nicht in Form von Glycolipiden sondern als Triacylglycerid (TAG), ein Speicherlipid, vorliegt. DHA liegt dabei zu einem biomassespezifischen Masseanteil von bis zu 21 % vor (Q. Wang et al., 2018). Einige im Laufe der letzten Jahre selektierte Stämme weisen zudem auch Anteile an EPA im Fettsäureprofil auf (Winwood, 2013). Wenngleich die volumetrische DHA-Produktivität der Stämme aufgrund der heterotrophen Kultivierungsbedingungen sowie dem höheren biomassespezifischen Wertstoffgehalt um mehr als den Faktor 10 über der von *P. tricornutum* liegt (vgl. Tab. 12 und Tab. 13), ist es mit diesen Stämmen bisher nicht möglich EPA ohne DHA-Anteil zu erzeugen. Die Trennung beider Fettsäuren ist zwar mittels chromatographischen Verfahren möglich, jedoch sehr aufwendig (Dillon et al., 2013; Lembke, 2013). Mit *P. tricornutum* kann eine direkte Produktion von EPA-haltigem Öl ohne DHA-Anteil gewährleistet werden, was wiederum für eine definierte Dosierung einzelner Fettsäuren in späteren Endprodukten vorteilhaft ist.

#### **5.3.4 Auswirkung der relativen Lichtverfügbarkeit auf den Gesamtproteingehalt**

Wenngleich die Produktion von Proteinen eine für diese Arbeit untergeordnete Rolle spielt, so stellt die Produktion von Proteinen für Futter- und Nahrungsmittelapplikationen ein Schwerpunkt vieler aktueller Forschungsarbeiten dar (Hausmann, 2019; Safi et al., 2014a, 2014b). So zeigte bereits die Arbeit von Hausmann (2019), dass Proteine aus *P. tricornutum* ein sehr ausgewogenes Aminosäureprofil sowie vorteilhafte technofunktionale Eigenschaften für die Verarbeitung in Nahrungsmitteln besitzen.

Im Gegensatz zum EPA- und Fucoxanthingehalt konnten in dieser Arbeit keine signifikanten Änderungen im Gesamtproteingehalt in der Biomasse von *P. tricornutum* bei der Kultivierung unter verschiedenen relativen Lichtverfügbarkeiten im FPA-PBR detektiert werden. Der mittels FTIR-Spektroskopie ermittelte mittlere biomassespezifische Proteingehalt lag für alle untersuchten Einstellungen im Bereich von  $49 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}$  und damit in einem für Mikroalgen typischen Bereich (Becker, 2007a). Die volumetrische Proteinproduktivität verhielt sich somit proportional zu der in Kap. 5.3.2 errechneten Biomasseproduktivität und erreichte ein Maximum bei  $I_{\text{rel}} = 8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$  von  $Q_P = 792 \pm 66 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

### **5.3.5 Ansätze zur prozesstechnischen Nutzung der Photoakklimatisation im FPA-PBR unter artifizieller Beleuchtung**

Auf Grundlage der in Kap. 5.1 bis Kap. 5.3.3 gewonnenen Erkenntnisse wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Müller (2018) weiterführende Untersuchungen bezüglich der Entwicklung eines zweistufigen Produktionsprozesses durchgeführt (Müller, 2018). Ziel der Versuche war es, das Biomassewachstum von der Produktbildung zu entkoppeln, anders als dies im zuvor gezeigten „repeated Fed-Batch“ Prozess der Fall ist. Ein ähnliches Vorgehen wird beispielweise bei der Stickstoff- oder Phosphatlimitierung zur Erzeugung von kohlenhydrat- bzw. fettsäurehaltiger Mikroalgenbiomasse über einen zweistufigen Kultivierungsprozess angewendet (Münkel et al., 2013). In einem „Proof of Concept“ wurde zunächst *P. tricornutum* Biomasse mit einer hohen relativen Lichtverfügbarkeit ( $I_{\text{rel}} = 8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) erzeugt und  $I_{\text{rel}}$  in einer zweiten Stufe wieder reduziert ( $2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Wie nach den in Kap. 5.3.2 gezeigten Ergebnissen zu erwarten, führte dies zu einem Anstieg des biomassespezifischen Fucoxanthingehaltes im zweiten Prozessschritt. Gleichzeitig wies der Fucoxanthin-Titer im FPA-PBR über die gesamte Prozessdauer, trotz unterschiedlicher volumetrischer Biomasseproduktivität in beiden Prozessphasen, keinen signifikanten Unterschied auf (Müller, 2018).

Mit einem zweistufigen Prozessansatz kann somit prinzipiell in einem ersten Produktionsschritt *P. tricornutum*-Biomasse mit einer hohen volumetrischen Produktivität erzeugt werden und anschließend in einem nachfolgenden Prozessschritt der biomassespezifische Fucoxanthingehalt gesteigert werden. Ein hoher Produktgehalt wirkt sich im Anschluss u.a. positiv auf die aufzuarbeitende Biomassemenge aus. Mit diesem Ansatz ist es zudem möglich, Energie für die Beleuchtung des FPA-PBR einzusparen, welche bekanntermaßen einen wesentlichen operativen Kostenfaktor beim Betrieb des FPA-PBR darstellt (Blanken et al., 2013).

### 5.3.6 Auswirkung der Photoakklimatisation unter Freilandbedingungen

Anders als unter Laborbedingungen mit artifizieller Dauerbeleuchtung unterliegt die Beleuchtung bei der phototrophen Algenproduktion im Freiland unter Nutzung von Sonnenlicht jahreszeitabhängigen Tageszyklen, in denen die Lichtverhältnisse zudem je nach Tageszeit variieren. Hier besteht somit nicht die Möglichkeit die Photonenflussdichte oder relative Lichtverfügbarkeit direkt zu steuern. Eine Steuerung der relativen Lichtverfügbarkeit kann lediglich durch Anpassung der Biomassekonzentration im FPA-PBR erfolgen, wie z.B. durch Ernte von Teilen des Reaktorvolumens und Zufuhr von Nährmedium. Setzt man somit einen Fed-Batch-Prozess voraus, wie er klassischerweise im FPA-PBR in der Freilandproduktion durchgeführt wird, so wird  $I_{rel}$  mit steigender Biomassekonzentration über die Prozessdauer sinken (Holdmann, 2018). Verknüpft man diese Tatsache mit hier gezeigten Ergebnissen, erscheint es somit im Hinblick auf einen hohen Fucoxanthingehalt sinnvoll, bei einer niedrigen  $I_{rel}$  zu ernten und die natürliche Lichtlimitierung durch die steigende Biomassekonzentration auszunutzen um möglichst Fucoxanthin-reiche Biomasse zu erhalten. Als Orientierung kann nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit z.B. eine Lichtverfügbarkeit von  $2 \mu E g^{-1} s^{-1}$  als Richtwert für den Erntezeitpunkt dienen. Ein hoher Produktgehalt kann beispielweise für die spätere Produktaufarbeitung vorteilhaft sein, da weniger Biomasse verarbeitet werden muss.

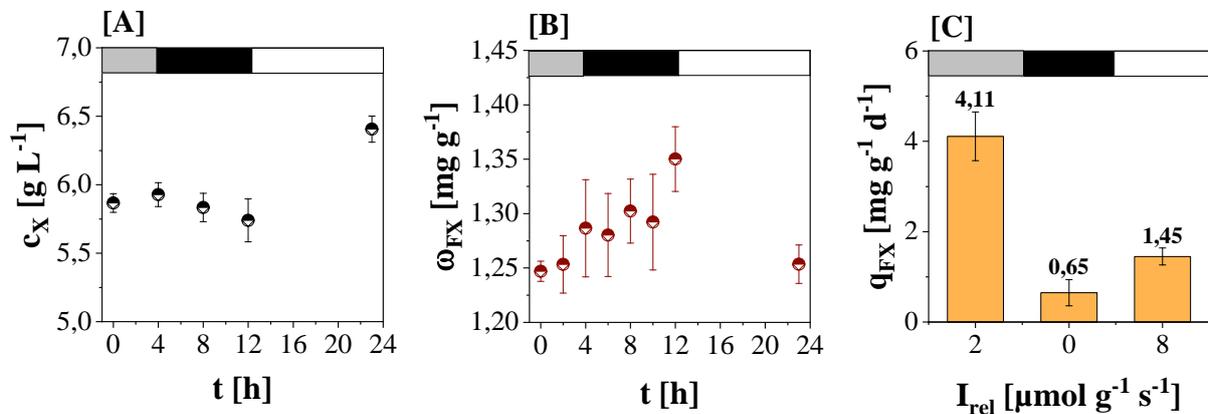


Abbildung 25: Dargestellt ist der Verlauf der Biomassekonzentration  $c_x$  [A], des biomassespezifischen Fucoxanthingehaltes  $\omega_{FX}$  [B] und die biomassespezifische Fucoxanthinbildungsrate  $q_{FX}$  [C] über einen künstlich nachgestellten Tagesverlauf im FPA-PBR. Die Balken oberhalb der drei Diagramme symbolisieren den Tagesverlauf. (grau: Dämmerungsphase mit  $2 \mu mol g^{-1} s^{-1}$ ; schwarz: Nachtphase mit  $0 \mu mol g^{-1} s^{-1}$ ; weiß: sonniger Tag mit  $8 \mu mol g^{-1} s^{-1}$ ). Dargestellt sind Mittelwerte aus fünf Zyklen ( $n=5$ ). Darstellung übernommen aus der Arbeit von Müller (2018) mit eigenen Modifikationen (Müller, 2018).

Nicht nur mit steigender Biomassekonzentration ändert sich  $I_{rel}$  im FPA-PBR über mehrere Tage, sondern auch im jeweiligen Tagesverlauf. Um den Einfluss von entsprechenden Tag-Nacht-Zyklen zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Müller 2018 auf Basis des zuvor etablierten „repeated Fed-Batch“-Prozesses (Kap. 4.4.3) ein solcher Tagesverlauf bei

einer Biomassekonzentration von  $6 \text{ g L}^{-1}$  im FPA-PBR im Labor nachgestellt und dessen Auswirkung auf den biomassespezifischen Fucoxanthingehalt untersucht (Abb. 25).

Die Ergebnisse zeigen neben einem durch Respiration bedingten Biomasseverlust in der Nachphase (Abb. 25 A), wie er z.B. auch von Holdmann (2018) für die Grünalge *C. vulgaris* beschrieben wurde, eine Änderung des biomassespezifischen Fucoxanthingehaltes (Abb. 25 B) über den künstlich nachgestellten Tagesverlauf (Holdmann, 2018). Während der biomassespezifische Fucoxanthingehalt über Nacht steigt, wird bei zusätzlicher Betrachtung der Produktbildungsrate (Abb. 25 C) deutlich, dass insbesondere in der nachgestellten Dämmerungsphase ( $2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) die Produktbildungsleistung der Zellen steigt. Des Weiteren geht aus Abb. 25 C bei Betrachtung der Produktbildungsrate hervor, dass der in Abb. 25 B gezeigte Anstieg des biomassespezifischen Fucoxanthingehaltes in der Nachphase eine Folge der gleichzeitigen Abnahme der Gesamtbiomasse (Abb. 25 A) ist. Es ist daher denkbar, dass der Anstieg des Fucoxanthingehaltes durch respiratorische Vorgänge in den Mikrozellen und damit durch den Verbrauch intrazellulärer Kohlenstoffspeicher verursacht wird. Die Daten legen somit eine Ernte des FPA-PBR im Freiland zu Beginn der Nacht am Ende der „Dämmerungsphase“ nahe, wengleich auch in der Nachtphase kein Fucoxanthin im Zuge der Respiration abgebaut wird.

### 5.3.7 Zusammenfassung der Akklimatisierungsversuche

Durch einen Vergleich der spezifischen Wachstumsraten und volumetrischen Produktivität verschiedener Fucoxanthin- und EPA-Produzenten konnte mit *P. tricornutum* UTEX 640 ein geeigneter Produktionsstamm identifiziert werden, welcher sich zur Produktion beider Wertstoffe im FPA-PBR eignet. Der Stamm wies gegenüber anderen Vertretern der Klasse der Bacillariophyta und Haptophyta den höchsten biomassespezifischen Fucoxanthingehalt sowie die höchste volumetrische Biomasseproduktivität im FPA-PBR auf.

Es wurden des Weiteren geeignete Stickstoffkonzentrationen ( $\text{NH}_4^+$  und  $\text{NO}_3^-$ ) zur Kultivierung des ausgewählten Stammes ermittelt. Der Stamm tolerierte Ammonium und Nitrat bis zu einer elementaren Stickstoffkonzentration von  $N_{\text{NH}_4^+} = 103 \text{ mg ml}^{-1}$  und  $N_{\text{NO}_3^-} = 133 \text{ mg ml}^{-1}$  im Kulturmedium. Obwohl Ammonium das aus metabolischer Sicht einfacher zu verwertende Substrat darstellt, wies der Stamm mit Nitrat eine leicht erhöhte spezifische Wachstumsrate auf. Mit Ammonium als Substrat war allerdings ein erhöhter biomassespezifischer EPA- als auch Fucoxanthingehalt festzustellen. Eine Erhöhung des Eisengehaltes  $> 1 \text{ mg L}^{-1}$  im Kultur-

medium zeigte, anders als in einigen wenigen Publikationen beschrieben, keinen Einfluss auf den jeweiligen biomassespezifischen Produktgehalt in der Biomasse.

In einem Repeated-Fed-Batch Prozess im FPA-PBR konnte der Einfluss der relativen Lichtverfügbarkeit auf die volumetrische Biomasse- und Wertstoffproduktivität als auch auf den biomassespezifischen Wertstoffgehalt gezeigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass *P. tricornutum* UTEX 640 das zur Verfügung stehende Licht bei niedriger Lichtverfügbarkeit effizienter verwerten kann, weshalb u.a. auch die Fucoxanthin- und EPA-Ausbeute pro Mol Photonen bei einer niedrigen relativen Lichtverfügbarkeit bis auf ein Maximum von  $Y_{FX} = 12,6 \pm 2,9 \text{ mg mol}^{-1}$  bzw.  $Y_{EPA} = 24,3 \pm 5,5 \text{ mg mol}^{-1}$  steigt. Während der biomassespezifische EPA- und Proteingehalt der Biomasse unter den untersuchten Lichteinstellungen weitestgehend konstant blieb, stieg der Fucoxanthingehalt bei niedriger Lichtverfügbarkeit auf einen Maximalwert von  $20,1 \pm 1,6 \text{ mg g}^{-1}$  an. Dies entspricht einer Steigerung gegenüber höheren Lichtverfügbarkeiten um etwa 20 %. Es ist somit prinzipiell möglich, das bereits qualitativ auf zellulärer Ebene beschriebene Phänomen der Photoakklimatisation von Diatomeen, durch Anpassung der relativen Lichtverfügbarkeit zur gezielten Beeinflussung des Fucoxanthingehaltes im FPA-PBR prozesstechnisch zu nutzen (Janssen et al., 2000; Nymark et al., 2009). Die maximale volumetrische Fucoxanthinproduktivität von  $22,4 \pm 7,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  wurde, aufgrund der sehr hohen Biomasseproduktivität, bei maximaler relativer Lichtverfügbarkeit von  $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$  erreicht. Dies ist nach Kenntnisstand des Autors der bislang höchste publizierte Wert zur Produktion von Fucoxanthin auf Basis von Mikroalgen in Photobioreaktoren.

Wie in Kap. 5.3.5 und 5.3.6 beschrieben, können die gewonnenen Erkenntnisse u.a. dazu dienen, mehrstufige Kultivierungsstrategien für die Produktion von Fucoxanthin mit Diatomeen zu etablieren und auch um Rückschlüsse auf einen geeigneten Erntezeitpunkt (z.B. bei der Kultivierung im Freiland) zu ziehen. Erste Ansätze für einen zweistufigen Prozess, durch eine sequenzielle Durchführung einer Wachstumsphase unter hoher Lichtverfügbarkeit gefolgt von einer Lichtlimitierung zur Fucoxanthin-Anreicherung konnte hierfür im Sinne eines „Proof of Concept“ bereits dargestellt werden.

## **5.4 Subkritische Fest-Flüssig-Extraktion von Lipiden aus *P. tricornutum***

Zur Etablierung und Optimierung eines Fest-Flüssig-Extraktionsverfahrens für die Inhaltstoffe Fucoxanthin und EPA aus *P. tricornutum*-Biomasse wurde die Algenbiomasse zunächst

mechanisch aufgeschlossen und anschließend einer subkritischen Hochdruckflüssigextraktion (PLE) zur Erzeugung von EPA- und Fucoxanthin-reichen Lipidfraktionen unterzogen. Zur Extraktion der aufgeschlossenen *P. tricornutum*-Biomasse dienten in dieser Arbeit nur organische Lösungsmittel, welche im Zusammenhang mit einer späteren Applikation der Extrakte im Bereich der Tier- und Humanernährung in der EU uneingeschränkt oder mit Einschränkungen verwendet werden dürfen (European Commission, 2009). Die Evaluation eines geeigneten Lösungsmittels ist notwendig, da in bisherigen Studien zur Extraktion von Lipiden aus Mikroalgenbiomasse häufig Lösungsmittel wie Chloroform, Dichlormethan oder Diethylether verwendet werden (Ryckebosch et al., 2012; Otero et al., 2017). Diese Lösungsmittel könnten zwar im Kontext einer energetischen Nutzung einer Lipidfraktion aus Mikroalgen verwendet werden, sind jedoch zur Extraktion von Produkten für den Nahrungs-, Kosmetik- oder Futtermittelbereich aufgrund legislativer Regularien, z.B. in der EU, ungeeignet.

Neben der Art des Lösungsmittels wurde in dieser Arbeit primär der Einfluss der Extraktionstemperatur näher betrachtet, welcher u.a. durch Shang et al. (2011) als wesentlicher Parameter bei der subkritischen Extraktion von Fucoxanthin aus Makroalgen identifiziert wurde (Shang et al. 2011). Wenngleich der Einfluss des Extraktionsdruckes in der vorliegenden Arbeit nicht genauer untersucht wurde, sei an dieser Stelle erwähnt, dass der während der subkritischen Fest-Flüssig-Extraktion angelegte Druck primär dazu dient, das jeweilige Lösungsmittel bei Temperaturen oberhalb des Siedepunktes im flüssigen Aggregatzustand zu halten und somit einen Übergang in die Gasphase zu verhindern. Der erhöhte Druck kann jedoch auch weitere positive Effekte auf die Fest-Flüssig-Extraktion haben. Ursächlich hierfür kann nach Richter et al. (1996) u.a. ein erhöhter Kontakt des Lösungsmittels mit den Zielkomponenten, bedingt durch das Eindringen in schwer erreichbare Poren in der Feststoffmatrix, sein (Richter et al., 1996). Generell ist es aufgrund des Vorkommens von sehr unterschiedlicher Lipidklassen in verschiedenen Mikroalgenpezies notwendig, empirische Daten für die Extraktion jeder spezifischen Mikroalgenpezies zu erheben, da eine Übertragbarkeit vorhandener Daten aus der Literatur für andere Spezies nur sehr eingeschränkt möglich ist (Cooney et al., 2009).

#### **5.4.1 Einfluss des Zellaufschlusses auf die Extraktionsausbeute**

Die Notwendigkeit eines Zellaufschlusses vor der Extraktion von intrazellulären Thylakoidbestandteilen wie EPA, Fucoxanthin sowie auch Proteinen aus *P. tricornutum*-Biomasse wurde bereits umfassend durch Seibert (2013) und Haussmann (2019) dargestellt (Seibert, 2013; Haussmann, 2019). In der vorliegenden Arbeit wurden daher die durch Seibert (2013) für EPA

optimierten Aufschlussparameter für einen mechanischen Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle (RWKM) verwendet. Wenngleich der Zellaufschluss keinen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit darstellt, untermauern im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Daten (siehe Abb. 26) zur Extraktion von Fucoxanthin und EPA aus unaufgeschlossener *P. tricornutum*-Biomasse den positiven Einfluss eines Zellaufschlusses vor der Lipidextraktion auf die Extraktionsausbeute.

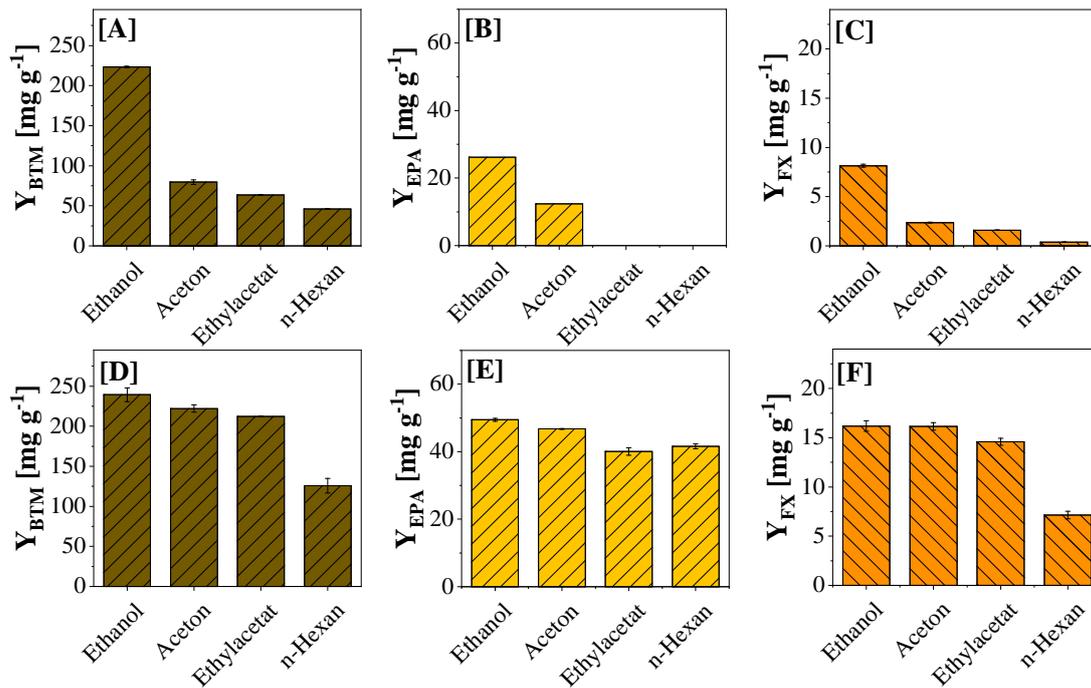


Abbildung 26: Dargestellt ist die Extraktionsausbeute an Gesamtlipiden  $Y_{BTM}$ , an Eicosapentaensäure  $Y_{EPA}$  und an Fucoxanthin  $Y_{FX}$  aus nicht-aufgeschlossener [A-C], sowie aufgeschlossener [D-F] Biomasse von *P. tricornutum* mittels PLE. Extrahiert wurde mit verschiedenen Lösungsmitteln bei 100 °C, 100 bar und einer statischen Verweilzeit von jeweils 20 min gemäß Kap. 4.5.2. Der Zellaufschluss erfolgte wie in Kap. 4.5.1 beschrieben.

Wie Abb. 26 zeigt, ist eine effiziente Extraktion der Zielkomponenten, insbesondere mit mittel- bis unpolaren Lösungsmitteln wie Ethylacetat oder n-Hexan, ohne vorherigen Zellaufschluss nicht möglich. Ursächlich hierfür könnte die dreilagige Zellwand von *P. tricornutum* sein, welche neben der Silicatschicht aus einer inneren und einer äußeren organischen Polysaccharidschicht besteht, und das Eindringen von unpolaren Lösungsmitteln erschwert (Tesson et al., 2009; Le Costaouëc et al., 2017). Neben der Zellwand sind beide Zielprodukte zudem entweder Bestandteil der überwiegend aus polaren Glycolipiden bestehenden Thylakoidmembran oder von ihr umschlossen (Lepetit et al., 2012). Ähnlich wie bereits von Pieber et al. (2012) für die Mikroalgen *N. oceanica* beobachtet, können mit polaren Lösungsmitteln wie Ethanol zwar Teile des EPA und auch Fucoxanthin als lipophile Fraktion gewonnen werden (siehe Abb. 26 A bis C), da sie aufgrund der Polarität eher in der Lage sind

die Zellwand zu durchdringen, die Ausbeuten lagen jedoch über 50 % unter denen von zuvor aufgeschlossener Biomasse (Pieber et al., 2012). Eine Aufschlusskinetik der in dieser Arbeit verwendeten Biomasse ist im Anhang dargestellt (siehe Anhang, Kap. A2.1).

#### 5.4.2 Einfluss des Lösungsmittels und der Temperatur auf die Gesamtlipidausbeute

Abb. 27 A zeigt die mittels PLE erzielte Ausbeute an extrahierter lipophiler Biotrockenmasse (BTM) aus aufgeschlossener *P. tricorutum* Biomasse in Abhängigkeit von der Extraktionstemperatur und dem verwendeten organischen Lösungsmittel. Zu erkennen ist, dass die BTM-Ausbeute mit steigender Temperatur, insbesondere bei  $T > 150$  °C bei allen verwendeten Lösungsmitteln ansteigt. Im subkritischen Temperaturbereich ( $\geq 100$  °C) zeigt Ethanol bei allen untersuchten Extraktionstemperaturen die höchste BTM-Ausbeute mit einem Maximum von  $605,8 \pm 4,1$  mg g<sup>-1</sup> bei 200 °C.

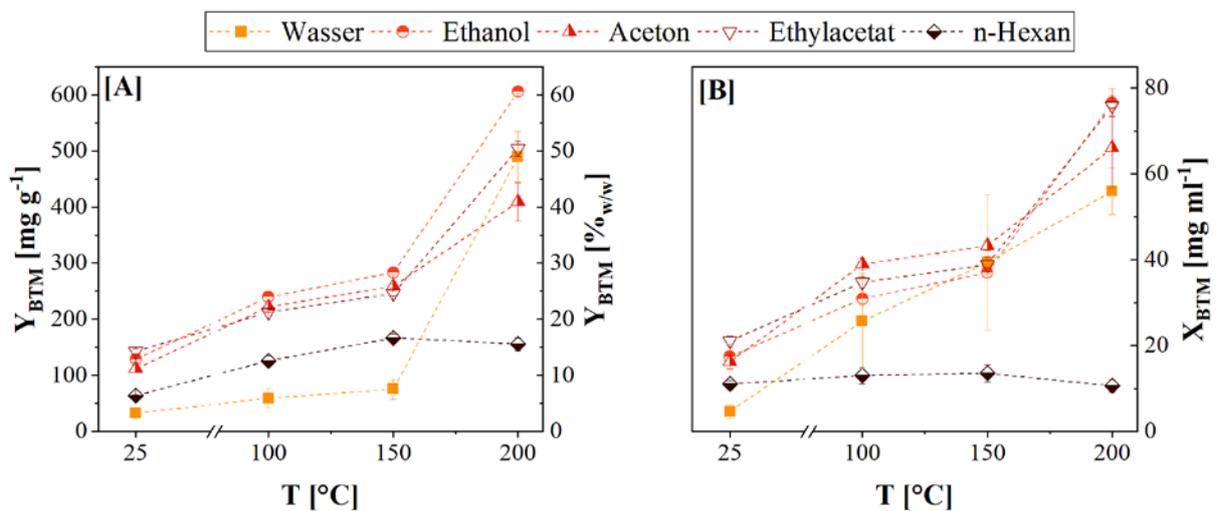


Abbildung 27: Dargestellt ist die gravimetrische Ausbeute  $Y_{BTM}$  an gelöster Biotrockensubstanz (lipophile/ölige Fraktion  $< 0,25\mu\text{m}$ ) bezogen auf die eingesetzte aufgeschlossene *P. tricorutum*-Biotrockenmasse nach Extraktion mittels PLE mit verschiedenen Lösungsmitteln bei 25, 100, 150 und 200 °C und Evaporation des Lösungsmittels [A] sowie die korrespondierende Beladung  $X_{BTM}$  des Lösungsmittels [B]. Die statische Extraktionszeit betrug  $t = 20$  min mit einem Druck von  $p = 100$  bar. Extrahiert wurde gemäß Kap. 4.5.2. Dargestellt sind Mittelwerte ( $n = 3$ ) sowie die mittlere Standardabweichung.

Die Daten zeigen, dass es insbesondere mit polaren Lösungsmitteln möglich ist, aus *P. tricorutum* vergleichsweise viele lipophile Stoffe zu extrahieren, anders als es bei Mikroalgenpezies wie *N. oceanica* oder *C. vulgaris* der Fall ist (Derwenskus et al., 2019). Ursächlich hierfür könnte das hohe Maß an membrangebundenen Glycolipiden wie MGDG, DGDG und SQDG in *P. tricorutum* gegenüber anderen Spezies sein, deren Fettsäuren, insbesondere wenn die Biomasse unter Nährstofflimitierung erzeugt wurde, primär in Form von Triacylglyceriden (TAG) als Speicherlipide vorliegen (Yang et al., 2017). Während TAG einen

unpolaren Charakter besitzen, sind die Glycolipidklassen (MGDG, DGDG und SQDG) aufgrund der gebundenen Zucker eher polar und begünstigen daher die Löslichkeit der gebundenen Fettsäuren in polaren Lösungsmittel (siehe hierzu auch Kap. 2.5.1).

Die gezeigten Daten stehen im Einklang mit den Daten von Fajardo et al. (2007), in deren Studie ebenfalls das polare Lösungsmittel Ethanol bei einer mehrstufigen Mazeration von *P. tricornutum*-Biomasse zur Lipidextraktion (Öl) hohe Ausbeuten zeigte, wenngleich hier deutlich längere Extraktionszeiten von bis zu 24 h verwendet wurden. Abb. 27 B zeigt die Beladung der Lösungsmittel nach der Extraktion bei verschiedenen Temperaturen. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass das eingesetzte Lösungsmittelvolumen, in Abhängigkeit des jeweiligen Ausdehnungskoeffizienten des Lösungsmittels und der Fähigkeit in die Feststoffmatrix einzudringen, technisch bedingt variieren kann, da der Aufbau des Extraktionsdruckes in der Versuchsanordnung über die Zufuhr des Lösungsmittels über eine Hochdruckpumpe in die Extraktionszelle realisiert wurde (siehe Kap. 4.5.2).

Die Ergebnisse zeigen, dass n-Hexan, mit Ausnahme von Wasser (bei 25 °C), die geringste Biotrockenmassebeladung aller untersuchten organischen Lösungsmittel aufweist. Diese liegt mit  $13,0 \pm 1,9 \text{ mg ml}^{-1}$  (bei 100 °C) um Faktor zwei bis vier niedriger als bei den anderen untersuchten Lösungsmitteln.

### **5.4.3 Einfluss des Lösungsmittels und der Temperatur auf die EPA-Ausbeute**

Anders als im Fall der Gesamtbiotrockensubstanz (vorheriges Kapitel) steigt die Extraktionsausbeute für EPA bei Extraktionstemperaturen über 100 °C für alle untersuchten Lösungsmittel nicht an, sondern bewegt sich auf einem gleichbleibenden Niveau (Abb. 28 A). Die maximale EPA-Ausbeute von  $49,5 \pm 0,4 \text{ mg g}^{-1}$  bei einmaliger Extraktion wurde mit Ethanol bei 100 °C erreicht. Bezogen auf die verwendete Referenzmethode von Lepage und Roy (1984) entspricht dies einer EPA-Ausbeute von etwa 90 %<sub>w/w</sub> (Lepage und Roy, 1984). Auffällig ist, dass auch mit unpolarem Lösungsmittel n-Hexan bei 100 °C eine relativ hohe EPA-Ausbeute von  $41,6 \pm 0,7 \text{ mg g}^{-1}$  erreicht wird. Dies ist unter Betrachtung des allgemeinen Grundsatzes „*similia similibus solvuntur*“ (lat. „Ähnliches löst sich in ähnlichem“) im Hinblick auf die unter Wachstumsbedingungen überwiegend polaren Lipidklassen in *P. tricornutum*, zu deren Hauptbestandteil auch EPA zählt, eher überraschend (Remmers et al., 2017). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die als Glycolipid vorliegenden Fettsäuren unter Hitzeeinwirkung ( $\geq 100 \text{ °C}$ ) freigesetzt werden und als freie Fettsäuren in das Lösungsmittel übergehen. Dieser Sachverhalt konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden, da keine Analytik zum quantitativen Nachweis einzelner Glycolipidklassen zur

Verfügung stand. Die in dieser Arbeit verwendete gaschromatographische Methode zur Fettsäurebestimmung (siehe Kap. 4.6.4) erlaubt keine Differenzierung zwischen einzelnen Lipidklassen, da diese zunächst hydrolysiert werden und die freien Fettsäuren anschließend als Fettsäuremethylester detektiert werden.

Insgesamt stehen die gezeigten Ergebnisse im Einklang mit den Daten von Pieber et al. (2012), die bei der subkritischen Extraktion von *N. oceanica*-Biomasse ebenfalls mit dem unpolaren Lösungsmittel n-Hexan den höchsten EPA-Massenanteil im Extrakt ( $14.9 \text{ mg g}^{-1}$ ) erreichten. Ein Vergleich des Fettsäureprofils der in dieser Arbeit mit unterschiedlichen Lösungsmitteln extrahierten Fraktionen zeigte keine signifikante Änderung des Gesamtfettsäure-zu-EPA-Verhältnisses gegenüber der Ausgangsbiomasse. Somit ist durch keines der ausgewählten Lösungsmittel eine selektive Extraktion von EPA gegenüber anderen Fettsäuren erfolgt.

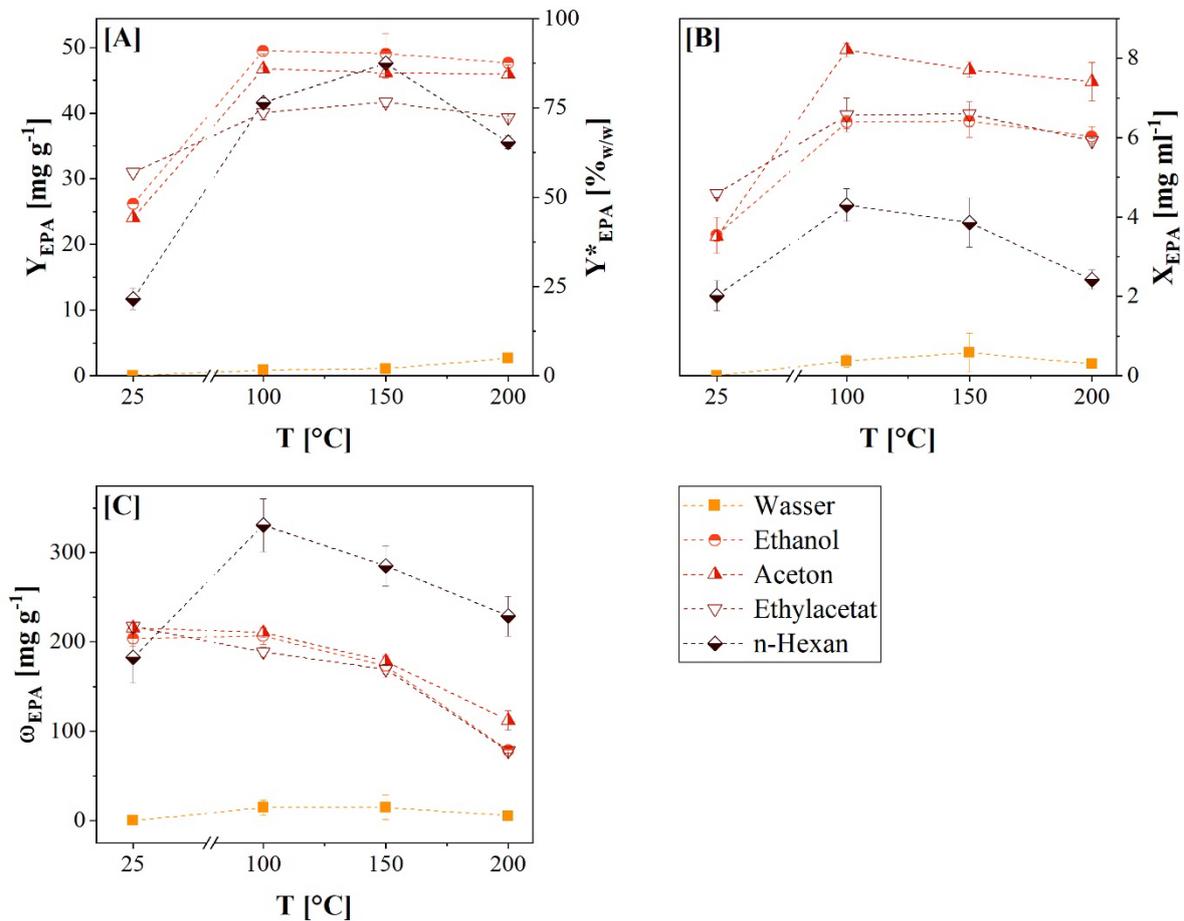


Abbildung 28: Dargestellt ist die EPA-Ausbeute  $Y_{\text{EPA}}$  bezogen auf die eingesetzte *P. tricorutum*-Biotrockenmasse und die maximal verfügbare EPA-Menge in der Biomasse  $Y^*_{\text{EPA}}$  nach Lepage und Roy (1984) [A], die volumetrische Beladung der verschiedenen Lösungsmittel nach der subkritischen Extraktion [B] sowie der Massenanteil von EPA bezogen auf die extrahierte Gesamttrockensubstanz der Extrakte [C] (Lepage und Roy, 1984). Die Extraktion der Biomasse (1 g) erfolgte bei  $T = 25, 100, 150$  und  $200 \text{ °C}$ , einer statischen Extraktionszeit von  $t = 20 \text{ min}$  und einem Druck von  $p = 100 \text{ bar}$ . Extrahiert wurde gemäß Kap. 4.5.2. Dargestellt sind Mittelwerte ( $n = 3$ ) sowie die mittlere Standardabweichung.

Eine Erhöhung der Temperatur  $> 100\text{ °C}$  erscheint im Hinblick auf die erhöhte Trockenmasse-Ausbeute bei hohen Extraktionstemperaturen (Abb. 27 A, vorheriges Kapitel) und des Ziels eines möglichst hohen EPA-Massenanteils im Extrakt (Abb. 28 C), als Maß für die Reinheit eines Extraktes, nicht sinnvoll. Die Abnahme des EPA-Massenanteils, bedingt durch die Zunahme der Gesamtlipidausbeute bei steigender Temperatur, wird in Abb. 28 C für alle Lösungsmittel mit Ausnahme von Wasser deutlich. Der maximale EPA-Massenanteil von  $330,9 \pm 29,6\text{ mg g}^{-1}$  wird dabei mit n-Hexan bei  $100\text{ °C}$  erreicht. Dies entspricht einer Aufkonzentrierung des EPA-Anteils gegenüber der Ausgangsbiotrockenmasse um etwa den Faktor 6. Der Anteil der Gesamtfettsäuren am Lipidextrakt betrug in diesem Fall  $608,7 \pm 53,6\text{ mg g}^{-1}$ . Somit stellen die Fettsäuren mit etwa  $60\text{ %}_{w/w}$  den wesentlichen Teil der in der Lipidfraktion enthaltenen Biotrockenmasse dar. Folglich sind etwa  $50\text{ %}_{w/w}$  der im Extrakt enthaltenen Fettsäuren EPA.

#### 5.4.4 Einfluss der statischen Verweilzeit auf die EPA-Ausbeute

Abb. 29 A zeigt die EPA-Ausbeute in Abhängigkeit der Verweilzeit des Extraktionsgutes in der Extraktionszelle. Zwar wurde die maximale Ausbeute von  $49,4 \pm 0,4\text{ mg g}^{-1}$  bei einer statischen Verweilzeit von 20 min erreicht, es wird jedoch deutlich, dass bereits kurze statische Verweilzeiten im Bereich von null bis fünf Minuten bereits Ausbeuten von  $34,9 \pm 1,3\text{ mg g}^{-1}$  ermöglichen. Auffällig ist, dass bereits statische Verweilzeiten von 0 min, d.h. alleine die Zeitspanne des technischen Aufheizvorgangs des Reaktionsgefäßes auf die jeweilige Endtemperatur (in diesem Fall 5 min für eine Extraktionszelle mit einem Volumen von 5 ml) ausreicht, um erhebliche EPA-Mengen zu extrahieren.

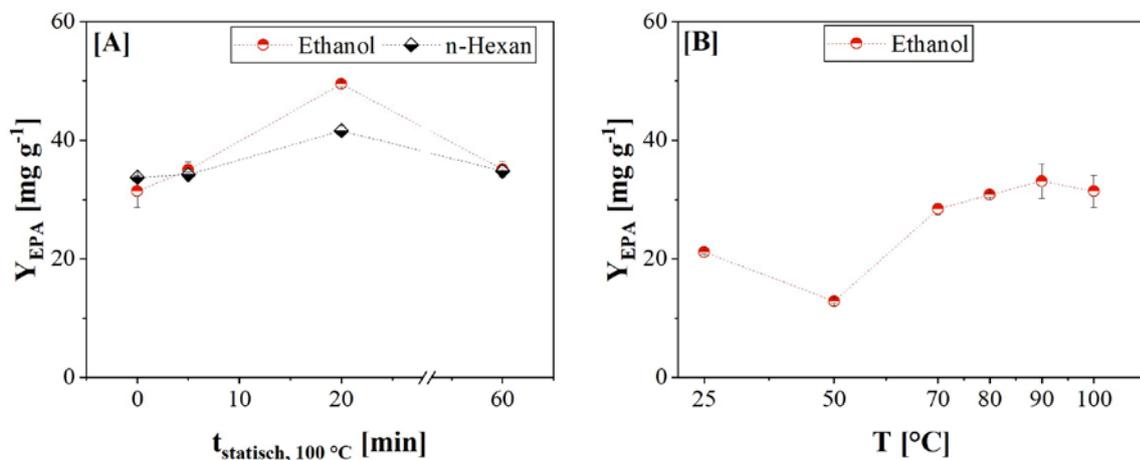


Abbildung 29: Dargestellt ist die EPA-Ausbeute bei unterschiedlichen statischen Verweilzeiten des Extraktionsgutes in der Extraktionszelle [A] sowie bei unterschiedlichen Extraktionstemperaturen [B] und einer statischen Verweilzeit von 0 min (nur Aufheizvorgang auf Zieltemperatur). Extrahiert wurde bei einem Druck von  $p = 100\text{ bar}$  gemäß Kap. 4.5.2. Dargestellt sind Mittelwerte ( $n = 3$ ) sowie die mittlere Standardabweichung

Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Co-Extraktion des potentiell thermosensitiven Fucoxanthins, wie in Kap. 5.4.5 dargestellt, vorteilhaft. Die Ergebnisse (Abb. 29 A) deuten zudem bis zu einer Verweilzeit von 20 min nicht auf einen thermischen Abbau der Fettsäure bei 100 °C hin. Bei einer Verweilzeit von 60 min ist jedoch ein Rückgang der Extraktionsausbeute zu erkennen. Ferner zeigt Abb. 29 B einen Anstieg der EPA-Ausbeute bis zu Extraktionstemperaturen von 80 °C. Eine weitere Temperaturerhöhung auf 100 °C zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Extraktionsausbeute.

#### **5.4.5 Einfluss des Lösungsmittels und der Temperatur auf die Fucoxanthinausbeute**

Bei der Extraktion von Fucoxanthin zeigte sich, anders als bei EPA, ein deutlich negativer Einfluss von Temperaturen > 100 °C auf die Extraktionsausbeute (Abb. 30 A), welche daher näher untersucht wurde (Kap. 5.4.6). Die maximale Ausbeute von  $16,2 \pm 0,5 \text{ mg g}^{-1}$  bei einmaliger Extraktion für 20 min wurde mit Ethanol bei 100 °C erreicht. Diese unterscheidet sich allerdings nicht signifikant von der Ausbeute mit Aceton. Durch zwei nachfolgende Extraktionszyklen ( $t = 20 \text{ min}$ ,  $T = 100 \text{ °C}$ ) mit Ethanol konnte die Fucoxanthinausbeute auf den Maximalwert von  $17,61 \pm 0,6 \text{ mg g}^{-1}$  gesteigert werden. Durch einmalige Extraktion war es somit bezogen auf diesen Referenzwert möglich, etwa 92 % des Fucoxanthins zu extrahieren.

Die beobachtete thermische Instabilität von Fucoxanthin steht im Einklang mit den von Shang et al. (2011) zur Hochdruckflüssigextraktion von Fucoxanthin aus Makroalgen veröffentlichten Daten. Die Gruppe stellte in ihrer Studie ebenfalls eine maximale Fucoxanthinausbeute mit Ethanol (90%) bei 110 °C aus der Makroalge *Eisenia bicyclis* mittels PLE fest, wobei neben der Wahl des Lösungsmittels insbesondere die Extraktionstemperatur als entscheidender Einflussfaktor bezogen auf die Ausbeute identifiziert wurde (Shang et al., 2011).

Die berechneten Fucoxanthinausbeuten (Abb. 30 A) korrelieren zudem mit Daten der Gruppe um Kim et al. (2012), in deren Studien ebenfalls Ethanol, Aceton und Ethylacetat die höchsten Ausbeuten bei der Fest-Flüssig-Extraktion als auch der Mazeration von Fucoxanthin aus *P. tricornutum* und *Isochrysis aff. galbana* zeigten (Kim et al., 2012a, 2012b; Kim, 2014). In den Studien der Gruppe um Kim et al. (2012) wurde eine maximale Ausbeute von  $15,71 \text{ mg g}^{-1}$  mittels PLE aus *P. tricornutum* bei einer statischen Extraktionszeit von 30 min, einer Extraktionstemperatur von 80 °C und einem LM/BTM-Verhältnis von etwa 20:1 erreicht. Eine vergleichbare Ausbeute von  $16,33 \text{ mg g}^{-1}$  wurde in derselben Studie mittels Mazeration erst nach 60 min mit einem deutlich höheren LM/BTM-Verhältnis von 50:1 (v/w) erreicht. Die hier

gezeigten Ergebnisse machen deutlich, dass ähnliche Ausbeuten ( $16,2 \pm 0,5 \text{ mg g}^{-1}$ ) in der PLE bereits bei einem noch deutlich geringeren Ethanol zu BTM-Verhältnis erreicht werden können. Wie in Abb. 30 B zu erkennen, lag das LM/BTM-Verhältnis im Fall von Ethanol mit einer Fucoxanthinbeladung  $X_{\text{FX}} = 2,1 \pm 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$  unter 8:1 (v/w). Es besteht hier somit erhebliches Potential, Lösungsmittel einzusparen. Die hier gezeigten Fucoxanthinausbeuten liegen über denen von Pasquet et al. (2011) publizierten Daten zur ultraschall-unterstützten („Ultrasound-assisted extraktion“, UAE) und mikrowellen-unterstützten Extraktion („Vacuum-microwave assisted extraction“, VMAE) von Fucoxanthin aus *Cylindrotheca closterium*-Biomasse (Pasquet et al., 2011). Beide untersuchten Verfahren lieferten Fucoxanthinausbeuten  $< 5 \text{ mg g}^{-1}$  bei Verwendung von Aceton als Lösungsmittel.

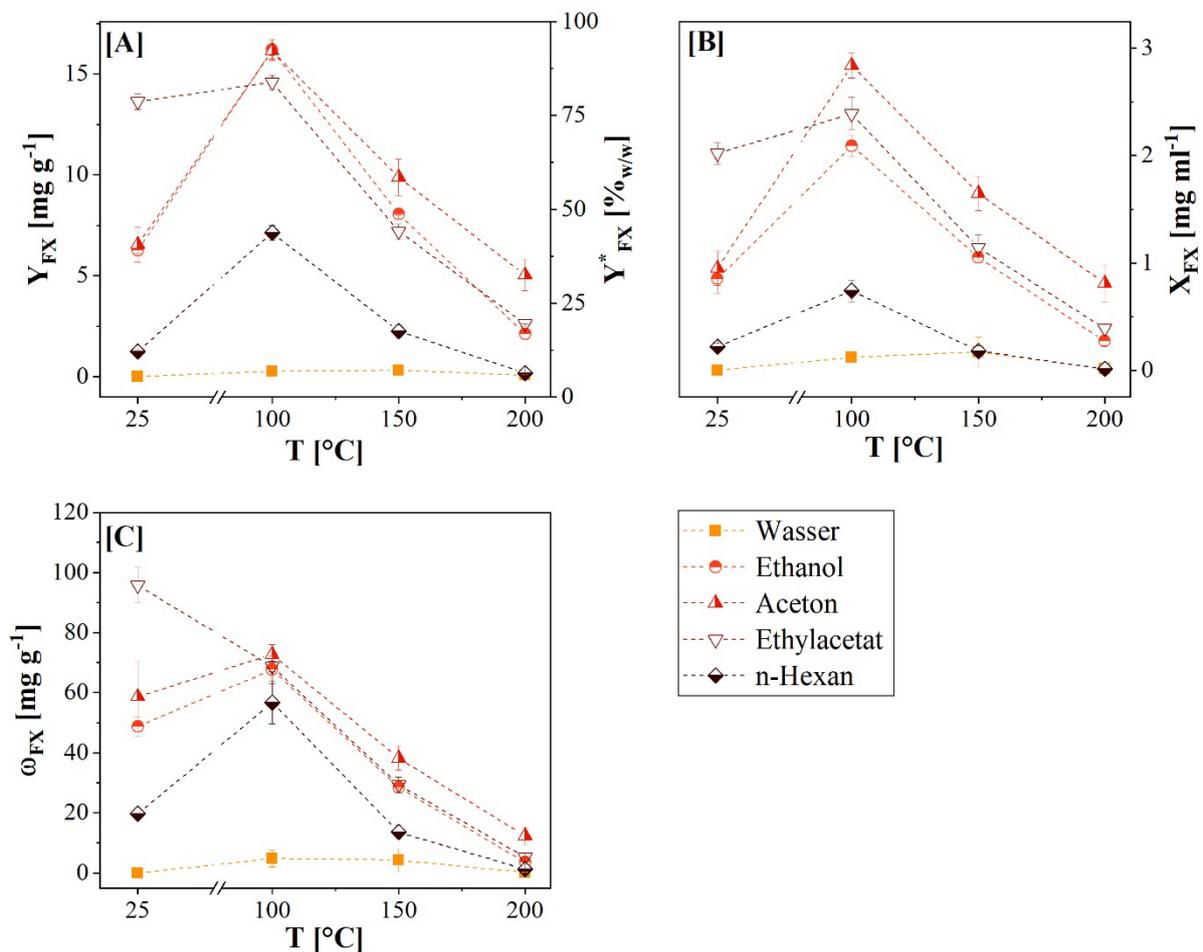


Abbildung 30: Dargestellt ist die Fucoxanthin-Ausbeute  $Y_{\text{FX}}$  bezogen auf die eingesetzte *P. tricornutum* Biotrockenmasse und die maximal verfügbare Fucoxanthinmenge in der Biomasse  $Y^*_{\text{FX}}$  [A], die volumetrische Beladung der verschiedenen Lösungsmittel nach der subkritischen Extraktion [B] sowie der Massenanteil des Fucoxanthins bezogen auf die extrahierte Gesamttrockensubstanz der Extrakte [C]. Die Extraktion der Biomasse (1 g) erfolgte bei  $T = 25, 100, 150$  und  $200 \text{ °C}$ , einer statischen Extraktionszeit von  $t = 20 \text{ min}$  und einem Druck von  $p = 100 \text{ bar}$  gemäß Kap. 4.5.2. Dargestellt sind Mittelwerte ( $n = 3$ ) sowie die mittlere Standardabweichung.

Vergleicht man die mit Ethanol und Ethylacetat (Abb. 30 B) erreichten Beladungen der Lösungsmittel von  $2,1 \pm 0,1 \text{ mg ml}^{-1}_{\text{Ethanol}}$  bzw.  $2,4 \pm 0,2 \text{ mg ml}^{-1}_{\text{Ethylacetat}}$  ( $T = 100 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $t = 20 \text{ min}$ ) mit den Daten der Gruppe um Delbrut et al. (2018), die aus aufgeschlossener *P. tricornutum* Biomasse mittels Mazeration ( $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t = 60 \text{ min}$ , unter Atmosphärendruck) maximal  $0,45 \text{ mg ml}^{-1}_{\text{Ethanol}}$  bzw.  $0,3 \text{ mg ml}^{-1}_{\text{Ethylacetat}}$  extrahierten, so deuten die hier gezeigten Daten daraufhin, dass mittels PLE bei erhöhter Extraktionstemperatur deutlich mehr Fucoxanthin pro Lösungsmittelvolumen und pro Zeiteinheit extrahiert werden kann (Delbrut et al., 2018). Gleichwohl sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Ausgangsbiomasse sowie der verwendeten Aufschlussmethode nur mit Einschränkungen verglichen werden können.

Auffallend ist die Fucoxanthin-Ausbeute von  $7,1 \pm 0,4 \text{ mg g}^{-1}$  mit n-Hexan bei  $100^\circ\text{C}$  sowie die korrespondierende Beladung von  $0,74 \pm 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ , da Fucoxanthin in der Literatur bei RT in n-Hexan als nahezu unlöslich gilt (Kim et al., 2012a; Xia et al., 2013). Bei Abkühlung der erzeugten n-Hexan-Extrakte auf RT war ein Niederschlag roter Partikel zu beobachten, deren Hauptbestandteil nachfolgend als Fucoxanthin identifiziert werden konnte. Die Ergebnisse stehen somit keineswegs im Widerspruch zu den veröffentlichten Löslichkeitsdaten von Kim et al. (2012a). Die Ergebnisse deuten vielmehr auf eine bisher nicht näher betrachtete temperaturabhängige Löslichkeit von Fucoxanthin in n-Hexan hin, welche weiterführend in Kap. 5.5 untersucht und diskutiert wird.

#### **5.4.6 Einfluss der statischen Verweilzeit auf die Fucoxanthinausbeute**

Die zuvor in Abb. 30 A bis C gezeigten Daten legen die Vermutung nahe, dass ein thermisch bedingter Abbau von Fucoxanthin bei Extraktionstemperaturen im subkritischen Bereich der Lösungsmittel erfolgt. Über die Stabilität von Fucoxanthin bei Exposition mit verschiedenen Umwelteinflüssen (z.B. Temperatur, Licht, pH-Wert) ist bisher relativ wenig bekannt. Die wenigen verfügbaren Studien, welche mit Fucoxanthin aus Makroalgen durchgeführt wurden, zeigen jedoch, dass das Xanthophyll bei Lagerung in Lösungsmitteln photoinstabil aber auch thermoinstabil ist (Hii et al., 2010; Piovan et al., 2013; Zhao et al., 2014). Es wurde daher untersucht, inwieweit die Extraktionstemperatur und statische Verweilzeit des Extraktionsgutes in der PLE reduziert werden können, um eine thermische Zersetzung möglichst zu vermeiden.

Abb. 31 A zeigt am Beispiel von Ethanol, dass bei  $T = 100 \text{ }^\circ\text{C}$  speziell statische Verweilzeiten über 20 min zu einer Reduktion der Fucoxanthinausbeute führen. So resultierte eine Erhöhung der statischen Verweilzeit von 0 auf 60 min bei  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  im Fall von Ethanol beispielsweise in einer um 37,4 % reduzierten Ausbeute.

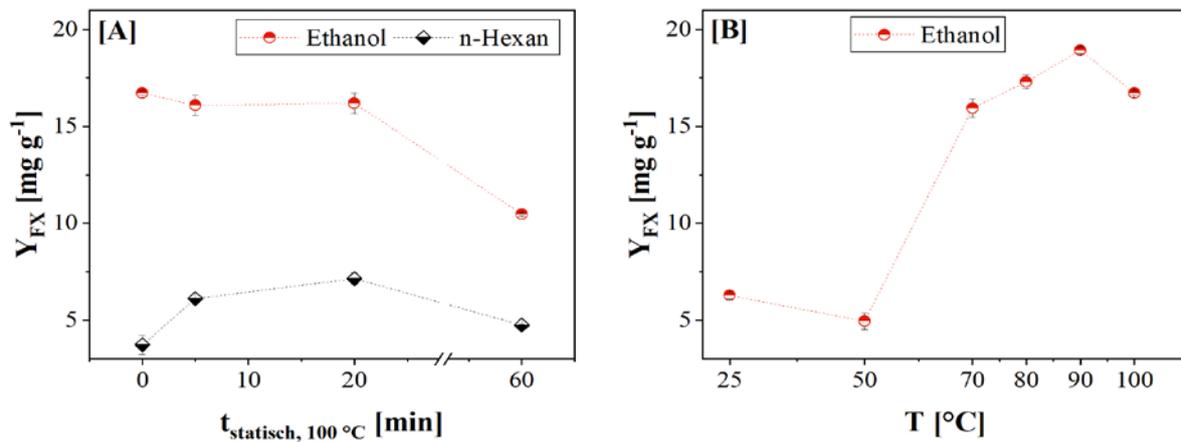


Abbildung 31: Dargestellt ist die Fucoxanthin-Ausbeute  $Y_{FX}$  bezogen auf die eingesetzte *P. tricornutum* Biotrockenmasse in Abhängigkeit von der statischen Verweilzeit (bei 100 °C) [A] und in Abhängigkeit der Extraktionstemperatur [B] bei einer Verweilzeit von 0 min (nur Aufheizvorgang auf Zieltemperatur). Extrahiert wurde bei einem Druck von  $p = 100$  bar gemäß Kap. 4.5.2. Dargestellt sind Mittelwerte ( $n = 3$ ) sowie die mittlere Standardabweichung.

Gleichzeitig wird aus Abb. 31 A aber auch deutlich, dass bei Extraktion mit n-Hexan selbst bei höheren Temperaturen eine statische Verweilzeit  $\geq 5$  min notwendig ist, um Fucoxanthin in Lösung zu bringen. Es ist in diesem Fall somit notwendig abzuwägen, wieviel Temperatur und Zeit notwendig ist, um das Fucoxanthin im n-Hexan zu lösen, ohne einen thermischen Abbau zu begünstigen. Ein praktikabler Kompromiss stellt in diesem Fall eine Extraktionszeit im Bereich von 20 min bei einer Temperatur von 90 °C dar.

Aus Abb. 31 B geht zudem hervor, dass unter Verwendung von Ethanol bereits durch den Aufheizvorgang auf die Zieltemperatur von 90 °C, d.h. bei einer statischen Verweilzeit von 0 min, ein wesentlicher Teil des Fucoxanthin extrahiert wird. Die erzielte Ausbeute lag dabei sogar höher als bei einer statischen Verweilzeit von 20 min (vgl. Abb. 31 A und 31 B). Eine geeignete Extraktionstemperatur von Fucoxanthin aus *P. tricornutum* mittels PLE scheint somit niedriger zu liegen, als bisher z.B. für Makroalgen empfohlen. So ermittelten Shang et al. (2011) eine optimale Extraktionstemperatur von 110 °C mit Ethanol (90 %) für die Fucoxanthinextraktion aus *Eisenia bicyclis* (Shang et al., 2011). Gleichzeitig stellten Shang et al. (2011) jedoch auch einen thermisch bedingten Abbau des Xanthophylls bei Temperaturen von 100 °C über einen Zeitraum von 60 min fest, wohingegen bei 80 °C über 60 min kein Abbau festzustellen war. Dies steht im Einklang mit den Daten dieser Arbeit.

Kim et al. (2012) publizierten erstmals Daten zur Extraktion von *P. tricornutum* mittels PLE (Kim et al., 2012a). In dieser Studie wurde als Lösungsmittel Ethanol bei einer Extraktionstemperatur von 100 °C und einer statischen Extraktionszeit von 30 min ohne eine vorherige

Optimierung der PLE-Methode verwendet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch in den Experimenten von Kim et al. (2012) bereits ein thermischer Verlust von Teilen des Fucoxanthins erfolgt sein muss. Ebenfalls legen die Ergebnisse eine Reduktion der Extraktionstemperatur der in Derwenskus et al. (2019) veröffentlichten Methode zur Quantifizierung des maximalen Fucoxanthingehaltes in *P. tricornutum* mittels mehrstufiger PLE von 100 °C auf 90 °C nahe.

### 5.4.7 Subkritische Extraktion von Fettsäuren und Fucoxanthin aus wässriger Mikroalgenbiomasse

Wie bereits in Derwenskus et al. (2019) publiziert, eignet sich die PLE insbesondere unter Verwendung mit Wasser mischbarer oder partiell-mischbarer organischer Lösungsmittel auch zur Extraktion von Fettsäuren und Carotinoiden aus feuchter Mikroalgenbiomasse (Abb. 32).

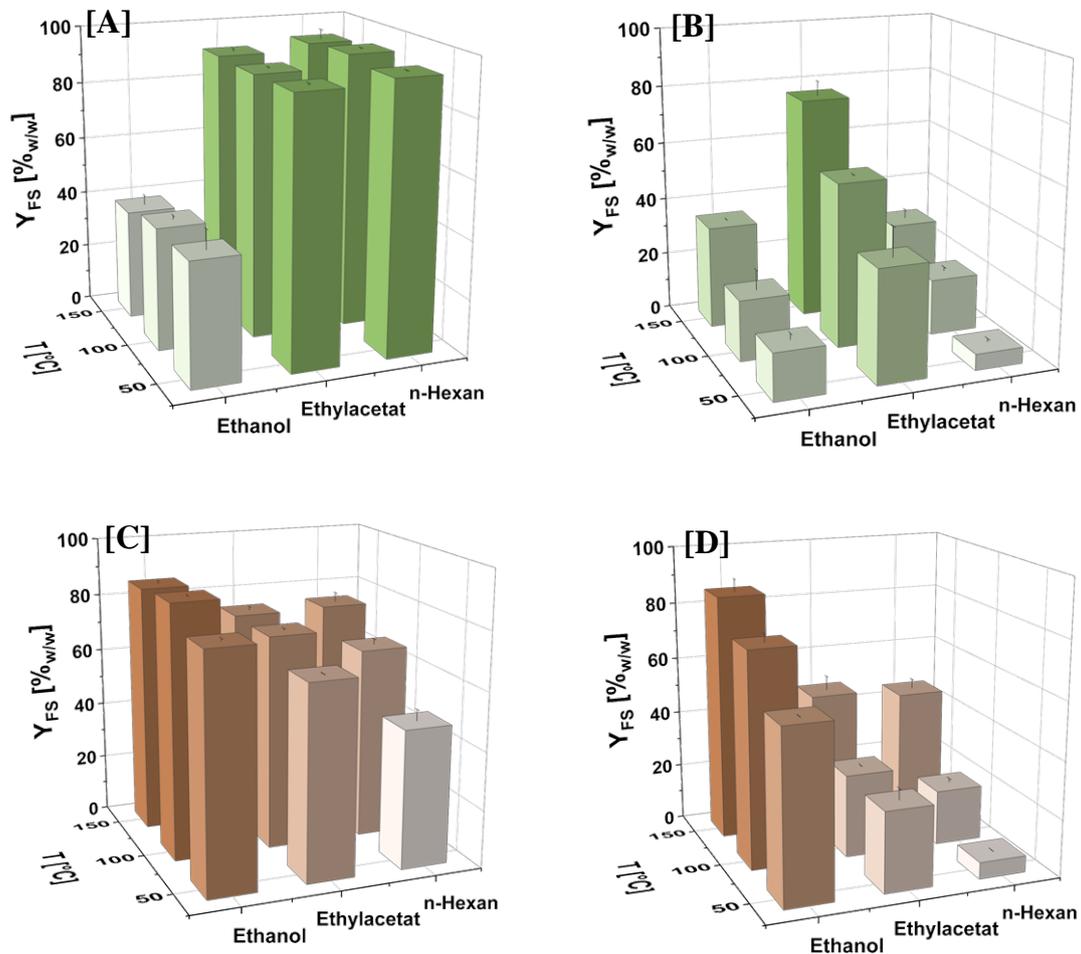


Abbildung 32: Dargestellt ist die Ausbeute an Fettsäuren  $Y_{FS}$  aus *C. vulgaris* (grün) und *P. tricornutum* (braun) ausgehend von getrockneter Biomasse [A,C] und Biomasse mit einem Biotrockenmasseanteil von 25 %w/w [B,D], jeweils bezogen auf die Referenzmethode von Lepage und Roy (1984). Extrahiert wurde jeweils 5 g Biotrockenmasse in Extraktionszellen mit einem Volumen von 100 ml bei den  $T = 50, 100$  und  $150$  °C,  $p = 100$  bar und bei einer statischen Verweilzeit  $t = 20$  min gemäß Kap. 4.5.2. Darstellung modifiziert aus Derwenskus et al. (2019).

Es ist somit theoretisch möglich, einen vorherigen energieintensiven Trocknungsschritt der Biomasse zu umgehen. Wie in Abb. 32 dargestellt, wurde in der Studie neben der Diatomee *P. tricornutum* (Abb. 32 C und D) auch die Extraktion lipidreicher Biomasse aus der Grünalge *Chlorella vulgaris* (Abb. 32 A und B) untersucht. Beide Spezies unterscheiden sich gravierend in ihrer makromolekularen Zusammensetzung. Die Fettsäuren in *P. tricornutum* liegen, wie zuvor bereits in Kap. 2.5.1 erläutert, überwiegend als Glycolipide (MGDG, DGDG und SQDQ) als Bestandteil der Thylakoidmembranen vor, wohingegen die Fettsäuren in *C. vulgaris* in Form von Speicherlipiden als Triacylglyceride (TAG) vorliegen (Münkel et al., 2013).

Die Ergebnisse zur Fettsäureextraktion mittels PLE aus aufgeschlossener Biomasse beider Mikroalgen in getrocknetem Zustand sowie mit einem Wasseranteil (70 %<sub>w/w</sub>) sind für die Lösungsmittel n-Hexan, Ethylacetat und Ethanol bis zu einer Extraktionstemperatur von 150 °C in Abb. 32 dargestellt. Zu erkennen ist, dass sich zur Fest-Flüssig-Extraktion von Fettsäuren aus getrockneter TAG-reicher *C. vulgaris* Biomasse (Abb. 32 A) insbesondere mittel- bis unpolare Lösungsmittel mit einer eher niedrigen Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  wie Ethylacetat ( $\epsilon = 6,1$ ) und n-Hexan ( $\epsilon = 1,9$ ) eignen. Gegenüber der Referenzmethode nach Lepage und Roy (1984) konnten mittels PLE in einem Extraktionsschritt mit Ethylacetat sowie n-Hexan jeweils über 90 %<sub>w/w</sub> der Fettsäuren extrahiert werden (Lepage und Roy, 1984). Anders als im Fall feuchter Biomasse (Abb. 32 B) zeigt die Extraktionstemperatur hier keinen signifikanten Einfluss auf die Extraktionsausbeute.

Für getrocknete *P. tricornutum* Biomasse liefern, wie bereits in Kap. 5.4.3 dargelegt, speziell polare Lösungsmittel wie Ethanol ( $\epsilon = 25,3$ ) eine hohe Fettsäureausbeute, wengleich bei Temperaturen  $\geq 100$  °C auch mit Ethylacetat und n-Hexan Ausbeuten von etwa 70 %<sub>w/w</sub> erzielt werden konnten. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen der Gruppe um Pieber et al. (2012), in deren Untersuchungen zur Hochdruckflüssigextraktion von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren aus der Mikroalge *Nannochloropsis oculata* unter vergleichbaren Bedingungen, ebenfalls polare Lösungsmittel wie Ethanol höhere Ausbeuten lieferten als z.B. n-Hexan (Pieber et al., 2012).

Bei Verwendung feuchter Biomasse von *C. vulgaris* lieferte lediglich Ethylacetat bei 150 °C Ausbeuten über 70 %<sub>w/w</sub> (siehe Abb. 32 B). Dies könnte der Tatsache geschuldet sein, dass Ethylacetat im Gegensatz zu n-Hexan mit Wasser ein azeotropes Gemisch bildet (Merriman, 1913). Der Wassergehalt des Gemisches steigt dabei unter erhöhtem Druck mit steigender Temperatur an und ermöglicht offenbar einen ausreichenden Kontakt zwischen Lösungsmittel und feuchtem Extraktionsgut.

Für feuchte *P. tricornutum* Biomasse lieferte Ethanol vermutlich aufgrund der generell guten Mischbarkeit mit Wasser sowie der guten Löslichkeit der Phospho- und Glycolipide in Ethanol die höchste Ausbeute. Die Ausbeute stieg mit steigender Temperatur von  $59,4 \pm 0,1$  %<sub>w/w</sub> auf bis zu  $85,9 \pm 4,4$  %<sub>w/w</sub> bei 150 °C.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass es notwendig ist, die Wahl des Extraktionsmittels spezifisch an die verwendete Mikroalgenpezies bzw. die in der Biomasse vorliegende fettsäurehaltige Lipidklasse anzupassen. Ferner ist die Extraktion einer Lipidfraktion mit Fettsäuren mittels PLE im Fall von *P. tricornutum* prinzipiell auch aus wässriger Biomasse (hier 25 %<sub>w/w</sub> Biotrockenmasse) mit polaren Lösungsmitteln wie Ethanol möglich. Zu beachten ist bei feuchter Biomasse jedoch generell, dass das entstehende Ethanol/Wasser-Gemisch nach der Extraktion vor der Wiederverwendung der Lösungsmittel destillativ getrennt werden muss, was einen zusätzlichen prozesstechnischen Aufwand bedeutet.

Neben den Fettsäuren konnte auch Fucoxanthin aus feuchter *P. tricornutum* Biomasse mittels PLE extrahiert werden (Abb. 33). Hierfür wurde im Anschluss an die Extraktion von gefriergetrockneter und feuchter *P. tricornutum*-Biomasse der Fucoxanthingehalt der erzeugten Lipidfraktionen ermittelt. Die maximale Fucoxanthinausbeute aus wässriger Biomasse von  $16,9 \pm 1,5$  mg g<sup>-1</sup> wurde hierbei mit Ethanol erreicht und lag damit nur geringfügig unter der Ausbeute von  $18,6 \pm 0,8$  mg g<sup>-1</sup> aus getrockneter Biomasse.

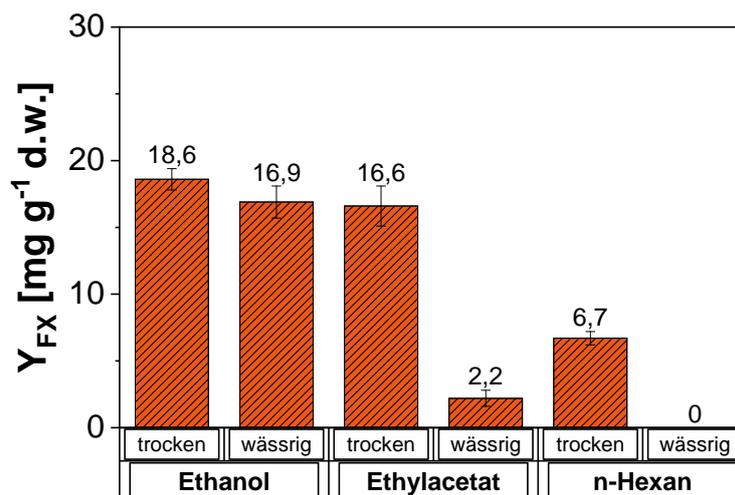


Abbildung 33: Dargestellt ist die Ausbeute an Fucoxanthin  $Y_{FX}$  aus *P. tricornutum* ausgehend von getrockneter Biomasse und Biomasse mit einem Biotrockenmasseanteil von 25 %<sub>w/w</sub>. Extrahiert wurden jeweils 5 g Biotrockenmasse in Extraktionszellen mit einem Volumen von 100 ml bei  $T = 100$  °C,  $p = 100$  bar und bei einer statischen Verweilzeit  $t = 20$  min gemäß Kap. 4.5.2.

#### 5.4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse zur subkritischen Fest-Flüssig-Extraktion

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich die Hochdruckflüssigextraktion zur Gewinnung EPA- und Fucoxanthin-reicher Lipidfraktionen aus aufgeschlossener *P. tricornutum* Biomasse eignet. Es konnte zudem erstmals die Anwendbarkeit der PLE zur Extraktion von Fucoxanthin und EPA aus feuchter *P. tricornutum* Biomasse gezeigt werden.

Die Fest-Flüssig-Extraktion von EPA mittels PLE ist prinzipiell mit allen untersuchten Lösungsmitteln, mit Ausnahme von Wasser, möglich. Die höchsten Ausbeuten lieferten jedoch polare Lösungsmittel wie Ethanol und Aceton, wohingegen der höchste biomassespezifische Massenanteil im Extrakt (Reinheit) mit n-Hexan erreicht wurde. Eine Extraktionstemperatur über 100 °C sowie eine Erhöhung der statischen Verweilzeit auf über 20 min führte dabei zu keiner signifikanten Steigerung oder Minderung der EPA-Ausbeute und erscheint insbesondere im Hinblick auf die Co-Extraktion des thermo-instabilen Fucoxanthins nicht sinnvoll. Die Ergebnisse zeigen, dass speziell höhere Extraktionstemperaturen (> 90 °C) das Xanthophyll schädigen. Aus dem genannten Grund sollte die Kontaktzeit zwischen Lösungsmittel und Biomasse so kurz wie möglich gehalten werden. Eine praktikable statische Verweilzeit im Anschluss an die technisch bedingte Aufheizphase lag im Bereich von 10 bis 20 min (bei 100 °C). Im Hinblick auf eine hohe Extraktionsausbeute von Fucoxanthin eignen sich insbesondere sehr polare bis mittel-polare Lösungsmittel wie Ethanol, Ethylacetat und Aceton. Gegenüber Literaturdaten zur Mazeration von Fucoxanthin auf Basis der genannten Lösungsmittel, ist mittels PLE prinzipiell eine Extraktion bei einem deutlich geringeren Lösungsmittel/Biomasse-Verhältnis möglich. So wurde bei einer einfachen subkritischen Extraktion mit Ethylacetat beispielweise eine Beladung von  $2,4 \pm 0,2 \text{ mg ml}^{-1}_{\text{Ethylacetat}}$  erreicht.

Eine Sonderstellung bei der Extraktion von Fucoxanthin nimmt hierbei das unpolare Lösungsmittel n-Hexan ein. Obwohl Fucoxanthin in n-Hexan bei RT als nahezu unlöslich gilt, war eine Extraktion von wesentlichen Teilen des Fucoxanthins bei  $\geq 90^\circ\text{C}$  möglich. Weiterführende Untersuchungen zur Löslichkeit des Fucoxanthins in n-Hexan zeigten, dass es offenbar zu einer temperaturabhängigen Löslichkeitserhöhung, insbesondere bei Temperaturen über 70 °C und somit im subkritischen Bereich oberhalb des Siedepunktes des Lösungsmittels ( $T_S = 66 \text{ °C}$  bei Normaldruck) kommt. Die temperaturabhängige Löslichkeit von Fucoxanthin in n-Hexan bietet somit einen Ansatzpunkt zur Fällung des Fucoxanthins nach der subkritischen Fest-Flüssig-Extraktion durch Abkühlung des Extraktes. Hierdurch kann das im Extrakt ent-

haltene Fucoxanthin vom den Fettsäuren, einschließlich EPA, getrennt werden (siehe nachfolgendes Kapitel 5.5).

Wie in Kap. 5.4.7 beschrieben, ist prinzipiell auch die subkritische Extraktion von Fettsäuren und Fucoxanthin aus feuchter *P. tricornutum* Biomasse mit polaren und mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln möglich. Hierbei lagen die erzielten EPA-Ausbeuten etwas niedriger als mit getrockneter Biomasse. Es ist somit prinzipiell möglich, eine Lipidfraktion (Algenöl) ohne einen vorherigen energieintensiven Trocknungsschritt durchzuführen. Einen positiven Einfluss auf die Extraktionsausbeute für Fettsäuren wie EPA aus feuchter Biomasse, zeigte dabei insbesondere eine Erhöhung der Extraktionstemperatur. Auch Fucoxanthin ließ sich bei Temperaturen von 100 °C aus feuchter Biomasse extrahieren.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zwei mögliche Vorgehensweisen zur Aufarbeitung der erhaltenen Lipidextrakte auf, um sowohl EPA- als auch Fucoxanthin als separate Wertstoffe zu gewinnen:

(1) die Fest-Flüssig-Extraktion einer EPA- und Fucoxanthin-haltigen Lipidfraktion auf Basis polarer Lösungsmittel wie Ethanol, Ethylacetat oder Aceton und ggf. eine anschließende Separation des Fucoxanthins, z.B. mittels Flüssig-Flüssig-Extraktionen oder mittels chromatographischer Verfahren.

(2) die Extraktion beider Komponenten mit n-Hexan und die anschließende synergetische Fällung des Fucoxanthins durch Abkühlung des Extraktes, gefolgt von einer Fest-Flüssig-Abtrennung, z.B. Filtration, der Fucoxanthin-reichen Partikel aus der lipidhaltigen Suspension.

Wie bereits in Kap. 3.3.5 dargelegt, sind bisher beschriebene Verfahren zur Trennung von Fucoxanthin aus fettsäurehaltigen Lipidextrakten (1), z.B. durch mehrfache Flüssig-Flüssig-Extraktionen und anschließende präparative chromatographische Verfahren, meist mehrstufig und aufwendig (Xia et al., 2013; Chen et al., 2017; Z. Sun et al., 2019). Option (2) ist in der Literatur bisher nicht beschrieben, scheint aber eine vielversprechende prozesstechnische Alternative darzustellen und wurde folglich näher untersucht (nächstes Kapitel).

## **5.5 Temperaturinduzierte Fällung von Fucoxanthin aus Lipidextrakten**

Da die in Kap. 5.4.5 und 5.4.6 gezeigten Daten zur subkritischen Fest-Flüssig-Extraktion von Fucoxanthin eine temperaturabhängige Erhöhung der Löslichkeitsgrenze in n-Hexan implizieren, wurden in dieser Arbeit Versuche zur Separation von Fucoxanthin mittels temperatur-

induzierter Fällung ausgehend von lipidhaltigen *P. tricornutum*-Extrakten unternommen. Entsprechende Versuche werden in diesem Kapitel dargelegt. Da Fucoxanthin in n-Hexan unter Normaldruck und bei RT nahezu unlöslich ist, gilt n-Hexan in der Literatur als ein für diesen Zweck ungeeignetes Extraktionsmittel. Aus diesem Grund sind zu diesem Sachverhalt bisher kaum Daten veröffentlicht (Kim et al., 2012a; Xia et al., 2013).

Im Hinblick auf ein möglichst effizientes Herstellungsverfahren für Fucoxanthin und EPA (siehe hierzu auch in Kap. 5.7) erscheint es energetisch sinnvoll, die Synergie zwischen der subkritischen Extraktion oberhalb des Siedepunktes, der anschließenden Abkühlung sowie der damit einhergehenden Verschiebung der Löslichkeitsgrenze des Fucoxanthins prozess-technisch zu nutzen, da sich ein suspendiertes Fucoxanthin-reiches Präzipitat relativ einfach abtrennen lässt. Bisher veröffentlichte Methoden zur Gewinnung von aufgereinigtem Fucoxanthin bzw. zur Separation von Fucoxanthin aus lipidreichen Mikroalgenextrakten (erläutert in Kap. 3.3.5), z.B. auf Basis mehrfacher Flüssig-Flüssig-Extraktionen in Kombination mit präparativer Silicagel-Chromatographie, erscheinen vergleichsweise aufwendig (Kawee-ai et al., 2013; Xia et al., 2013).

### **5.5.1 Löslichkeit von Fucoxanthin in n-Hexan**

Da in der Literatur keine genauen Daten zur Löslichkeit von Fucoxanthin in organischen Lösungsmitteln wie n-Hexan publiziert sind, wurden Versuche zur Löslichkeit von Fucoxanthin in reinem n-Hexan durchgeführt. Aus der Literatur ist lediglich bekannt, dass sich n-Hexan bei Temperaturen  $\leq 45\text{ °C}$  nicht oder nur sehr bedingt zur Extraktion von Fucoxanthin aus Mikroalgen eignet (Kim et al., 2012a; Xia et al., 2013). Neben reinem n-Hexan wurde für die Löslichkeitsversuche mit einer übersättigten Fucoxanthin-Lösung auch ein nach der subkritischen Extraktion (Kap. 4.5.2) erhaltener hexanolischer Lipidextrakt untersucht. Der Extrakt enthält neben Fucoxanthin weitere lipophile Komponenten wie Fettsäuren. Diese Begleitkomponenten können die Löslichkeit des Fucoxanthins eventuell beeinflussen.

Die Ergebnisse in Abb. 34 zeigen, dass sich in einer mit Fucoxanthin ( $4\text{ mg ml}^{-1}$ ) übersättigten Lösung eine temperaturabhängige Löslichkeitserhöhung ausgehend von  $0,06 \pm 0,01\text{ mg ml}^{-1}$  ( $25\text{ °C}$ ) bis zu einer Endkonzentration von  $2,0 \pm 0,8\text{ mg ml}^{-1}$  ( $100\text{ °C}$ ) in reinem n-Hexan ergibt. Ein Anstieg der Löslichkeit ist insbesondere bei Temperaturen  $\geq 80\text{ °C}$ , also oberhalb des Siedepunktes bei atmosphärischem Druck, zu beobachten. Diese Daten korrelieren weitestgehend mit den Extraktionsausbeuten, welche mittels PLE unter Einsatz von n-Hexan erreicht wurden (siehe hierzu Kap. 5.4.5).

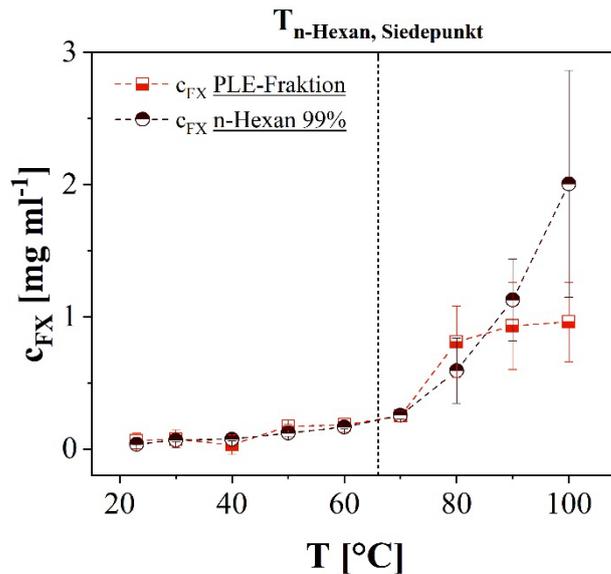


Abbildung 34: Löslichkeit von Fucoxanthin in n-Hexan (99%) und in einem mittels PLE erzeugten Extrakt (gemäß Kap. 4.5.2 mit n-Hexan, bei 100 °C, 100 bar,  $t = 20$  min,  $V_R = 100$  ml), welcher nach der Extraktion mit zusätzlichem Fucoxanthin ( $c_{FX} = 4$  mg ml<sup>-1</sup>) angereichert wurde um eine Übersättigung zu gewährleisten. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte mit der mittleren Standardabweichung ( $n = 3$ ).

Die Löslichkeitserhöhung ist ebenfalls bei den untersuchten hexanolischen PLE-Extrakten zu beobachten, wenngleich der Löslichkeitsanstieg im Bereich von 80 bis 100 °C offenbar weniger ausgeprägt ist. Dieses Phänomen könnte mutmaßlich auf weitere enthaltene lipophile Begleitkomponenten zurückzuführen sein. Für den Extrakt wurde eine maximale Löslichkeit von  $0,96 \pm 0,3$  mg ml<sup>-1</sup> bei 100 °C ermittelt. Die sehr hohen Standardabweichungen von bis zu 40 % im Bereich über 70 °C können auf Ungenauigkeiten bei der Probenentnahme, thermisch bedingte Turbulenzen bzw. Konvektionsströmungen durch den Wärmeeintrag über den Druckbehälter-mantel und womöglich auch durch den thermisch bedingten Abbau von Fucoxanthin bei Temperaturen über 80 °C zurückzuführen sein.

Vergleicht man diese Daten mit der während der subkritischen Fest-Flüssig-Extraktion in n-Hexan erreichten Beladung von  $0,74 \pm 0,1$  mg ml<sup>-1</sup> (Kap. 5.4.5), so fällt auf, dass eine weitere Reduktion der zur Extraktion verwendeten n-Hexan-Menge aufgrund der Gefahr einer Übersättigung nicht sinnvoll ist. Vielmehr sollte eine Erhöhung der Lösungsmittelmenge erfolgen, um die Ausbeute ggf. zu steigern. Ausgehend von der in n-Hexan löslichen Fucoxanthin-Menge und dem in *P. tricorutum* enthaltenen biomassespezifischen Fucoxanthingehalt von 20,5 mg g<sup>-1</sup> ergibt sich für die Extraktion mit n-Hexan ein theoretisches minimales Lösungsmittel zu Biotrockenmassen/n-Hexan-Verhältnis von etwa 1:30.

Die schlechte Löslichkeit bei RT (25°C) erklärt die Beobachtungen von Kim et al. 2012 sowie auch Xia et al. 2013, in deren Untersuchungen n-Hexan als ineffizientes Lösungsmittel zur

Extraktion von Fucoxanthin aus den Mikroalgen *P. tricornutum* bzw. *O. aurita* bei RT beschrieben wird (Kim et al., 2012a; Xia et al., 2013). Verglichen wurde es in beiden Studien u.a. mit den polaren Lösungsmitteln Methanol und Ethanol, welche selbst bei Raumtemperatur relativ gute Löslichkeitseigenschaften für Fucoxanthin besitzen (siehe hierzu auch Kap. 5.4.5). Die gezeigte temperaturabhängige Verschiebung der Löslichkeitsgrenze diente als Grundlage für die nachfolgend in Kap. 5.5.2 beschriebene Fällung und damit für eine neue Möglichkeit zur präparativen Aufreinigung von Fucoxanthin.

### 5.5.2 Fällung und Filtration von Fucoxanthin-Agglomeraten

Auf Basis der zuvor erläuterten Übersättigung der subkritischen n-Hexan-Extrakte ist es möglich, das präzipitierte Fucoxanthin aus abgekühlten Extrakten mittels Filtration zu separieren. Es wurde hierfür zunächst eine Korngrößenverteilung der in n-Hexan suspendierten Fucoxanthinpartikel zur Auswahl geeigneter Filtermembranen mittels Laserbeugung, wie in Kap. 4.6.7 beschrieben, abgeschätzt. Hierfür wurden mehrere Extraktionen bei 100°C und 100 bar mittels PLE durchgeführt (Kap. 4.5.2), die Extrakte vereint und anschließend über 24 h auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die Abschätzung der Partikelgröße ergab für die suspendierten Partikel bei RT zwei Gaußverteilungen mit mittleren Partikeldurchmessern im Bereich von etwa 10 – 20 µm bzw. 100 – 150 µm (Abb. 35 A, durchgezogene Linie). Ein Großteil der Partikel konnte mittels nachfolgender Ultraschallbehandlung auf einen mittleren Durchmesser von etwa 10 – 30 µm zerkleinert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich die Mehrheit der kleineren Partikel zu instabilen Agglomeraten vereinen.

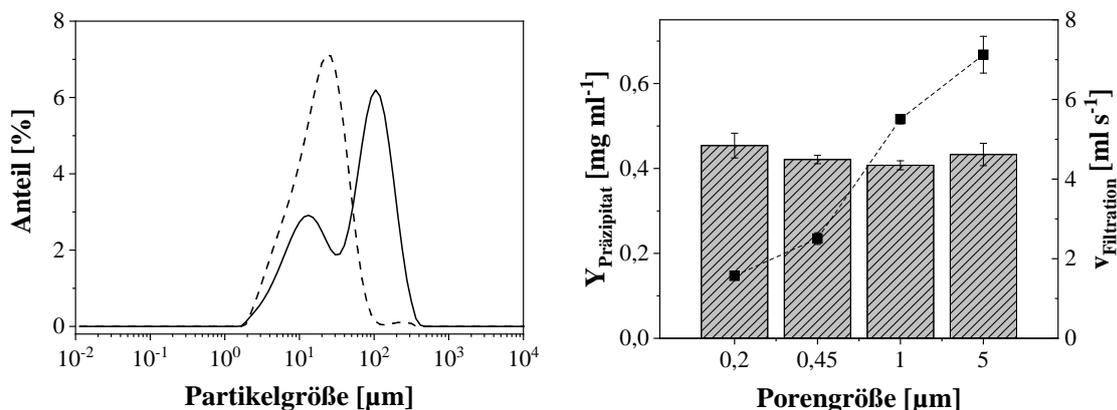


Abbildung 35: [A] Partikelgrößenverteilung des präzipitierten Fucoxanthins in einer übersättigten n-Hexanlösung ( $c_{FX} = 0,55 \pm 0,06 \text{ mg ml}^{-1}$ ) bei 25 °C. Das Fucoxanthin wurde zuvor mittels PLE gemäß Kap. 4.5.3 bei 100 °C, 100 bar und einer Extraktionszeit von 20 min extrahiert. Die durchgezogene Linie zeigt die Verteilung vor der Ultraschallbehandlung, die gestrichelte illustriert die Verteilung danach. [B] zeigt die Ausbeute an Fucoxanthinreicher Biotrockenmasse  $Y_{\text{Präzipitat}}$  (Retentat) und die korrespondierende Filtrationsgeschwindigkeit  $v_{\text{Filtration}}$  für 250 ml des Extraktes bei der Filtration mit unterschiedlichen Porengrößen.

Auf Basis der ermittelten Korngrößenverteilung wurden Filter aus hexan-beständigem Polytetrafluorethylen (PTFE) mit einer Porengröße im Bereich von 0,2 – 5  $\mu\text{m}$  ausgewählt und untersucht. Abb. 35 B zeigt die Ausbeute partikulärer Fucoxanthin-reicher Biotrockenmasse als Retentat in Abhängigkeit der Porengröße bei RT, sowie die korrespondierende Filtrationsgeschwindigkeit für 250 ml Lösung. Alle untersuchten Filter bis zu einer Porengröße von 5  $\mu\text{m}$  lieferten im Vergleich eine ähnliche Biotrockensubstanzausbeute. Die maximale Ausbeute von  $0,45 \pm 0,03 \text{ mg ml}^{-1}$  wurde bei der niedrigsten Filterporengröße von 0,2  $\mu\text{m}$  erreicht. Insgesamt bestätigen die Beobachtungen die zuvor mittels Laserbeugung abgeschätzten mittleren Partikelgrößen von 10 bis 20  $\mu\text{m}$ . Die Filtergeschwindigkeit nahm mit zunehmender Porengröße zu.

Wenngleich aufgrund der geringen verfügbaren Probenvolumina keine kontrollierte Abkühlung (Kühlungsprofil) der Extrakte erfolgen konnte, wurden die Extrakte vor der Filtration auf unterschiedliche Temperaturen von jeweils 25  $^{\circ}\text{C}$ , -4  $^{\circ}\text{C}$  und -18  $^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und unmittelbar filtriert. Ziel war es, zu untersuchen, ob bei niedrigeren Temperaturen evtl. zusätzliche Substanzen, wie z.B. Fettsäuren, ausfallen, welche sich negativ auf die im Retentat erzielte Produktreinheit auswirken. Abb. 36 A zeigt die Filtrationsausbeute an partikulärem Präzipitat bei unterschiedlichen Temperaturen. Zu erkennen ist, dass die Feststoff-Ausbeute mit sinkender Temperatur des Extraktes steigt. Eine maximale Feststoffausbeute (Partikel) von  $0,59 \pm 0,03 \text{ mg ml}^{-1}$  wurde bei -18  $^{\circ}\text{C}$  erreicht. Betrachtet man jedoch den Massenanteil des Fucoxanthins am Feststoff (Abb. 36 B), wird deutlich, dass die tatsächliche Fucoxanthin-Ausbeute keinen signifikanten Unterschied aufweist (Abb. 36 C).

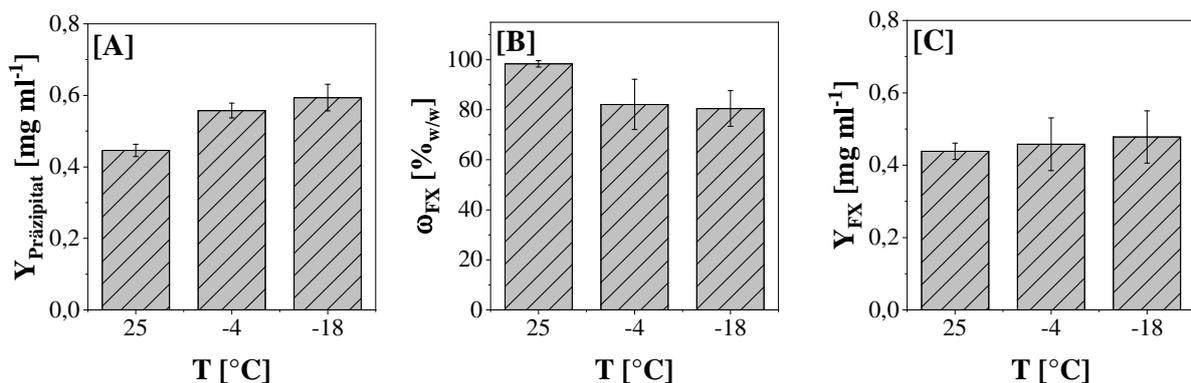


Abbildung 36: Dargestellt ist die Filtrationsausbeute  $Y_{\text{Präzipitat}}$  an partikulärem Fucoxanthin-reichem Präzipitat (Porengröße = 0,2  $\mu\text{m}$ ) [A], der Fucoxanthin-Massenanteil  $\omega_{\text{FX}}$  am zurückgehaltenen Präzipitat [B] sowie die daraus resultierende Fucoxanthinausbeute  $Y_{\text{FX}}$  [C]. Filtriert wurden hexanolische PLE-Extrakte (5 g Biomasse;  $V = 76 \pm 0,4 \text{ ml}$ ,  $c_{\text{FX}} = 0,55 \pm 0,06 \text{ mg ml}^{-1}$ ) bei unterschiedlichen Temperaturen gemäß Kap. 4.5.4. Das Fucoxanthin wurde zuvor mittels PLE gemäß Kap. 4.5.2 bei 100  $^{\circ}\text{C}$ , 100 bar und einer Extraktionszeit von 20 min extrahiert. Gezeigt sind Mittelwerte sowie die mittlere Standardabweichung ( $n = 3$ ).

Bezogen auf die ursprünglich im hexanolischem Lipidextrakt enthaltene Fucoxanthinmenge von  $0,55 \pm 0,06 \text{ mg ml}^{-1}$  konnten somit in Abhängigkeit der Temperatur etwa 80 % als Retentat gewonnen werden. Aus Abb. 36 B wird deutlich, dass der höchste Massenanteil des Fucoxanthin am erhaltenen partikulären Retentat dabei mit  $98,2 \pm 1,3 \text{ \%}_{\text{w/w}}$  bei der höchsten untersuchten Temperatur von  $25 \text{ °C}$  erreicht wurde. Es wäre daher denkbar, dass bei einem weiteren Absenken der Temperatur zusätzliche weitere Stoffe aus der n-Hexan-Lösung ausfallen. Die Konzentration der im Filtrat enthaltenen Gesamtfettsäuren sowie des EPA wies jedoch keinen signifikanten Unterschied zur Konzentration in der Ausgangslösung auf. Es handelt sich folglich bei den zusätzlich ausfallenden Substanzen nicht um Fettsäuren bzw. EPA.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass es möglich ist, hochreines Fucoxanthin vergleichsweise einfach mittels Fällung zu gewinnen. Wie bereits in Kap. 3.3.5 im Detail erläutert, nutzen bisher beschriebene Methoden zur Erzeugung von reinem Fucoxanthin ( $>97 \text{ \%}$ ) aus Algenbiomasse entweder mehrfache Silicagel-Chromatographie-Schritte (Xia et al., 2013) oder mehrstufige Flüssig-Flüssig-Extraktionen mit Evaporation der Lösungsmittel gefolgt von einer chromatographischen Aufreinigung auf Basis von Silicagel (Kawee-ai et al., 2013; Zhang et al., 2018; P. Sun et al., 2019).

In allen genannten Studien sind für die Aufreinigung des Fucoxanthins zudem erhebliche Mengen an verschiedenen Lösungsmittel notwendig. Wengleich sich der Gesamtverbrauch an Lösungsmittel der Methoden aus den jeweils publizierten Daten nicht exakt quantifizieren lässt, wird beispielweise in der von Kim et al. (2012) beschriebenen Methode zur Aufreinigung von Fucoxanthin aus *P. tricornutum* mittels Silicagel-Chromatographie alleine für die vor der Chromatographie notwendige Fest-Flüssig-Extraktion 50 ml Lösungsmittel pro Gramm Biotrockenmasse benötigt. Anschließend ist der Einsatz weiterer Lösungsmittel für die Equilibrierung der Chromatographiesäulen sowie die Elution des Fucoxanthins notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen lediglich bei einem Lösungsmittel zu Biotrockenmasseverhältnis von etwa  $20 \text{ ml g}^{-1}$  extrahiert, und es werden zur Aufreinigung mittels Fällung sowie Filtration keine zusätzlichen Lösungsmittel benötigt.

Zusammenfassend konnte ausgehend von der Fällung bei  $25 \text{ °C}$  mit der hier beschriebenen Methode durchschnittlich  $80 \text{ \%} \pm 13 \text{ \%}$  des in der Ausgangslösung (Lipidextrakt) befindlichen Fucoxanthins als Retentat gewonnen und auf einen Massenanteil von etwa  $97 \text{ \%}_{\text{w/w}}$  aufgereinigt werden. Etwa 6 % des fehlenden Fucoxanthins konnte im Filtrat wiedergefunden werden. Weitere Verluste können durch die Adhäsion von Teilen des Fucoxanthins an die Filterapparatur, z.B. im Vorlagebehälter, sowie dem PLE-Auffangbehälter erklärt werden und waren

während der Versuche als rötlicher Rückstand an den Gefäßinnenseiten zu erkennen. Das abgetrennte partikuläre Fucoxanthin konnte nachfolgend mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) genauer strukturell charakterisiert werden (Kap. 5.5.3).

### 5.5.3 Untersuchung der Fucoxanthinpartikel mittels Rasterelektronenmikroskopie

Um die gewonnenen Fucoxanthin-Agglomerate bzw. die einzelnen Fucoxanthin-Partikel hinsichtlich möglicher Kristallstrukturen und der exakten Partikelgröße zu untersuchen, wurden Aufnahmen mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) angefertigt. Die in Abb. 37 dargestellten REM-Aufnahmen zeigen Agglomerate aus porösen Partikeln mit einem Durchmesser im Bereich von etwa zwei bis zehn Mikrometern. Die beobachtete Partikelgröße ist somit tatsächlich etwas geringer als in den Ergebnissen der vorherigen Partikelgrößenabschätzung mittels Laserbeugung (Kap. 5.5.2). Die Mehrzahl der Einzelpartikel wies dabei eine kugelförmige „salatkopffartige“ Struktur auf (siehe Abb. 37 D und 37 E). Die einheitliche Morphologie der Partikel könnte darauf hindeuten, dass es sich um Kristallbildung handelt. Sollte sich diese Vermutung bestätigen, was im Umfang dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnte, wäre ein möglicher nächster Schritt die Ermittlung einer metastabilen Zone und eines definierten Abkühlungsprofils.

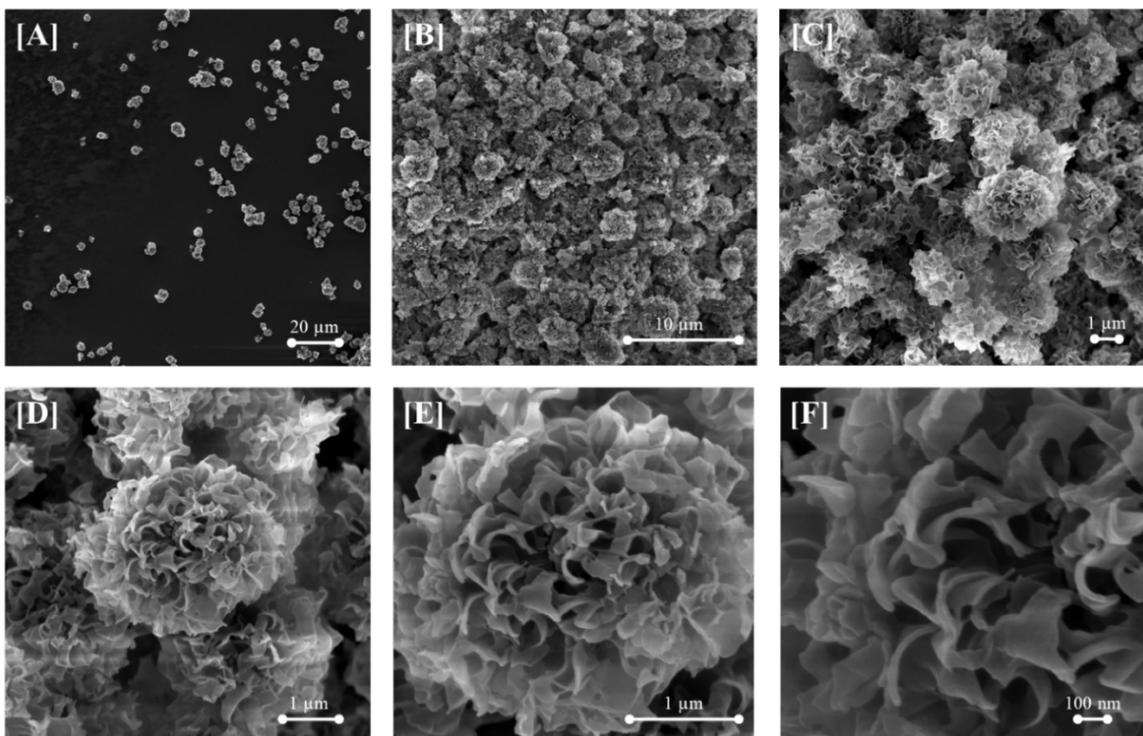


Abbildung 37: REM-Aufnahmen des abfiltrierten Fucoxanthinpulvers ( $\omega_{\text{FX}} = 98,2 \pm 1,3 \%_{\text{w/w}}$ ) bei unterschiedlichen Vergrößerungen (Maßstab: 20  $\mu\text{m}$  [A] bis 100 nm [F]). Das Fucoxanthin wurde zuvor mittels PLE gemäß Kap. 4.5.3 bei 100 °C, 100 bar und einer Extraktionszeit von 20 min extrahiert und anschließend wie in Kap. 4.5.4 beschrieben, abfiltriert.

Durch eine gezielte Kühlungskristallisation zwischen der Übersättigungs- sowie Sättigungslinie und somit der Vermeidung von Spontankeimbildung, bestünde nachfolgend die Möglichkeit eine homogenere Partikelgrößenverteilung durch gezieltes Kristallwachstum zu induzieren. Dies wäre vorteilhaft hinsichtlich eines definierten Produktes. Aufgrund der Vielzahl komplexer Einflussfaktoren wie Temperaturführung, Anströmgeschwindigkeit oder der thermisch bedingten Konvektion im Reaktionsgefäß auf die Kristallbildung, erscheint es sinnvoll, diese Optimierung nicht mit dem in dieser Arbeit im Labor und Technikums-Setup verwendeten, sondern im Fall einer prozesstechnischen Anwendung und Skalierung unter Berücksichtigung des für den späteren Prozess ausgewählten Kristallisators durchzuführen.

#### 5.5.4 Massenspektroskopische Untersuchung des aufgereinigten Fucoxanthins

Um sicherzustellen, dass im Hinblick auf die thermische Belastung innerhalb der einzelnen Prozessschritte, insbesondere der Extraktion ( $T \geq 100 \text{ }^\circ\text{C}$ ), strukturell intaktes Fucoxanthin als Endprodukt vorliegt, wurde das präzipitierte Fucoxanthinpulver mittels UHPLC-MS untersucht und mit einem kommerziellen analytischen all-trans-Fucoxanthin Standard ( $\geq 95 \%$ , Merck) verglichen.

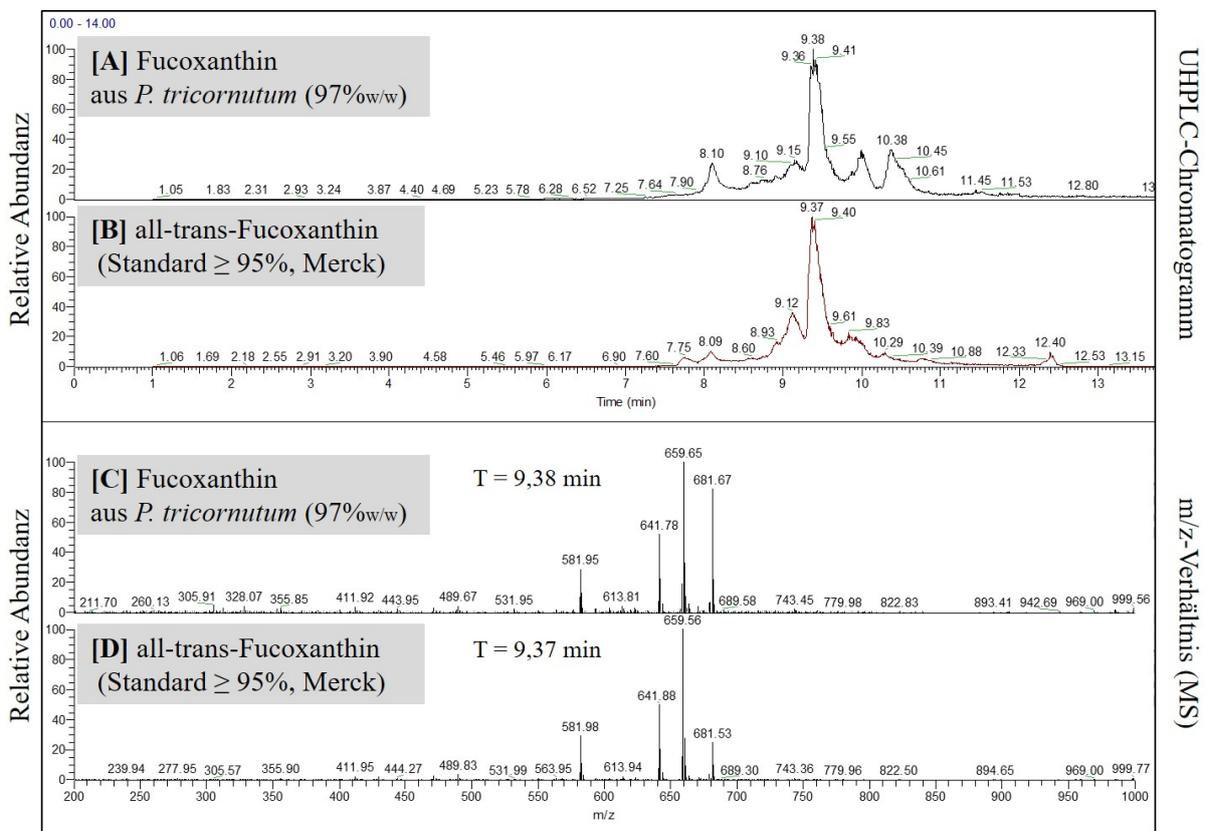


Abbildung 38: UHPLC-Chromatogramm [A,B] und MS-Spektrum [C,D] eines all-trans-Fucoxanthinstandards ( $\geq 95\%$ , Merck) und des aus *P. tricornutum* UTEX 640 gewonnenen Fucoxanthinpulvers ( $>97\%$ ). Das Fucoxanthin wurde zuvor mittels PLE gemäß Kap. 4.5.3 bei  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , 100 bar und einer Extraktionszeit von 20 min extrahiert und anschließend wie in Kap. 4.5.4 beschrieben, abfiltriert.

Wie bereits in Kap. 5.4.5 und 5.4.6 gezeigt, ist Fucoxanthin temperaturempfindlich gegenüber höheren Temperaturen. Dies korreliert auch mit den Beobachtungen von Kawee-ai et al. (2013). Ein Vergleich der Massenspektren (siehe Abb. 38) zeigt, dass das erzeugte Fucoxanthin aus *P. tricornutum* das gleiche Masse/Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ -Verhältnis) aufweist, wie der verwendete analytische Standard. Die Masse-Ladungs-Verhältnisse ( $m/z = 659,6 [M+H]^+$  bzw.  $681,5 [M+Na]^+$ ;  $641,9$  und  $582,0 [M+H]^+$ ) korrelieren zudem mit den Studien von Zhang et al. (2015), in welchen für Fucoxanthin ein Precursor Ion mit einem  $m/z$  von  $659,3 [M+H]^+$  sowie Tochterionen mit  $m/z = 641,4$ ;  $581,4$  und  $109,0$  mittels LC-MS/MS nachgewiesen wurden (Zhang et al., 2015). Die Analysen legen somit nahe, dass es sich tatsächlich um Fucoxanthin derselben Molekülmasse bzw. Summenformel handelt, wenngleich aus den massenspektroskopischen Daten keine Rückschlüsse auf eine mögliche cis/trans-Isomerisierung bzw. die räumliche Anordnung der Atome geschlossen werden können.

Aus der Literatur ist bekannt, dass natives all-trans-Fucoxanthin unter thermischer Belastung teilweise in cis-Isomere umgewandelt werden kann. Zhao et al. (2014) beobachten beispielsweise, eine Umwandlung von all-trans-Fucoxanthin aus *Costaria costata*, gelöst in Canolaöl (einem Öl aus einer Rapsvarietät mit reduziertem Erucasäure- und Glucosinolat-Gehalt), in entsprechende 13'cis- und 9'cis-Isomere des Moleküls unter Hitzeeinwirkung bei Temperaturen bis  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Zhao et al., 2014). Um diesen Sachverhalt weiter aufklären zu können, sind jedoch weitere umfangreiche Untersuchungen, beispielsweise mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), notwendig, welche im Umfang dieser Arbeit nicht möglich waren. Eine Weiterentwicklung der HPLC-Methode zur Trennung von cis- und trans-Isomeren wäre ebenfalls denkbar, würde aber eine Verfügbarkeit entsprechender analytischer Standards voraussetzen. Dies war zum Zeitpunkt der Entstehung der vorliegenden Arbeit nicht der Fall.

### **5.5.5 Skalierung des Extraktions- und Fällungsverfahrens in den Litermaßstab**

Die gezeigte subkritische Extraktion von Fucoxanthin- und EPA mittels n-Hexan, sowie das in Kap. 5.5.2 erläuterte Separationsverfahren, wurden als „Proof-of-Concept“ zur Herstellung von Probenmaterial für die in Kap. 5.6 erläuterten Untersuchungen zu den funktionellen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften der beiden Wertstoffe aus dem Labormaßstab (Reaktionsvolumen 5 bis 100 ml) in eine Technikumsanlage übertragen. Wie in Kap. 4.5.3 im Detail dargestellt, kam hierfür ein Extraktionsreaktor sowie ein gekoppelter Reaktionsbehälter zur Fällung des Fucoxanthins zum Einsatz, welche über einen temperierten Schlauch verbunden waren (Abb. 39 A).

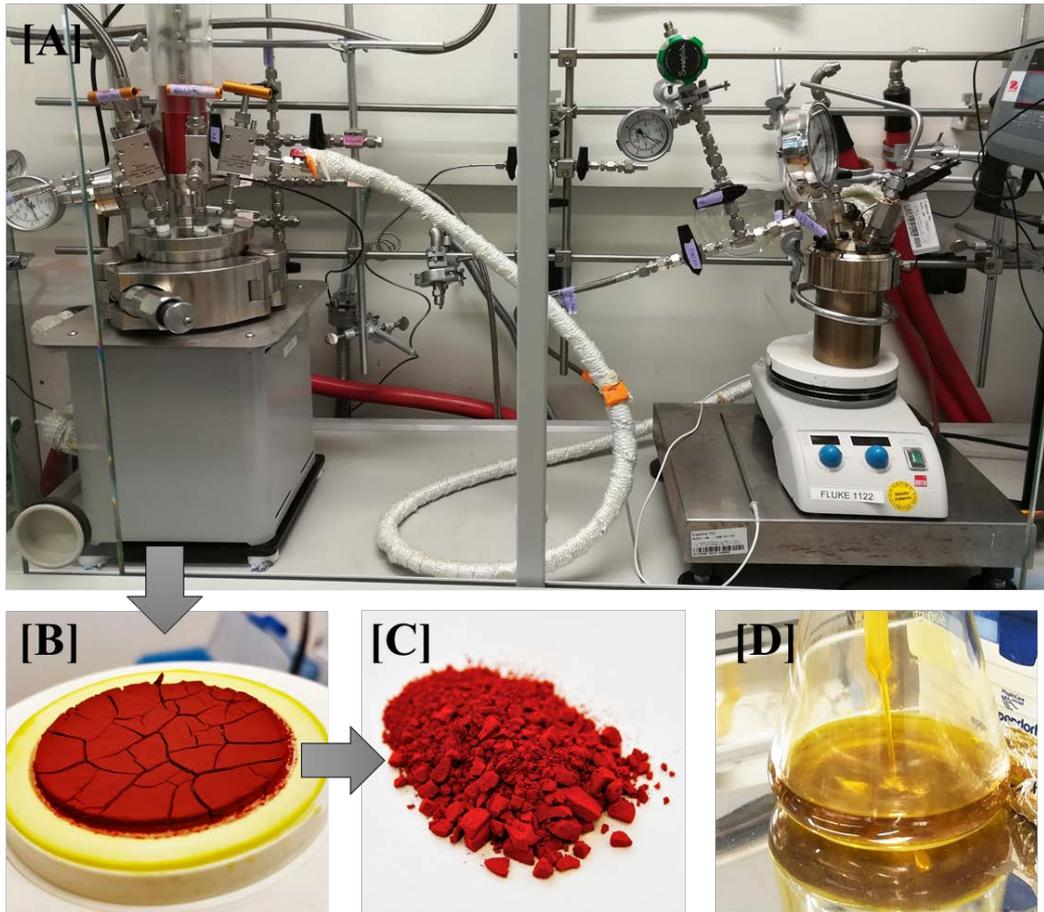


Abbildung 39: Foto der am Fraunhofer CBP, Leuna, aufgebauten PLE-Anlage im Technikumsmaßstab [A], des fucoxanthin-haltigen Retentats auf der PTFE-Filtermembran [B], des gewonnenen Fucoxanthinpulvers (248 mg) [C] und des EPA-haltigen Filtrats [D].

Aus 25 g Biomasse konnten auf diese Art und Weise insgesamt 248 mg Fucoxanthin-reiches Pulver mit einer Reinheit (HPLC) von  $80,5 \pm 2,7 \text{ \%}_{w/w}$  gewonnen werden (siehe Abb. 39 B und C). Es konnten somit etwa 0,2 g Fucoxanthinpulver gewonnen werden, was einer biomasse-spezifischen Ausbeute von etwa  $8 \text{ mg g}^{-1}$  entspricht. Die Ausbeute liegt damit etwas höher als in den zuvor gezeigten Versuchen im Labormaßstab ( $Y_{FX} = 7,1 \pm 0,4 \text{ mg g}^{-1}$  bei  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ), was jedoch mit dem höheren Lösungsmittel zu Biotrockenmasseverhältnis von 1:20 sowie der optimierten, niedrigeren Extraktionstemperatur von  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  gegenüber  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  begründet werden kann. Während die Ausbeute an Fucoxanthin somit im Einklang mit den Laborversuchen steht (siehe Kap. 5.5.2), war insbesondere der Massenanteil des gewonnenen Fucoxanthins am Retentat geringer.

Eine Optimierungsmaßnahme für die Versuchsanlage könnte eine Vortemperierung des Lösungsmittels auf die Zieltemperatur in einem zusätzlichen separaten Druckbehälter darstellen. Dies würde durch den Wegfall des Aufheizvorgangs eine Reduzierung der Verweilzeit des Extraktionsgutes im Lösungsmittel ermöglichen. Wesentliches Problem

gegenüber den Laborversuchen ist die bei großem Probenvolumen länger andauernde Aufheizphase des Lösungsmittels, in diesem Fall über den Reaktormantel, bis zur gewünschten Extraktionstemperatur. Dabei wird die Biomasse und damit auch das thermo-instabile Fucoxanthin, insbesondere im Bereich des Reaktormantels, zwangsläufig über einen längeren Zeitraum höheren Temperaturen ausgesetzt, anders als es im Labormaßstab der Fall ist. Genau wie im Fall der Laborversuche war zudem nach Abkühlung des Extraktes eine Adhäsion von Teilen des Fucoxanthins im Reaktorinnenraum zu beobachten. Wenngleich somit noch erheblicher Optimierungsbedarf besteht, konnte insgesamt gezeigt werden, dass sich auf diese Art und Weise erste pulverförmige Testmuster herstellen lassen, welche als Grundlage für nachfolgende Untersuchungen, z.B. zur Funktionalität des Moleküls, dienen können (siehe hierzu Kap. 5.6)

### **5.5.6 Zusammenfassung der Separationsversuche**

Die dargelegten Ergebnisse zeigen erstmals, dass es möglich ist, große Teile des zuvor extrahierten Fucoxanthins aus einer übersättigten Lipidfraktion mittels Filtration als Retentat zu separieren und damit vom EPA-reichen Lipidextrakt (Filtrat) zu trennen. Im Hinblick auf die vorherige subkritische Fest-Flüssig-Extraktion bei hohen Temperaturen und des dafür notwendigen Energieeintrages konnte somit gezeigt werden, dass prinzipiell ein Teil der zuvor zur Temperierung eingebrachten Energie synergetisch zur Trennung beider Wertstoffe genutzt werden kann (siehe hierzu auch Prozessvorschlag in Kap. 5.7).

Die im Labormaßstab durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass das Fucoxanthin bei Abkühlung der erzeugten Extrakte insbesondere auf Temperaturen  $\leq 25$  °C in Form von instabilen Agglomeraten, ausfällt. Die Agglomerate wiederum bestehen aus Einzelpartikeln mit einer mittleren Korngrößenverteilung im Bereich von etwa 10 – 30  $\mu\text{m}$ . Durch den Einsatz von PTFE-Filtern mit einer Porengröße  $\leq 5$   $\mu\text{m}$  war es mittels Vakuumfiltration möglich, aus einer übersättigten Lösung etwa 80 % des enthaltenen Fucoxanthins als Retentat mit einer Reinheit von über 97 %<sub>w/w</sub> zu gewinnen. Folglich konnte das Fucoxanthin größtenteils aus dem Fettsäure- und EPA-haltigen Filtrat isoliert und als Pulver aufgereinigt werden. Gegenüber den bisher beschriebenen komplexen Verfahren zur Separation von Fucoxanthin aus Lipidextrakten, z.B. durch mehrfache Silicagel-Chromatographie in Kombination mit mehrfachen Flüssig-Flüssig-Extraktionen, steht somit erstmals eine deutlich einfachere Möglichkeit zur Trennung von Fettsäuren und Fucoxanthin sowie zur Aufreinigung des Fucoxanthins zur Verfügung. Es besteht zudem gegenüber bisher beschriebenen Verfahren die Möglichkeit, eine erhebliche Menge an organischen Lösungsmitteln einzusparen (diskutiert in Kap. 5.5.2).

Das erzeugte Fucoxanthinpulver wurde nachfolgend massenspektroskopisch (MS) und mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht. Die mittels REM aufgenommene Partikelstruktur zeigte agglomerierte Partikel bestehend aus Einzelpartikeln mit einem Durchmesser von etwa 3-5 µm. Die MS-Untersuchung des erzeugten Pulvers zeigte, dass nach der Extraktion und Separation strukturell-intaktes Fucoxanthin mit den korrespondierenden Masse-Landungsverhältnissen vorliegt. Die Ergebnisse erlauben jedoch keine Rückschlüsse auf eine mögliche temperaturbedingte cis-Isomerisierung des nativ als all-trans-Isomer vorliegenden Moleküls, wie sie bereits in der Literatur für natives Fucoxanthin aus Makroalgen beschrieben wurde.

Das im Labormaßstab entwickelte Extraktions- und Separationsverfahren konnte abschließend als „Proof of Concept“ erstmals in den technischen Maßstab übertragen werden. Hierbei wurde in der konzipierten Versuchsanlage ohne weitere Optimierungsmaßnahmen eine mit dem Labormaßstab vergleichbare Fucoxanthinausbeute erzielt, wenngleich der Massenanteil des gewonnenen Fucoxanthins am Retentat mit ca. 80 %<sub>w/w</sub> niedriger lag als im Labormaßstab. Dies könnte im Wesentlichen auf den technisch-bedingten, längeren Aufheizvorgang von größeren Lösungsmittelvolumina und die damit längere Verweilzeit des thermo-instabilen Extraktionsgutes im Extraktionsgefäß zurückzuführen sein. Schlussendlich konnten mit der PLE-Anlage Testmuster des aufgereinigten Fucoxanthinpulvers sowie der EPA-reichen Lipidfraktion zur Untersuchung der jeweiligen funktionellen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften (siehe Kap. 5.6) der Einzelfraktionen erzeugt werden.

## **5.6 Funktionelle und physiologische Eigenschaften von Fucoxanthin und EPA**

Ein entscheidendes Merkmal für den potentiellen Einsatz von Fucoxanthin-haltigen Extrakten und auch aufgereinigtem Fucoxanthin in kosmetischen Applikationen oder als „functional ingredients“ in Nahrungs- und Futtermitteln sind dessen funktionelle und ernährungsphysiologische Eigenschaften. Insbesondere für Fucoxanthin aus Makroalgen sind in der Literatur anti-oxidative Eigenschaften, wie z.B. die Fähigkeit freie Radikale zu eliminieren oder Substanzen zu reduzieren, bekannt (Sachindra et al., 2007). Zudem sind für das Xanthophyll bereits entzündungshemmende, gewichtsreduzierende und krebshemmende Eigenschaften beschrieben (Hosokawa et al., 2004; Maeda et al., 2005, 2006; Kim et al., 2010b). Eine detailliertere Zusammenfassung findet sich hierzu in Kap. 2.4.2.

Auf Basis des in dieser Arbeit erzeugten Fucoxanthinpulvers, als auch den Fucoxanthin-haltigen Lipidextrakten, wurden daher Untersuchungen durchgeführt, um speziell die anti-

oxidativen Eigenschaften für das gewonnene Fucoxanthin aus *P. tricornutum* zu validieren. Entsprechende Untersuchungen zum aufgereinigten Fucoxanthin finden sich in Kap. 5.6.1. Untersuchungen zu den anti-oxidativen Eigenschaften der Lipidextrakte werden nachfolgend in Kap. 5.6.2 diskutiert.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass auf Basis der erzeugten Biomasse aus *P. tricornutum* sowie den korrespondierenden Extrakten und des isolierten Fucoxanthins im Rahmen dieser Arbeit auch weitere umfangreiche nahrungsmitteltechnologische Untersuchungen hinsichtlich der anti-inflammatorischen und anti-proliferativen Eigenschaften, der Bioverfügbarkeit, der Genotoxizität durchgeführt und veröffentlicht wurden (Neumann et al., 2018a, 2018b; Neumann und Derwenskus et al., 2019; Gille et al., 2017b, 2019). Einige im Zusammenhang mit dieser Arbeit relevante Veröffentlichungen werden daher zusammenfassend in Kap. 5.6.3 erläutert.

### **5.6.1 Anti-oxidative Eigenschaften des ausgefällten Fucoxanthins**

Bereits Nomura et al (1997) zeigten in ihrer Studie, dass Fucoxanthin als Elektronendonator für das 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-Radikal (DPPH) dienen kann (Nomura et al., 1997). Durch diese Eigenschaft mit freien Radikalen zu reagieren, gilt Fucoxanthin als sogenannter „Radikalfänger“. Wenngleich die genaue Reaktion des Fucoxanthins mit dem DPPH-Radikal nicht geklärt ist, scheinen im Wesentlichen die sechs vorliegenden Sauerstoffatome und somit auch die zwei Hydroxylgruppen für die Reaktion verantwortlich zu sein (Shimidzu et al., 1996; Nomura et al., 1997).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen ebenfalls die Eigenschaft des extrahierten Fucoxanthins mit DPPH zu reagieren. Wie bereits in Neumann und Derwenskus et al. (2019) publiziert, wies das Fucoxanthin aus *P. tricornutum* im DPPH-Assay ein IC<sub>50</sub>-Wert von  $201 \pm 21 \mu\text{g ml}^{-1}$  auf. Neben Nomura et al. (1997) veröffentlichte auch die Gruppe um Xiao et al. (2013) Daten für Fucoxanthin aus einer Mikroalge (Xia et al., 2013; Nomura et al., 1997). Auch hier zeigte Fucoxanthin, welches mittels präparativer HPLC aus *Odontella aurita* aufgereinigt wurde, eine dosis-abhängige Reaktion mit dem DPPH-Radikal. Der ermittelte IC<sub>50</sub>-Wert von  $140 \mu\text{g ml}^{-1}$  liegt dabei verglichen mit den vorliegenden Daten in einer ähnlichen Größenordnung. Andere nicht-sauerstoffhaltige Carotinoide wie z.B.  $\beta$ -Carotin zeigen im DPPH-Assay bekanntermaßen keinen derartigen anti-oxidativen Effekt (Müller et al., 2011). Der ermittelte IC-Wert liegt über dem von Sachindra et al. (2007) für Fucoxanthin aus der Makroalge *U. pinnatifida* publizierten Daten (Sachindra et al., 2007; Neumann und Derwenskus et al., 2019). Ursächlich für die unterschiedlichen Werte könnten dabei unter-

schiedliche Extraktions- und Aufreinigungsmethoden, die Reinheit und auch die Herkunft des getesteten Fucoxanthin sein.

Im FRAP-Assay (siehe Abb. 40) zur Bestimmung der reduzierenden Eigenschaften einer chemischen Verbindung oder eines Extraktes zeigte das gewonnene Fucoxanthinpulver einen ähnlichen Effekt wie das bereits kommerziell auf Basis der Mikroalge *H. pluvialis* produzierte und strukturell sehr ähnliche Astaxanthin.

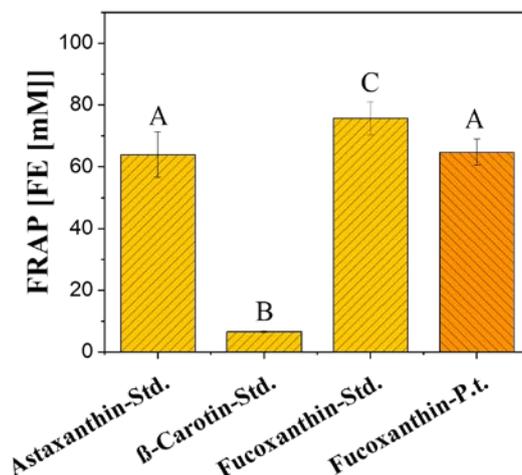


Abbildung 40: Ergebnisse des FRAP-Assay dargestellt als Reduktions-Äquivalente von Eisen(II)-sulfat. Verglichen wurde ein Astaxanthin-Standard ( $\geq 97\%$ , Merck), ein  $\beta$ -Carotin-Standard ( $\geq 97\%$ , Merck), ein Fucoxanthin-Standard ( $\geq 97\%$ , Merck) sowie das in dieser Arbeit erzeugte Fucoxanthinpulver (siehe Kap. 5.5) mit einem Massenanteil von  $98,2 \pm 1,3\%$  w/w.

Der FRAP-Assay lieferte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Carotinoiden. Verglichen mit einem  $\beta$ -Carotin-Standard zeigten beide Xanthophylle einen sehr hohen anti-oxidativen Effekt. Im direkten Vergleich zu einem kommerziell erhältlichen Fucoxanthin-Standard, wies das erzeugte Fucoxanthin einen um etwa 15 % niedrigere Aktivität FRAP-Assay auf. Ursächlich hierfür könnte neben der unterschiedlichen Reinheit der Substanzen auch das verwendete Aufarbeitsverfahren, wie z.B. der zuvor in Kap. 5.4.5 und 5.4.6 beschriebene Temperatureinfluss bei der Extraktion, sein. Wie bereits zuvor erläutert, kann es unter Hitze- einwirkung zur Umwandlung des nativen all-trans-Fucoxanthins zu den weniger aktiven 13' cis- und 9' cis-Isomeren kommen (Zhao et al., 2014).

### 5.6.2 Abhängigkeit der anti-oxidativen Wirkung der Lipidextrakte vom Fucoxanthin- und Gesamtphenolgehalt

Abb. 41 zeigt die Abhängigkeit der anti-oxidativen Eigenschaften der mittels PLE erzeugten Gesamtlipidfraktion („Algenöl“) vom Fucoxanthingehalt (FRAP-Assay und DPPH-Assay)

sowie dem Gesamtphenolgehalt der Fraktion. Neben Fucoxanthin als wesentliches Xanthophyll in *P. tricornutum* können auch Polyphenole wesentlich zur anti-oxidativen Wirkung von Extrakten aus Mikroalgen beitragen, da sie als lipophile Komponenten ebenfalls einen Bestandteil der Lipidfraktion darstellen (Onofrejevová et al., 2010; Rico et al., 2013).

Die in Abb. 40 dargestellten Zusammenhänge zwischen den reduzierenden Eigenschaften (FRAP) und der Funktion als „Radikalfänger“ (DPPH) der Extrakte mit dem Fucoxanthin- sowie Gesamtphenolgehalt legt die Vermutung nahe, dass weniger die enthaltene Fucoxanthinmenge als vielmehr die Menge enthaltener Phenole im Lipidextrakt einen wesentlichen Anteil an der Funktionalität ausmacht. Anders als z.B. von Foo et al. (2015) für Fucoxanthin-reiche Extrakte aus der Mikroalge *Chaetoceros calcitrans* berichtet, scheint somit nicht primär das enthaltene Fucoxanthin ursächlich für das hohe anti-oxidative Potential der erzeugten Lipidfraktionen zu sein, sondern vielmehr die enthaltenen phenolischen Substanzen. Nach Rico et al. (2013) kommen in der Biomasse von *P. tricornutum* u.a. die Polyphenole Catechin und Epi-Catechin sowie die aromatischen Verbindungen Gentisinsäure, Vanillinsäure und Protocatechusäure vor, welche allesamt als äußerst potente Antioxidantien gelten (Rico et al. 2013). Neben Phenolen enthält die Zellwand von *P. tricornutum* zudem wasserlösliche Polysaccharide wie Glucuronomannan, welche insbesondere starke reduzierende Eigenschaften im FRAP-Assay ausweisen können und prinzipiell auch in den Extrakten vorliegen könnten (Le Costaouëc et al., 2017; Jin et al., 2018).

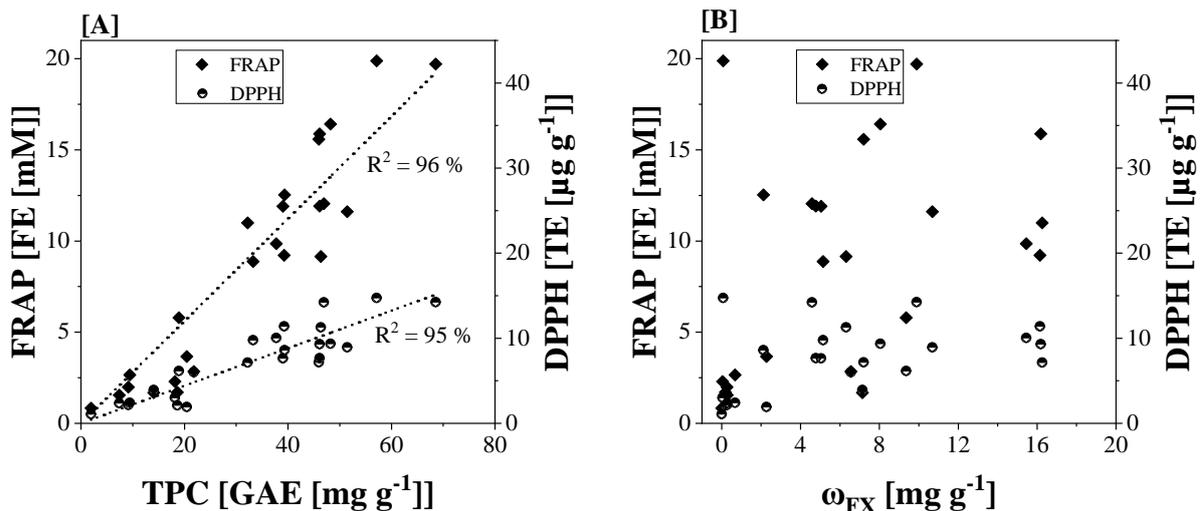


Abbildung 41: Die Diagramme zeigen den Zusammenhang zwischen dem Gesamtphenolgehalt [A] sowie dem Fucoxanthingehalt [B] (jeweils X-Achse) und der reduzierenden Eigenschaft (FRAP) sowie der Radikalfängereigenschaft (DPPH) der PLE-Extrakte (jeweils Y-Achse). Um eine Korrelation zu verdeutlichen wurde eine lineare Regression durchgeführt und das Bestimmtheitsmaß (R<sup>2</sup>) errechnet.

### 5.6.3 Ernährungsphysiologische Eigenschaften

Neben den zuvor in Kap. 5.6.2 beschriebenen anti-oxidativen Eigenschaften des Fucoxanthin aus *P. tricornutum* in den hier gezeigten zellfreien FRAP- und DPPH-Assays, wurden zudem in einer gemeinsamen Studie von Neumann und Derwenskus et al. (2019) anti-inflammatorische und anti-proliferativen Eigenschaften anhand der metabolischen Aktivität von humanen Blutzellen („peripheral blood mononuclear cells, PBMC) und verschiedene Krebszelllinien (Hep G2, HeLa und CaCo-2) untersucht (Neumann und Derwenskus et al., 2019). Es konnte in der Studie gezeigt werden, dass das gewonnene Fucoxanthin aus *P. tricornutum* dosis-abhängig die metabolische Aktivität von Hep G2, HeLa und Caco-2 Zellen in-vitro reduziert. Für alle Zelllinien, insbesondere bei HeLa-Zellen, war zudem ein dosis-abhängiger Effekt von Fucoxanthin auf die Caspase 3/7-Aktivität festzustellen. Dies wiederum stellt ein Indiz für eine induzierte Apoptose der Zellen dar. Das reine Fucoxanthin zeigte bis  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  keinen negativen Einfluss auf die metabolische Aktivität und somit keine zytotoxische Wirkung auf PBMC im untersuchten Konzentrationsbereich. Zusammenfassend konnten somit für das gewonnene Fucoxanthin neben anti-oxidativen auch anti-proliferative Eigenschaften gegenüber Krebszelllinien in-vitro nachgewiesen werden.

Ausgewählte in Kap. 5.4.3 und 5.4.5 beschriebene mittels PLE (100 °C, 100 bar) erzeugten EPA- und fucoxanthin-haltigen Lipidextrakte aus *P. tricornutum* wurden gemeinsam mit Neumann et al. 2018 auf ihre anti-inflammatorische Wirkung auf lipopolysaccharide (LPS) stimulierte PBMC und auf murine Makrophagen-Zellen (RAW 264.7 Zellen) untersucht (Neumann et al., 2018b). Es konnte u.a. gezeigt werden, dass speziell der mittels Wasser sowie der mittels Ethanol extrahierte - und somit sehr Fucoxanthin- und EPA-reiche Extrakt - nicht aber der hexanolische Extrakt mit nahezu keinem gelösten Fucoxanthin die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Cytokine in LPS-stimulierten PBMCs signifikant reduziert. Die besagten Lipidextrakte weisen somit anti-inflammatorische Eigenschaften in-vitro auf, was im Einklang mit bisherigen Publikationen steht (Kim et al., 2013).

Gemeinsam mit Gille et al. (2019) wurde der Einfluss der mittels Ethanol gewonnenen Fucoxanthin- und EPA-reichen PLE-Extrakte auf den Energiestoffwechsel von Mäusen (C57BL/6J) untersucht, welchen eine fettreiche Diät („high fat diet“, HFD) verabreicht wurde (Gille et al., 2019). Es konnte gezeigt werden, dass sich das Fucoxanthin im Fettgewebe der HFD-Versuchstiere anreichert und die Gewichtszunahme der Tiere, die Zunahme des Körperfettanteils sowie der Anteil des adipösen Fettgewebes („white adipose tissue“, WAT) gegenüber der Kontrolldiät weniger stark ausgeprägt war. Zusammenfassend legen die Ergebnisse

einen Einfluss des Lipidextraktes aus *P. tricornutum* auf den Fettstoffwechsel in-vivo nahe und damit auch eine Verwendung der Extrakte als „functional food“.

Gemeinsame Untersuchungen mit Neumann et al. (2018) deuten zudem darauf hin, dass die in dieser Arbeit verwendete *P. tricornutum* UTEX 640 Biomasse keine toxischen Effekte in-vivo aufweist und auch keine Entzündungsreaktionen auslöst (Neumann et al., 2018a). Untersucht wurde dieser Sachverhalt in einer Studie, in welcher die Biomasse über 14 Tage an C57BL/6-Mäuse bis zu einem Anteil von 25 % am Gesamtfutter in einer isokalorischen Diät verfüttert wurde. Die Gewichtszunahme der Mäuse unterschied sich nicht von der Gruppe mit einer Kontrolldiät. Es konnte somit eine ausreichende Bioverfügbarkeit der Proteine und Fettsäuren nachgewiesen werden. Speziell EPA konnte im Lebergewebe der mit *P. tricornutum* Biomasse gefütterten Versuchstiere nachgewiesen werden.

Zusammenfassend deuten die vorgestellten Studien auf das gesundheitsfördernde Potential der beiden gewonnenen Inhaltsstoffe EPA und Fucoxanthin hin und legen den Einsatz der beiden Inhaltsstoffe entweder in Nahrungs- und Futtermitteln, oder auch kosmetischen Produkten nahe.

## **5.7 Bewertung des neu entwickelten Herstellungsverfahrens für EPA und Fucoxanthin**

Es wurde in dieser Arbeit erstmals eine ökonomische Bewertung eines integrierten Verfahrens zur Produktion von Fucoxanthin und einem EPA-reichem Öl mit Mikroalgen auf Grundlage empirischer Daten durchgeführt. Hierzu dienten die in Kap. 5.1 bis 5.4 experimentell ermittelten Ergebnisse. Das betrachtete Verfahren umfasst sowohl die Kultivierung der Kieselalge *P. tricornutum* UTEX 640 unter artifizierlicher Beleuchtung, als auch den Zellaufschluss der Biomasse, die Extraktion beider Wertstofffraktionen sowie deren Trennung.

Um wesentliche Kostentreiber des Verfahrens zu identifizieren und Möglichkeiten zur Kostenreduktion zu evaluieren, wurden für das Verfahren drei Produktionsszenarien im Pilot- und Industriemaßstab definiert (Kap. 5.7.1). Die Abschätzung der Produktionskosten erfolgte gemäß Kap. 4.9.1 durch die Berechnung der operativen Betriebskosten (OPEX, engl. „operating expenditures“) sowie der Investitionskosten (CAPEX, engl. „capital expenditures“). Für die nachfolgende ökonomische Bewertung wurden für die Szenarien, insbesondere im Industriemaßstab, verschiedene Annahmen getroffen, welche in Kap. 4.9.2 dargestellt sind. Abb. 42 zeigt ein Verfahrensflißbild des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Herstellungsverfahrens.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

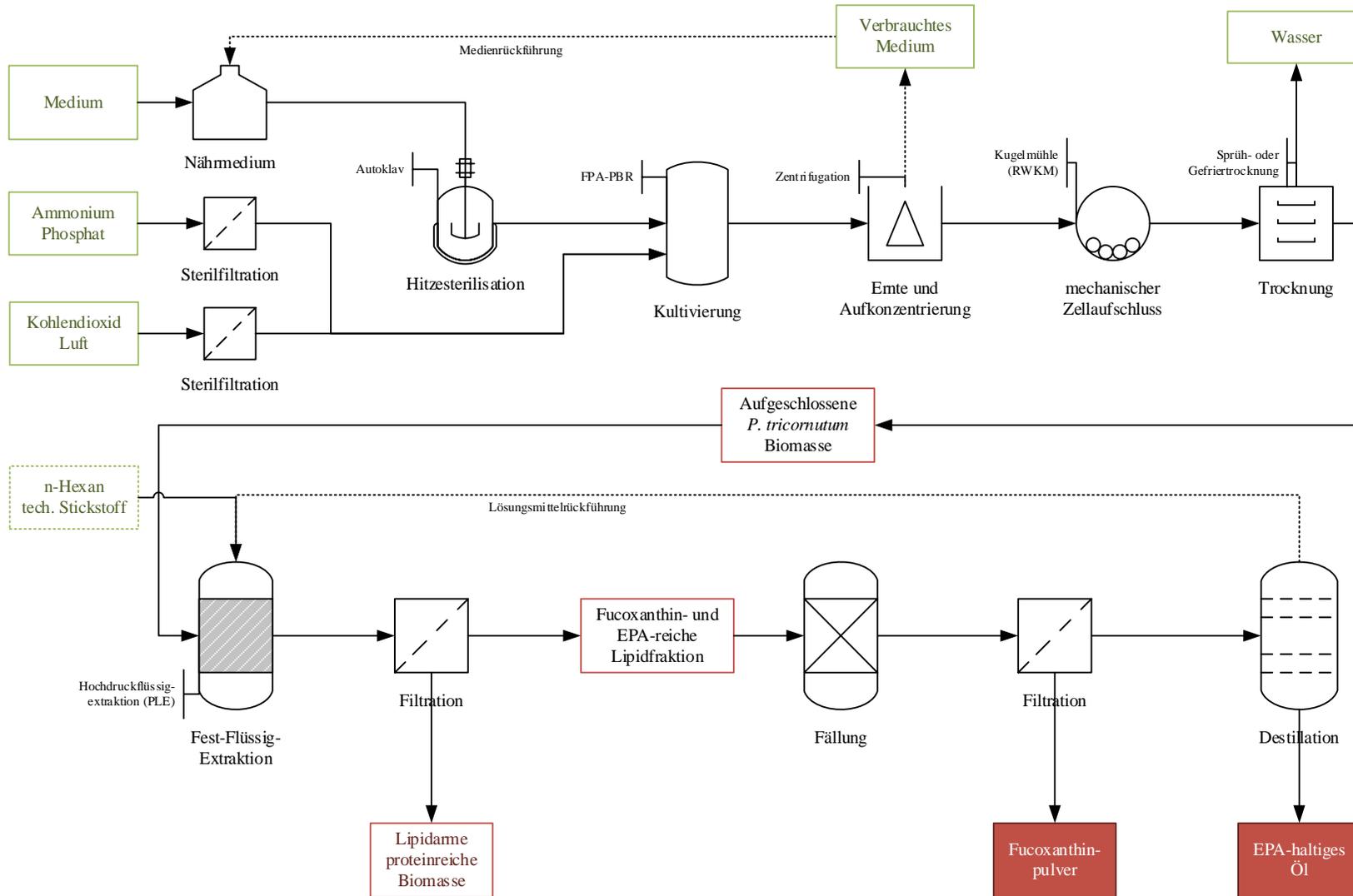


Abbildung 42: Prozessfließbild mit wesentlichen Stoffströmen und in der Arbeit verwendeten Verfahrensschritten bis zu den beiden Endprodukten im Labormaßstab. Gestrichelte Linien zeigen mögliche Rückführungsmöglichkeiten, welche nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, aber Bestandteil der ökonomischen Bewertung bzw. Diskussion im vorliegenden Kapitel sind.

Im dargelegten Prozess wird das Medium zunächst steril bereitgestellt. Während das Kulturmedium in dieser Arbeit im Labormaßstab autoklaviert wurde, wird es, genau wie die mit CO<sub>2</sub> angereicherte Zuluft, in größeren Anlagen in der Regel sterilfiltriert (Brintzer, 2019). Dies wurde auch für die nachfolgend betrachteten Szenarien angenommen (siehe Kap. 4.9.2).

Die Nährstoffe Ammonium und Phosphat werden steril, ausgehend von Stammlösungen, über eine Steuerungseinheit automatisiert zugegeben. Die Kultivierung von *P. tricornutum* im FPA-PBR erfolgt analog der in Kap. 5.3 ermittelten Parameter mit M&M-Medium als „repeated Fed-Patch“-Prozess mit einer täglichen Verdünnung auf die initiale Biomassekonzentration von 6 g L<sup>-1</sup> unter dauerhafter artifizieller Beleuchtung mit einer relativen Lichtverfügbarkeit von 8 μmol g<sup>-1</sup> s<sup>-2</sup>. Hieraus folgt nach Kap. 5.3.1 eine volumetrische Biomasseproduktivität von 1,53 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Es folgt somit die Ernte und Aufkonzentrierung des geernteten Teils der Biomassesuspension mit einer Biomassekonzentration von  $c_X = 7,53 \text{ g L}^{-1}$  mittels Zentrifuge auf einen Feststoffanteil von 10 %<sub>w/w</sub>. Anschließend wird ein mechanischer Zellaufschluss des Slurrys mittels Rührwerkskugelmühle, wie in Kap. 4.5.1 beschrieben, durchgeführt und die Algenbiomasse getrocknet. Im nächsten Schritt wird die getrocknete Algenbiomasse mit einem biomassespezifischen Fucoxanthinanteil von  $\omega_{\text{FX}} = 16,2 \text{ mg g}^{-1}$  und einem biomassespezifischen EPA-Anteil  $\omega_{\text{EPA}} = 40,2 \text{ mg g}^{-1}$  (siehe hierzu Kap. 5.3.2 und Kap. 5.3.3) einer subkritischen Fest-Flüssig-Extraktion mit n-Hexan bei 100 °C zur Gewinnung einer Fucoxanthin- und EPA-haltigen Lipidfraktion unterzogen. Ausgehend von der erzeugten Lipidfraktion und unter Berücksichtigung der ermittelten Ausbeuten (siehe Kap. 5.4) erfolgt die Separation des Fucoxanthins aus der Lipidfraktion, wie in Kap. 4.5.4 beschrieben, mittels Fällung zur Erzeugung des aufgereinigten pulverförmigen Fucoxanthins und eines EPA-reichen Mikroalgenöls.

### 5.7.1 Definition der Produktionsszenarien

Aus den experimentell gewonnenen Ergebnissen im Labor- und technischen Maßstab wurden, unter Berücksichtigung von Erfahrungswerten zur phototrophen Mikroalgenproduktion im Pilotmaßstab am Fraunhofer CBP, nachfolgend verschiedene Produktionsszenarien entwickelt (Brintzer, 2019). Die Dimension der Szenarien orientiert sich an der Arbeit von Thomassen et al. (2016) zur Produktion von beta-Carotin mit *D. salina* sowie Astaxanthin mit *H. pluvialis* (Thomassen et al., 2016). Neben einem Basisszenario im Pilotmaßstab werden zwei Industrieszenarien mit dem Standort Deutschland betrachtet, welche jeweils der Produktion von 170 t a<sup>-1</sup> Biotrockenmasse dienen. Die Abschätzung der Investitionskosten und der operativen Betriebskosten orientieren sich an den wenigen verfügbaren Publikationen zur Bewertung von Mikro-

algen-basierten Produktionsprozessen (Acién et al., 2012; Tabernero et al., 2012; Banerjee und Ramaswamy, 2019). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit lag der Fokus in allen drei zuvor genannten Publikationen auf der photoautotrophen bzw. heterotrophen Kultivierung von Mikroalgen zur Biodieselproduktion und nicht auf der Herstellung von Hochwertprodukten. Im Fall der phototrophen Kultivierung wurde in den genannten Studien, anders als in dieser Arbeit, auf die Verwendung einer artifiziellen Beleuchtung der Mikroalgen verzichtet. Kosten für die Aufarbeitung, wie z.B. für den Zellaufschluss oder die gezielte Extraktion von Wertstoffen aus der erzeugten Mikroalgenbiomasse, fanden in den Studien, anders als in der vorliegenden Arbeit, ebenfalls keine Berücksichtigung.

Folgende Szenarien werden nachfolgend in der vorliegenden Arbeit diskutiert:

#### *Basis-Szenario (BS)*

Das Basisszenario geht von einer kleinen Pilotanlage aus, wie sie beispielweise am Fraunhofer CBP betrieben wird. Die im Szenario betrachtete Pilotanlage zur Kultivierung der Mikroalgen umfasst zehn Module mit jeweils fünf FPA-PBR mit einem Arbeitsvolumen von jeweils 26 L.

#### *Industrie-Szenario (IS)*

Das Industrieszenario geht von einer industriellen Produktionsanlage mit einer Produktionskapazität von  $170 \text{ t a}^{-1}$  *P. tricornutum*-Biomasse aus. Ein ähnliches Produktionsvolumen wurde bereits durch Thomassen et al. (2016) für die Produktion von Astaxanthin mit *H. pluvialis* und beta-Carotin mit *D. salina* untersucht (Thomassen et al., 2016).

#### *Hypothetisches-Industrie-Szenario (HIS)*

Das hypothetische Industrieszenario geht von einer Übertragbarkeit des in dieser Arbeit entwickelten Kultivierungsprozesses bzw. der gewonnenen Produktionsdaten von 26 L- in den 180 L-FPA-PBR (operatives Volumen 178,5 L) bei einer Produktionskapazität von ebenfalls  $170 \text{ t a}^{-1}$  getrockneter Biomasse aus. Es sei erwähnt, dass hierbei u.a. die aufgrund der Statik erhöhte Schichtdicke der Reaktoren von 3 cm auf 5 cm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz zu einer schlechteren Lichtversorgung in der Kultur führt, welche sich wiederum negativ auf die Biomasseproduktivität auswirken kann. Daher muss diese Maßstabsvergrößerung noch experimentell validiert werden bzw. Parameter wie die relative Lichtverfügbarkeit an das neue Reaktorvolumen sowie die abweichende Reaktorgeometrie angepasst werden. Dieses Szenario ist daher hypothetisch. Es kann aber dennoch dazu dienen, mögliches Einsparpotential durch eine Vergrößerung des Reaktorvolumens zu identifizieren.

Für die Produktionsanlage wurde jeweils als Standort ein Gewächshaus angenommen. Als Anlagenstandort für alle Szenarien wurde, analog zur Pilotanlage des Fraunhofer CBP in Leuna, Deutschland gewählt. Standortabhängige Faktoren, wie z.B. die erforderliche Kühlung und Beheizung des Gewächshauses, Wasserverluste durch Evaporation oder der Grundstückspreis für Industrieland, wurden entsprechend gewählt. Es wird ferner von einer Lebenszeit der jeweiligen Anlage von 20 Jahren ausgegangen. Alle getroffenen Annahmen sind in Kap. 4.9.2 im Detail beschrieben.

### 5.7.2 Bewertung der Energie- und Massenbilanzen für die Produktionsszenarien

In Anbetracht der in dieser Arbeit gewonnenen Prozessdaten und unter Berücksichtigung der im vorherigen Kapitel dargelegten Annahmen ergeben sich für die drei Szenarien (siehe Kap. 5.7.1) verschiedene Massenströme und Energieeinträge, welche nachfolgend dargestellt und diskutiert werden. Tabelle 14 und 15 fassen wesentliche ausgewählte Kenngrößen sowie die für die Kultivierung von *P. tricornutum* in den drei Szenarien notwendigen Massen- und Energieeinträge zusammen.

Tabelle 14: Übersicht wesentlicher Kenngrößen der in dieser Arbeit betrachteten Produktionsszenarien. Eine detaillierte Übersicht aller für die Bewertung verwendeten Ausgangsdaten findet sich im Anhang (Kap. A2.2).

	<b>Basisszenario</b>	<b>Industrieszenario</b>	<b>Industrieszenario</b>
<b>Nennvolumen (FPA-PBR)</b>	30 L Reaktor <sup>-1</sup>	30 L Reaktor <sup>-1</sup>	180 L Reaktor <sup>-1</sup>
<b>operatives Volumen (FPA-PBR)</b>	26 L Reaktor <sup>-1</sup>	26 L Reaktor <sup>-1</sup>	178,5 L Reaktor <sup>-1</sup>
<b>vol. Biomasseproduktivität <sup>(1)</sup></b>	1,53 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	1,53 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	1,53 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
<b>Massenanteil Fucoxanthin<sup>(1)</sup></b>	16,2 g kg <sup>-1</sup>	16,2 g kg <sup>-1</sup>	16,2 g kg <sup>-1</sup>
<b>Massenanteil EPA<sup>(1)</sup></b>	40,2 g kg <sup>-1</sup>	40,2 g kg <sup>-1</sup>	40,2 g kg <sup>-1</sup>
<b>Anzahl Reaktoren (Module)</b>	50 (10)	12100 (2420)	1765(353)
<b>Gesamtvolumen</b>	1,3 m <sup>3</sup>	314,6 m <sup>3</sup>	315,1 m <sup>3</sup>
<b>Flächenbedarf</b>	0,02 ha	4,25 ha	1,04 ha
<b>Produktionstage pro Jahr<sup>(2)</sup></b>	353 d a <sup>-1</sup>	353 d a <sup>-1</sup>	353 d a <sup>-1</sup>
<b>tägl. Betriebsdauer</b>	24 h d <sup>-1</sup>	24 h d <sup>-1</sup>	24 h d <sup>-1</sup>
<b><i>P. tricornutum</i> Gesamtbiomasse<sup>(3)</sup></b>	0,7 t a <sup>-1</sup>	170 t a <sup>-1</sup>	170 t a <sup>-1</sup>

<sup>(1)</sup> ermittelt in Kap. 5.3.1 bis 5.3.3 bei 8  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ ; <sup>(2)</sup> Berücksichtigt sind hier 12 d a<sup>-1</sup> für die Reinigung der Reaktoren; <sup>(3)</sup> bezogen auf die produzierte Biomassemenge (Trockengewicht) vor der Aufarbeitung.

Wie aus Tab. 15 ersichtlich, ist der mit Abstand höchste Energieeintrag während der Kultivierung für die artifizielle Beleuchtung der FPA-PBR notwendig. Abhängig vom Szenario macht die LED-Beleuchtung zwischen 53 und 72 % des Gesamtenergieeintrages aus, gefolgt von der Kühlung der Reaktoren und des Gewächshauses mit jeweils 20 bis 41 %. Ein direkter Vergleich des Anteils des ermittelten Energieeintrags für die artifizielle Beleuchtung ist aus Mangel an Literaturdaten nicht möglich. Bisher verfügbare Untersuchungen zu diesem Thema basieren auf Literaturrecherchen. Blanken et al. (2013) beispielsweise identifizierte die LED-

Beleuchtung in einer Literaturstudie als einen der Hauptenergieverbraucher bei der Algenkultivierung und als wesentlichen Kostenfaktor (Blanken et al., 2013).

Wie auch durch Jorquera et al. (2010) beschrieben, fällt bei Flachplatten-Airlift-Reaktoren die einzubringende Energie zur Begasung bzw. Durchmischung des Systems aufgrund der Geometrie wesentlich geringer aus, als es z.B. bei Rohrreaktoren der Fall ist (Jorquera et al., 2010). Der Unterschied im Energieeintrag für die Durchmischung bzw. Begasung zwischen beiden Industrieszenarien ergibt sich im Wesentlichen aus der Anpassung des Druckluftkompressors an das Volumen (Begasungsrate in vvm bleibt konstant) und die Höhe der 180 L-Reaktoren gegenüber den 30 L-Reaktoren (Druck der Wassersäule). Hierfür wurden Kompressoren mit gesteigerter Leistung berücksichtigt, deren Gesamtenergiebedarf jedoch sinkt, da insgesamt weniger Module bzw. Reaktoren zur Produktion der 170 t a<sup>-1</sup> Biomasse versorgt werden müssen.

Tabelle 15: Ermittelte jährlicher Energiebedarf für die Kultivierung und die Produktaufarbeitung in MWh a<sup>-1</sup>.

	<b>Basisszenario (BS)</b>	<b>Industrieszenario (IS)</b>	<b>Industrieszenario (HIS)</b>
<i>1. Kultivierung (USP)</i>			
<b>LED-Beleuchtung</b>	393	95.068	69.337
<b>Temperierung</b>	300	70.981	21.278
<b>Durchmischung und Pumpen</b>	12	2.979	2.983
<b>Steuerung und Sensorik</b>	4	953	141
<i>2. Aufarbeitung (DSP)</i>			
<b>Aufkonzentrierung</b>	0,1	29	29
<b>Zellaufschluss</b>	1,0	118	118
<b>Trocknung</b>	7,1	1.727	1.729
<b>Extraktion/Separation</b>	14,8	2.368	2.368
<b>ΣGesamtbedarf</b>	<b>732</b>	<b>174.223</b>	<b>97.983</b>

Vergleicht man die beiden Industrieszenarien (IS und HIS) miteinander, so wird insbesondere deutlich, dass im Fall der 180 L-Reaktoren der Energieeintrag für die LED-Beleuchtung als auch für die Temperierung aufgrund der reduzierten Reaktoranzahl und Gewächshausfläche sinkt. Da sich der niedrigere Energieeintrag für die artifizielle Beleuchtung der 180 L-Reaktoren aus dem niedrigeren A/V-Verhältnis (Fläche zu Volumen) aufgrund der Schichtdicke von 5 cm statt 3 cm ergibt, dürfte dieser in der Praxis jedoch aufgrund der schlechteren Lichtverfügbarkeit im 180 L FPA-PBR tatsächlich höher ausfallen. Der niedrigere Energieeintrag ist hier zunächst also ein Resultat der in Kap. 4.9.2 getroffenen Annahme zur Übertragbarkeit des Prozesses vom 30 in den 180 L-Maßstab. Wie zuvor bereits erwähnt, sind zur genauen Validierung dieses Sachverhaltes experimentelle Daten des Prozesses im artifiziell beleuchteten 180 L FPA-PBR notwendig.

Insgesamt ist der ermittelte Energiebedarf für die Produktion (USP) von 170 t a<sup>-1</sup> *P. tricornutum* Biomasse mit dem durch die Gruppe um Thomassen et al. (2016) für die zweistufige Produktion von Astaxanthin mit *H. pluvialis* (ebenfalls 170 t a<sup>-1</sup> Biomasse) ermittelten Energieaufwand vergleichbar (Thomassen et al., 2016). Thomassen et al. (2016) gingen bei ihrer Analyse von der Nutzung von natürlichem Licht aus. Der durch Thomassen et al. (2016) ermittelte Energieeintrag für die Kultivierung von *H. pluvialis* (Wachstumsstufe) von umgerechnet etwa 42.250 MWh a<sup>-1</sup> (152.107 GJ a<sup>-1</sup>) liegt zwischen dem in dieser Arbeit für beide Industrieszenarien berechneten Energiebedarf von jeweils 28.646 MWh a<sup>-1</sup> (HIS) bzw. 79.155 MWh a<sup>-1</sup> (IS), wenn man den Anteil für die LED-Beleuchtung abzieht. Es sei erwähnt, dass im Fall der Produktion von Astaxanthin-reicher *H. pluvialis*-Biomasse im Gegensatz zur Produktion von Fucoxanthin-reicher *P. tricornutum*-Biomasse noch eine zweite Prozessstufe zur stress-bedingten Akkumulation des Schutzpigmentes Astaxanthins notwendig ist. Hierfür errechneten Thomassen et al. (2016) einen zusätzlichen Energieaufwand von umgerechnet 19.401 MWh a<sup>-1</sup> (69.845 GJ a<sup>-1</sup>). Betrachtet man beide Prozessstufen zusammen, liegt der Energiebedarf zur Astaxanthinproduktion unter natürlicher Beleuchtung somit in einer ähnlichen Größenordnung wie der Energiebedarf für die einstufige Kultivierung von *P. tricornutum* mit artifizieller Beleuchtung (IS).

Betrachtet man die in den Prozess ein- und ausgehenden Massenströme (Tab. 16), so fällt generell der hohe CO<sub>2</sub>-Verbrauch des FPA-PBR auf. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass dem System ein Übermaß an CO<sub>2</sub> zugesetzt wird und der überwiegende Teil des CO<sub>2</sub> aufgrund der sehr geringen Verweilzeit im System ungenutzt ausgetragen wird. Der hohe CO<sub>2</sub>-Anteil wird im Fall des FPA-PBR für die Steuerung des pH-Wertes benötigt (Münkel, 2015). Ist es das Ziel den CO<sub>2</sub>-Verbrauch zu reduzieren oder das CO<sub>2</sub> vollständig zu sequestrieren, so ist bei einer Produktionsanlage die Installation einer CO<sub>2</sub>-Rückführung unumgänglich. Eine vollständige Sequestrierung des im Verfahren eingesetzten CO<sub>2</sub> ist nicht nur im Sinne der Nachhaltigkeit, sondern für den Standort Deutschland auch unter ökonomischen Gesichtspunkten, aufgrund der Umweltsteuer auf die Emission von CO<sub>2</sub>, erstrebenswert (Bundesregierung, 2019). Im Hinblick auf den kumulierten CO<sub>2</sub>-Fußabdruck (direkte und indirekte CO<sub>2</sub>-Emission) innerhalb der hier diskutierten Szenarien ist der Anteil des direkten Ausstoßes von 1,9 (30 L) bzw. 3,4 % (180 L) jedoch gering (Weickert, 2019). Den größten Anteil von 97,4 % bzw. 95,8 % stellt als indirekter CO<sub>2</sub>-Ausstoß der Gesamtstrombedarf dar, der durch effektivere Geräte, insbesondere im Hinblick auf die LED-Beleuchtung und die Nutzung von erneuerbaren Energien, reduziert werden könnte.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 16: Zusammenfassung der jährlich ein- und ausgehenden Massenströme für die Kultivierung, die Reinigung und Sterilisation der FPA-PBR und die Aufarbeitung der Biomasse, sowie erzeugte Produkte und Nebenströme.

	<b>Basisszenario (BS)</b>	<b>Industrieszenario (IS)</b>	<b>Industrieszenario (HIS)</b>
<b>Input:</b>			
<b>1. Kultivierung</b>			
<b>CO<sub>2</sub></b> <sup>[1]</sup>	7,5 t a <sup>-1</sup>	1.818 t a <sup>-1</sup>	1.821 t a <sup>-1</sup>
<b>Nährmedium</b> <sup>[1]</sup>	93 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>	22.564 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>	22.597 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>
<b>el. Stickstoff (N)</b> <sup>[1]</sup>	370 kg a <sup>-1</sup>	89 t a <sup>-1</sup>	89 t a <sup>-1</sup>
<b>el. Phosphor (P)</b> <sup>[1]</sup>	103 kg a <sup>-1</sup>	25 t a <sup>-1</sup>	25 t a <sup>-1</sup>
<b>Eisen(II)citrat</b> <sup>[1]</sup>	< 0,1 kg a <sup>-1</sup>	2,9 kg a <sup>-1</sup>	2,9 kg a <sup>-1</sup>
<b>Wasser (Verdampfung)</b>	3,5 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>	854 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>	860 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>
<b>2. Sterilization</b>			
<b>Wasserstoffperoxid (35%)</b> <sup>[2]</sup>	1,8 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>	435,6 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>	436,2 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>
<b>Wasser</b> <sup>[2]</sup>	52 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>	12.632 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>	12.651 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>
<b>3. Aufarbeitung</b>			
<b>n-Hexan</b> <sup>[3]</sup>	0,2 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>	55,4 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>	55,4 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>
<b>Stickstoff (40 bar)</b>	1,0 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>	1.694 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>	1.694 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>
<b>Output:</b>			
<b>Produkt</b>			
<b>EPA-haltiges Öl (EPA)</b>	82,2 (26,5) kg a <sup>-1</sup>	19,9 (6,4) t a <sup>-1</sup>	20,1 (6,5) t a <sup>-1</sup>
<b>Fucoxanthinpulver</b>	4,6 kg a <sup>-1</sup>	1,1 t a <sup>-1</sup>	1,1 t a <sup>-1</sup>
<b>Nebenströme:</b>			
<b>Extrahierte Restbiomasse</b>	567,2 kg a <sup>-1</sup>	137,3 t a <sup>-1</sup>	138,6 t a <sup>-1</sup>
<b>Salzhaltiges Abwasser/Medium</b>	6,6 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>	20.917 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>	21.064 m <sup>3</sup> a <sup>-1</sup>

<sup>[1]</sup> eine CO<sub>2</sub>-, Medien- bzw. Nährstoffrückgewinnung wurde hier nicht betrachtet; <sup>[2]</sup> ausgehend von einer einmaligen Nutzung zur Sterilisation; <sup>[3]</sup> ausgehend von einer destillativen Rückgewinnung.

Im Hinblick auf die Massenströme im Prozess erscheint es im Fall von *P. tricornutum* zwingend notwendig, eine Lösung für die anfallenden großen Mengen an salzhaltigem Abwasser nach der Ernte der Kultur zu finden. Bei wesentlichen Teilen handelt es sich hierbei um verbrauchtes Brackwasser-Nährmedium (10 g L<sup>-1</sup> NaCl) mit großen Teilen des während der Kultivierung zugesetzten Stickstoffs- und Phosphates (siehe Tab. 16). Denkbar wäre hier eine Aufarbeitung bzw. Rückführung des Mediums durch eine erneute Anreicherung mit fehlenden Spurenelementen und Substraten. Damit wäre es auch möglich, erhebliche Teile des frischen Mediums zu substituieren und den Frischwasserbedarf zu reduzieren. Folglich könnte auf eine etwaige aufwendige Entsalzung bzw. Aufarbeitung der Abwässer vor der Freisetzung in die Umwelt verzichtet werden.

Eine zusätzliche Lösung muss idealerweise für die Nutzung der erheblichen Mengen an extrahierter Restbiomasse gefunden werden. Denkbare Szenarien wären hier eine stoffliche Verwertung der entfetteten, protein- und kohlenhydratreichen Restbiomasse in einer Biogas-

anlage oder als aminosäure-reiches Futtermitteladditiv in der Tierzucht, z.B. in Aquakulturen. Die Nutzung von *P. tricornutum*-Biomasse als Futtermittel in Aquakulturen wurde bereits beschrieben (Sørensen et al., 2016). Eine Biogasanlage könnte in erweiterten Szenarien schlussendlich auch als Lieferant für den benötigten Bedarf an Strom und CO<sub>2</sub> herangezogen werden. CO<sub>2</sub> fällt im Biogasprozess neben dem Hauptprodukt Methan zwangsläufig an. Derartige Konzepte zur Integration dezentraler Energie- und Substratquellen in Deutschland werden auf Basis des hier entwickelten Prozesses aktuell im Forschungsvorhaben „Ökonomische und ökologische Bewertung eines Bioraffinerieansatzes zur Produktion von Fucoxanthin und EPA im Pilotmaßstab und transdisziplinär entwickelter Szenarien im Industriemaßstab in Deutschland“, gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), am Fraunhofer IGB, dem Karlsruher Institut für Technologie (KIT) und der Universität Hohenheim weiterführend untersucht.

### 5.7.3 Abschätzung der Investitions- und Betriebskosten (CAPEX/OPEX)

Um eine Übersicht über die Gesamtkostenstruktur zur Produktion beider Wertstoffe zu ermöglichen, wurden am Beispiel der entwickelten Szenarien in Abb. 43 und 44 zunächst wesentliche Produktions- und Investitionskosten der Kultivierung und der Aufarbeitung der Biomasse bis hin zu den Endprodukten Fucoxanthin und einem EPA-reichen Algenöl dargestellt. Abb. 43 gibt zunächst einen Überblick über die Investitionskosten (engl. "Major Equipment Costs", MEC) für wesentliche für den Prozess notwendige Maschinen. Kosten für die Installation und Wartung, die Verrohrung der Maschinen sowie Kosten für die notwendigen Gebäude wurden nachfolgend prozentual von den MEC abgeleitet und fließen in Tab. 19 zur Berechnung der Gesamtinvestitionskosten (CAPEX) ein (siehe hierzu Kap. 4.9.1).

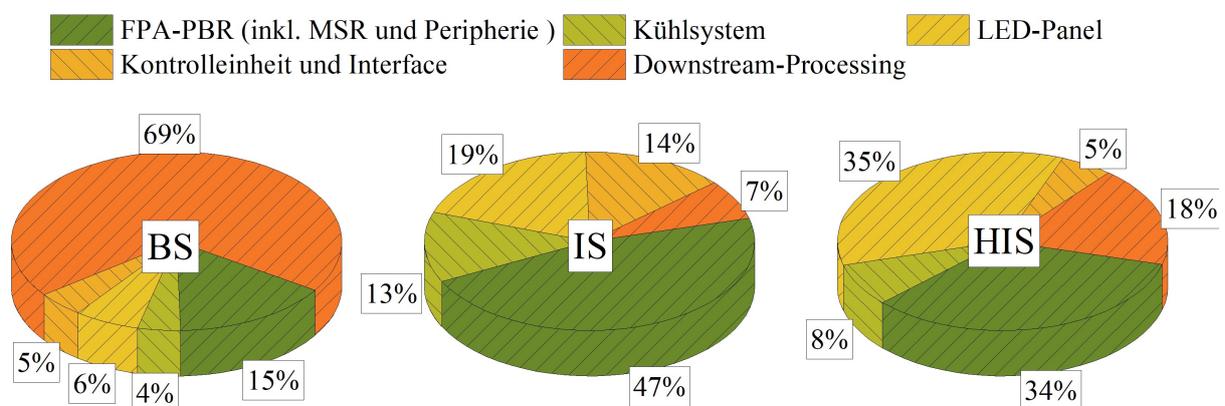


Abbildung 43: Relative Anteile der Investitionskosten (engl. "Major Equipment Costs", MEC) der für den Prozess wesentlichen Maschinen bzw. Geräte. Dargestellt sind die MEC für die drei zuvor definierten Szenarien. BS = Basisszenario; IS = Industrieszenario; HIS = Hypothetisches Industrieszenario.

Tabelle 17: Investitionskosten (engl. "Major Equipment Costs", MEC) der für den Prozess wesentlichen Maschinen bzw. Geräte. BS = Basisszenario; IS = Industrieszenario; HIS = Hypothetisches Industrieszenario.

Geräteklasse	BS	IS	HIS
FPA-PBR inkl. MSR und Peripherie	170.600 €	41.285.200 €	11.900.336 €
Kühlsystem	46.250 €	11.192.500 €	2.733.112 €
LED-Panel	70.399 €	17.036.602 €	12.420.824 €
Kontrolleinheit und Interface	51.000 €	12.342.000 €	1.800.300 €
Downstream-Processing	767.126 €	6.380.898 €	6.380.898 €
<b>∑ Gesamtinvestitionskosten (MEC)</b>	<b>1.105.375 €</b>	<b>88.237.199 €</b>	<b>35.235.470 €</b>

Wie aus Abb. 43 ersichtlich, bilden die für die Aufarbeitung der Biomasse notwendigen Geräte im Basisszenario mit einem relativen Anteil von 69 % den wesentlichen Anteil an den Investitionskosten bezogen auf das Hauptprozessequipment. Dies ist neben dem verhältnismäßig hohen Preis für DSP-Geräte im technischen bzw. Pilotmaßstab auch der Tatsache geschuldet, dass selbst die technisch kleinsten verfügbaren Geräte für das DSP, wie z.B. die Kugelmühle, der Sprühturm oder die verwendete Zentrifuge zur Entwässerung der Biomasse für dieses Szenario überdimensioniert sind. Sie können folglich auch nicht vollständig ausgelastet werden. Der relative Anteil der Investitionskosten der für die Kultivierung der Algenbiomasse notwendigen Photobioreaktoren inklusive der LED-Beleuchtung liegt im Pilotmaßstab daher bei lediglich 21 %.

Ein Vergleich der relativen Investitionskosten für das DSP im Basisszenario (BS) mit denen der Industrieszenarien (IS und HIS) lässt hingegen eine sehr deutliche Abnahme des DSP-Kostenanteils am Gesamtprozess erkennen (Abb. 43). Dies ist zum einen begründet durch die Tatsache, dass die im DSP eingesetzten Maschinen nun vollständig ausgelastet werden können. Zum anderen ist es auf die technische Verfügbarkeit von entsprechend großen Maschinen zurückzuführen, so dass klassische Skalierungsfaktoren greifen können. Eine Reduktion der Investitionskosten erfolgt im Bereich des USP, insbesondere aufgrund der modularen Bauweise der Algenanlage bzw. FPA-PBR-Module, nur in einem kleineren Maße. Die Investitionskosten für das DSP sinken somit deutlich stärker als es im Bereich des USP der Fall ist. Hierbei unterscheidet sich der phototrophe Kultivierungsprozess im FPA-PBR entscheidend von klassischen heterotrophen Prozessen in geschlossenen Fermentern, in welchen die Bioreaktoren unter Berücksichtigung von relevanten Verfahrensparametern, wie z.B. dem Sauerstoffübertragungsrate (OTR) und mechanischer Scherbeanspruchung der Zellen durch Rührer, unabhängig von der Reaktoroberfläche vergrößert werden können (Reza, 2019).

Vergleicht man das IS mit dem HIS (Abb. 43), so steigt der relative Anteil des DSP an den Investitionskosten wieder an, obwohl insgesamt in beiden Szenarien die gleiche Menge Biomasse prozessiert wird und damit auch die gleichen absoluten Investitionskosten für das DSP vorliegen. Dieser relative Anstieg des DSP-Anteils zeigt, dass nun auch im Bereich der Kultivierung (USP) ein Scale-up stattgefunden hat, welcher sich grundlegend auf die gerätespezifischen Investitionskosten am Gesamtprozess auswirkt. Die Ursache für diesen Effekt liegt im Wesentlichen am Scale-up des Reaktorvolumens von 30 auf 180 L und damit einer Reduktion der Anzahl der notwendigen Reaktoren. Damit einhergehend sind insbesondere auch weniger Steuerungs- und Regelungstechnik sowie weniger Pumpen notwendig.

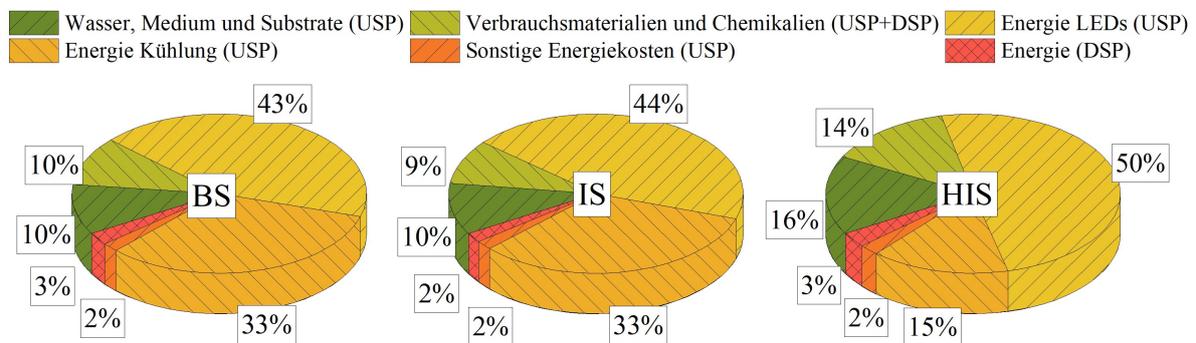


Abbildung 44: Relative Verteilung der operativen Kosten für wesentliche Energie-, Massenströme- und Verbrauchsmaterialien. Dargestellt sind die operativen Kosten für die drei zuvor definierten Szenarien. BS = Basisszenario; IS = Industrieszenario; HIS = Hypothetisches Industrieszenario.

Tabelle 18: Operative Kosten für wesentliche Energie-, Massenströme- und Verbrauchsmaterialien. Dargestellt sind die operativen Kosten für die drei zuvor definierten Szenarien. BS = Basisszenario; IS = Industrieszenario; HIS = Hypothetisches Industrieszenario.

Position	BS	IS	HIS
Wasser, Medium und Substrate	14.552 €a <sup>-1</sup>	3.521.650 €a <sup>-1</sup>	3.479.082 €a <sup>-1</sup>
Verbrauchsmaterial und Chemikalien (USP+DSP)	14.142 €a <sup>-1</sup>	3.022.202 €a <sup>-1</sup>	3.022.634 €a <sup>-1</sup>
Energie für LEDs	61.166 €a <sup>-1</sup>	14.802.233 €a <sup>-1</sup>	10.795.843 €a <sup>-1</sup>
Energie für Kühlung	46.682 €a <sup>-1</sup>	11.051.778 €a <sup>-1</sup>	3.312.910 €a <sup>-1</sup>
Sonstige Energie	2.529 €a <sup>-1</sup>	612.128 €a <sup>-1</sup>	486.392 €a <sup>-1</sup>
Energie für DSP	3.599 €a <sup>-1</sup>	660.359 €a <sup>-1</sup>	660.851 €a <sup>-1</sup>
<b>Σ operative Gesamtkosten</b>	<b>142.672 €a<sup>-1</sup></b>	<b>33.670.352 €a<sup>-1</sup></b>	<b>21.757.715 €a<sup>-1</sup></b>

Neben den Investitionskosten der Hauptgeräte wurden auch die operativen Kosten der FPA-PBR sowie wesentlichen Maschinen im DSP erfasst. Als operative Kosten wurden in Abb. 44 zunächst nur Kosten berücksichtigt, welche sich aus den Energiekosten zum Betrieb der Geräte,

sowie Massenströmen und Verbrauchsmaterialien ergeben. Es fehlen also beispielsweise Lohn-, Overhead- und Wartungskosten, welche zur Ermittlung der operativen Gesamtkosten (OPEX) in Tab. 19, wie in Kap. 4.9.1, beschrieben, einbezogen wurden (Acién et al., 2012).

Wie aus Abb. 44 und Tab. 18 ersichtlich, stellt Szenarien-übergreifend der für die LED-Beleuchtung (43 bis 50 %) der Photobioreaktoren sowie die Kühlung (15 bis 33 %) der Reaktoren und des Gewächshauses notwendige Energieeintrag die Hauptkostenposition dar. Der für das DSP notwendige Energieeintrag ist im Vergleich dazu äußerst gering. Mit dem Einsatz eines größeren Reaktors sinkt der relative Anteil der notwendigen Kühlung, da die für die Reaktoren notwendige Grundfläche von 4,25 auf etwa 1,04 ha sinkt. Es sinkt somit auch die für das Gewächshaus notwendige Grundfläche und damit die notwendige Energie zu dessen Temperierung.

Tabelle 19: Zusammenfassung der Gesamtproduktionskosten (USP und DSP) aufgeteilt in operative Betriebsausgaben (OPEX) und Investitionsausgaben (CAPEX) in Anlehnung an die Methodik von Acién et al. (2012), sowie die Gesamtkosten pro kg prozessierter Biomasse. Ausgegangen wird von einer Lebensdauer der Anlage von 20 Jahren.

	BS	IS	HIS
<b>CAPEX</b>	180.202 €a <sup>-1</sup>	14.413.832 €a <sup>-1</sup>	5.749.095 €a <sup>-1</sup>
<b>OPEX</b>	439.160 €a <sup>-1</sup>	54.607.220 €a <sup>-1</sup>	32.998.738 €a <sup>-1</sup>
<b>∑ OPEX + CAPEX</b>	619.362 €a <sup>-1</sup>	69.021.052 €a <sup>-1</sup>	38.747.833 €a <sup>-1</sup>
<b>Kosten der Biomasse (USP+DSP)</b>	882,10 €kg <sup>-1</sup>	406,22 €kg <sup>-1</sup>	227,72 €kg <sup>-1</sup>

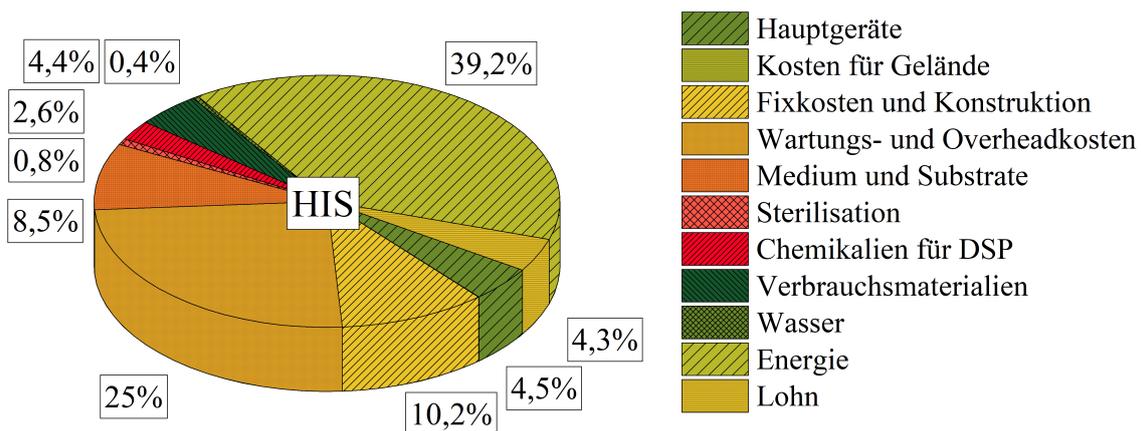


Abbildung 45: Anteilige Gesamtkostenverteilung für das hypothetische Industrieszenario (HIS).

Aus Tab. 19 wird deutlich, dass die Gesamtkosten zur Produktion der *P. tricornutum*-Biomasse mit zunehmender Größe der Szenarien sinken. Im Fall der 30 L FPA-PBR sinken die Kosten ausgehend vom Basisszenario von 822,10 auf 406,22 €kg<sup>-1</sup> im Industrieszenario (IS). Dies entspricht einer Reduktion von etwa 51 %. Eine Vergrößerung des Reaktorvolumens bei

derselben Anlagengröße wirkt sich nochmals positiv auf den Preis pro Kilogramm aus und führt zu einer Kostenreduktion um etwa 44 % auf 227,72 €kg<sup>-1</sup>. Insgesamt liegen die ermittelten Kosten pro kg Biomasse im Bereich bisheriger ökonomischer Bewertungen auf Basis von realen Produktionsdaten zur Erzeugung von Mikroalgenbiomasse in Rohrreaktoren mit dauerhafter artifizieller Beleuchtung zur Produktion von Futtermitteln in Aquakulturen im skandinavischen Raum von etwa 300 bis 600 €kg<sup>-1</sup> (Oosterland, 2019). Die Kosten liegen insgesamt deutlich über den Kosten für die Produktion heterotropher Mikroalgenbiomasse (unter 1 €kg<sup>-1</sup>) und auch weit über den Kosten klassischer heterotropher Prozesse, z.B. auf Basis von Hefezellen von < 0,5 €kg<sup>-1</sup> (Reza, 2019). Es sei jedoch erwähnt, dass sich heterotrophe Prozesse nur bedingt zur Erzeugung photosynthese-assoziiertes Wertstoffe wie EPA und Fucoxanthin eignen, da die Synthese dieser Wertstoffe als Teil des Photosynthese-Apparates unter metabolischen Gesichtspunkten nur bei der energetischen Nutzung von Licht und mit CO<sub>2</sub> als Substrat zwingend notwendig ist. Für Fucoxanthin ergeben sich für die Industrieszenarien (IS und HIS) produktspezifische Herstellkosten von 57.214 €kg<sup>-1</sup> (IS) bzw. 32.073 €kg<sup>-1</sup> (HIS). Die Kosten zur Herstellung von EPA liegen bei jeweils 13.103 €kg<sup>-1</sup> (IS) bzw. 7.346 €kg<sup>-1</sup> (HIS). Es konnten aus den Szenarien somit erstmals Produktionskosten für beide Wertstoffe ermittelt werden. Eine Einordnung der ermittelten Produktionskosten in das derzeitige Marktumfeld erfolgt im nachfolgenden Kapitel.

#### **5.7.4 Einordnung der Produktionskosten in das derzeitige Marktumfeld**

Die Wirtschaftlichkeit der Szenarien hängt grundlegend vom Marktpreis der beiden erzeugten Produkte ab. Auch wenn Fucoxanthin aus Makroalgen bereits kommerziell in bestehenden Produkten verarbeitet wird, so ist eine Abschätzung des Marktvolumens und Marktpreises derzeit nur sehr schwer möglich. Der Markt für Carotinoide wurde im Jahre 2016 auf etwa 1,24 Mrd. US\$ geschätzt mit einer Entwicklung auf 1,53 Mrd. US\$ im Jahre 2021 (Ambati et al., 2019). Wesentlich für die Marktentwicklung sind dabei die Carotinoide Astaxanthin, beta-Carotin und Lutein (Novoveská et al., 2019). Für Fucoxanthin, dessen Funktionalität am ehesten mit der von Astaxanthin verglichen werden kann, werden analog Marktpreise von etwa 10.000 €kg<sup>-1</sup> bei einer Marktgröße von etwa 500 t a<sup>-1</sup> (2015) und einem Wachstum von 6 % a<sup>-1</sup> genannt (Jouenne und Barbosa, 2018; Fengzheng, 2019). Bei einer höheren Reinheit wird sogar angenommen, dass der Preis für Fucoxanthin auf 40.000 bis 80.000 US\$ kg<sup>-1</sup> ansteigen kann (QY Research, 2015; Hu, 2019).

Der Markt für Omega-3-reiches Öl aus Mikroalgen lag bei etwa 375 Millionen Euro im Jahre 2014 (Globenewswire, 2017). Hochreines EPA aus Mikroalgen erreicht dabei Marktpreise von

etwa 4600 US\$ kg<sup>-1</sup>, während EPA-haltige Öle bei etwa 2 bis 540 €kg<sup>-1</sup> liegen (Jouenne und Barbosa, 2018; Hu, 2019). DHA-haltiges Öl wird mit einem Preis von etwa 50 US\$ kg<sup>-1</sup> verkauft. Als Preis für das EPA-haltige Öl aus *P. tricornutum* wurde in dieser Arbeit ausgehend von der genannten Preisspanne von einem mittleren Preis von 200 € kg<sup>-1</sup> ausgegangen. Ausgehend von den o.g. Marktwerten von 10.000 €kg<sup>-1</sup> für Fucoxanthin und 200 €kg<sup>-1</sup> für EPA-haltiges Algenöl ergibt sich, unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit ermittelten Ausbeuten, pro Kilogramm Biomasse ein theoretischer Mindestpreis von 89,60 € kg<sup>-1</sup> *P. tricornutum* Biomasse. Es wird angesichts der Gesamtkosten von mindestens 227,72 €kg<sup>-1</sup> (HI-Szenario, siehe Kap. 5.7.3) deutlich, dass unter den hier betrachteten Voraussetzungen kein wirtschaftlicher Prozess möglich ist. Dies ändert sich bei Betrachtung eines Preisanstiegs auf 45.000 \$US kg<sup>-1</sup> für hochreines Fucoxanthin (Hu, 2019). Der Wert der prozessierten *P. tricornutum* Biomasse würde damit auf 291,30 €kg<sup>-1</sup> ansteigen und läge damit etwa 28 % oberhalb der Produktionskosten des HI-Szenarios.

Es muss zudem bedacht werden, dass sich die postulierten Preise für Fucoxanthin, in Analogie zu bereits etablierten Produkten wie dem Astaxanthin, zumeist auf das Carotinoid als Bestandteil (3 bis 10 %<sub>w/w</sub>) in einem Lipidextrakt (Oleoresin) beziehen und nicht, wie in dieser Arbeit untersucht, auf ein aufgereinigtes Pulver mit einer Reinheit von über 90 %<sub>w/w</sub>. Ein entsprechendes Fucoxanthin- und EPA-haltiges Oleoresin mit einem Fucoxanthinanteil von etwa 7 % ließe sich nach Kap. 5.4.5, z.B. durch eine subkritische Extraktion mit Ethanol, Aceton oder Ethylacetat ohne eine weitere Aufbereitung erzeugen. Der prognostizierte Wert pro Kilogramm *P. tricornutum*-Biomasse würde damit, angesichts der etwa doppelt so hohen Extraktionsausbeuten gegenüber die hier betrachteten Extraktion mit n-Hexan (siehe Kap 5.4.5), sehr stark ansteigen.

### **5.7.5 Fazit und Maßnahmen zur Kostenreduktion**

Auf Grundlage der in dieser Arbeit ermittelten umfangreichen experimentellen Daten erfolgte erstmals eine Abschätzung der Produktionskosten (USP und DSP) für aufgereinigtes Fucoxanthin und ein EPA-reiches Algenöl aus *P. tricornutum*. Durch die ökonomische Bewertung verschiedener Szenarien konnten wesentliche Kostentreiber, wie z.B. die hohen Energiekosten für die artifizielle Beleuchtung und die Kühlung der FPA-PBR, identifiziert werden.

Die Ergebnisse zeigen zudem, dass klassische Skalierungsfaktoren, wie sie z.B. bei der Kostenabschätzung einer heterotrophen Kultivierung in klassischen Fermentern angewendet werden, aufgrund der typischerweise modularen Anlagenbauweise und bedingt durch die

photoautotrophe Kultivierung der Mikroalgen, nicht ohne Weiteres auf die Mikroalgenproduktion übertragen werden können. Die Daten zeigen im Fall des FPA-PBR, dass eine drastische Kostenreduktion des Biomassepreises ( $\text{€kg}^{-1}$ ) im Bereich USP durch eine reine Vergrößerung der Anlage durch Erhöhung der Reaktoranzahl nur bedingt möglich ist. Wesentliche Ansatzpunkte zur Kostenreduktion stellen vielmehr die Vergrößerung des Reaktorvolumens oder der Modulgröße dar (Kap. 5.7.3, vgl. Szenarien IS und HIS). Bei der Vergrößerung des Volumens des FPA-PBR stellt insbesondere die für die Statik des Reaktors notwendige Erhöhung der Schichtdicke und das damit reduzierte A/V-Verhältnis ein technisches Hindernis dar. Eine Vergrößerung der Modulgröße muss zunächst ebenfalls technisch untersucht werden, um eine homogene Verteilung von Nährstoffen über mehrere miteinander verbundene und in Reihe geschaltete Reaktoren zu gewährleisten (Laug, 2014). Im Bereich des DSP greifen für den Prozess hingegen klassische Skalierungseffekte, da für alle wesentlichen Prozessschritte entsprechend Geräte mit vergrößertem Volumendurchsatz, verringertem Energiebedarf und damit verbunden sinkender Investitions- und Betriebskosten kommerziell durch eine Vielzahl von Herstellern verfügbar sind.

Es konnte der Energieverbrauch für die artifizielle Beleuchtung und die Temperierung der Reaktoren und des Gewächshauses als ein wesentlicher Kostentreiber für den Gesamtprozess identifiziert werden (siehe Abb. 45, Kap. 5.7.3). Die gezeigten Szenarien gehen vom Standort Deutschland aus und damit verbunden auch von vergleichsweise hohen Strompreisen von aktuell  $15,6 \text{ Cent kWh}^{-1}$  für industriellen Strom (European Commission, 2019). Daher wäre es unter ökonomischen Gesichtspunkten vorteilhaft, eine solche Anlage in Länder mit geringeren Energiekosten zu verlegen oder innerhalb Deutschlands erneuerbare Energiequellen wie Photovoltaik oder Windkraft einzubeziehen. Innerhalb Europas würde beispielsweise eine Verlegung der Anlage nach Island mit einem Strompreis von  $5,8 \text{ Cent kWh}^{-1}$  die Gesamtkosten zur Erzeugung und Verarbeitung der Biomasse ausgehend vom HIS von  $227,72$  auf  $156,36 \text{ € kg}$  und damit um etwa 31 % senken (European Commission, 2019). Eine weitere denkbare Möglichkeit wäre für den Standort Deutschland auch die Einbeziehung erneuerbarer Energien, wie Photovoltaik und Windkraft, deren Stromgestehungskosten von  $4,33$  bis  $5,93 \text{ Cent kWh}^{-1}$  (Photovoltaik) bzw.  $3,99 \text{ Cent kWh}^{-1}$  (Windkraft) unter dem durchschnittlichen Strompreis Deutschlands liegen. Deren Erzeugung sowie direkte Verwertung kann zudem dezentralisiert direkt am Standort der Anlage erfolgen (European Commission, 2019; Kost et al., 2018).

In den in dieser Arbeit aufgestellten Produktionsszenarien wurde, mit Ausnahme der destillativen Rückgewinnung des zur Extraktion verwendeten n-Hexans, keine Rückgewinnung von

Masseströmen berücksichtigt (siehe Kap. 5.7.2., Tab. 16). In einem optimierten Produktionsprozess könnte eine Rückgewinnung von CO<sub>2</sub>, dem verbrauchten Nährmedium und den darin enthaltenen Nährstoffen (Stickstoff- und Phosphat) zu einer weiteren Reduktion der Produktionskosten führen. Die genannten Substrate machen nach Kap. 5.7.3, Abb. 45 immerhin 8,5 % (HIS-Szenario) der Gesamtproduktionskosten aus.

Ein weiterer aber vergleichsweise geringer Kostentreiber sind die für den Betrieb der FPA-PBR notwendige Anzahl der Mitarbeiter/innen bzw. die Lohnkosten. Für die beiden im industriellen Maßstab entwickelten Szenarien wurde für den Betrieb der Anlage von einer Mitarbeiteranzahl von jeweils 32 Mitarbeiter/innen (15 für USP und 17 für DSP) ausgegangen (siehe hierzu Kap. A2.2.1, Anhang). Die Mitarbeiterzahl im USP orientiert an Erfahrungswerten aus bestehenden Anlagen in Deutschland und liegt deutlich über den Annahmen bisheriger ökonomischer Bewertungen für Anlagen gleicher Größe auf Basis geschlossener Photobioreaktoren (Thomassen et al., 2016; Hallmann, 2018). Eine Möglichkeit diesem Kostenfaktor entgegenzuwirken, wäre eine Weiterentwicklung der vorhandenen Automatisierungs- und Regelungstechnik. Zwar können bereits wesentliche Vorgänge wie die Substratzugabe automatisiert ablaufen, allerdings fehlt es z.B. an nicht-invasiven Online-Monitoringverfahren z.B. zum Erfassen der optischen Dichte oder des Produktgehaltes. Eine Weiterentwicklung der Steuerung könnte auch durch Integration von intelligenten KI-gestützten Steuerungen erfolgen, welche beispielweise die Substratversorgung (Licht, Nährstoffe) unmittelbar und automatisiert an das Wachstum der Kultur anpassen (Posten und Feng Chen, 2016).

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein Verfahren beschrieben, welches sämtliche Prozessschritte, beginnend bei der Stammselektion und der Kultivierung der Diatomeen in einem skalierbaren Photobioreaktor, bis zu den Endprodukten Fucoxanthin und EPA umfasst.

Beide Produkte sind essentielle Bestandteile der Thylakoidmembran der ausgewählten Diatomee *P. tricornutum* UTEX 640, weshalb die spezifische volumetrische Produktivität beider Stoffe während der photoautotrophen Kultivierung ganz wesentlich vom verfügbaren Licht abhängt. Durch Optimierung der relativen Lichtverfügbarkeit im eingesetzten FPA-Photobioreaktor sowie der Phosphat-, Eisen- und Stickstoffkonzentration im Nährmedium konnte eine maximale volumetrische Fucoxanthinproduktivität von  $22,4 \pm 7,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  erreicht werden. Dies ist nach Kenntnisstand des Autors der bisher höchste publizierte Wert für Fucoxanthin aus Mikroalgen in Photobioreaktoren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zudem, dass sich der biomassespezifische Fucoxanthingehalt in Abhängigkeit von der relativen Licht-verfügbarkeit im Photobioreaktor ändert. So variierte der Fucoxanthingehalt in der Biomasse in Abhängigkeit von der relativen Lichtverfügbarkeit um etwa 20 %, wohingegen der EPA-Gehalt und auch der Proteingehalt in der Biomasse unter gleichen Bedingungen nahezu konstant blieben. Dieses für Diatomeen bisher nur qualitativ und überwiegend auf molekularbiologischer Ebene beschriebene Phänomen der sog. Photoakklimatisation kann somit prozesstechnisch zur Anreicherung von Fucoxanthin in der Biomasse, z.B. durch die Etablierung mehrstufiger Kultivierungskonzepte oder eine Anpassung des Erntezeitpunktes im Freiland, genutzt werden. Ein hoher Produktgehalt wiederum wirkt sich vorteilhaft aus, da für die gleiche Menge an Produkt weniger Biomasse geerntet und aufgearbeitet werden muss. Die gewonnenen Prozessdaten zur volumetrischen Produktivität und der Veränderung der makromolekularen Zusammensetzung der Biomasse in Abhängigkeit von der relativen Lichtverfügbarkeit können in Zukunft eine Grundlage bilden, um intelligente prädiktive Steuerungen zu entwickeln, welche das Licht anhand von prognostiziertem Wachstum automatisiert und auch in kürzeren Zeitintervallen anpassen.

Zur Fest-Flüssig-Extraktion der intrazellulär vorliegenden Wertstoffe EPA und Fucoxanthin wurde im Anschluss an den obligatorischen, bereits in vorangegangenen Arbeiten für *P. tricornutum* optimierten, mechanischen Zellaufschluss die subkritische Hochdruckflüssigextraktion auf Basis unterschiedlicher Lösungsmittel untersucht (Seibert, 2013). Der Fokus der Untersuchungen lag dabei auf organischen Lösungsmitteln, welche im Hinblick auf eine Anwendung der erzeugten Fraktionen im Bereich der Humanernährung entweder ohne

oder mit legislativen Einschränkungen eingesetzt werden können. Hierbei zeigte sich, dass speziell polare Lösungsmittel wie Ethanol, Ethylacetat und Aceton bereits bei einer einstufigen Extraktion eine hohe Ausbeute von bis zu 90 % für beide Wertstoffe ermöglichen. Die notwendige Lösungsmittelmenge liegt dabei deutlich unterhalb des bisher untersuchten Mazerationsverfahrens. Als kritischer Parameter bei der Extraktion von Fucoxanthin wurden u.a. die Extraktionstemperatur und die Verweilzeit der Mikroalgenbiomasse im Lösungsmittel identifiziert. Speziell Temperaturen von über 90 °C und Verweilzeiten über 20 min führten zu einem bedeutsamen Rückgang der Extraktionsausbeute des thermo-instabilen Fucoxanthins. An dieser Stelle besteht weiterhin ein hoher Optimierungsbedarf, da die Extraktionstemperatur und Verweilzeit „Trade-off“-Kriterien zwischen einer einerseits hohen Extraktionsausbeute und einem möglichst geringen thermischen Abbau des Fucoxanthins darstellen.

Der höchste biomassespezifische Massenanteil an EPA und Fucoxanthin (sog. „Reinheit“) in einzelnen extrahierten Fraktionen wurde mit dem unpolaren Lösungsmittel n-Hexan erreicht. Entgegen der vorherrschenden Auffassung, dass sich unpolare Lösungsmittel wie Alkane eher nicht zur Fest-Flüssig-Extraktion von Fucoxanthin eignen, konnte in dieser Arbeit ein großer Teil des in der Biomasse enthaltenen Fucoxanthin unter subkritischen Bedingungen (> 70 °C) zusammen mit EPA in Lösung gebracht werden. Die temperaturabhängige Löslichkeit von Fucoxanthin in n-Hexan ermöglichte die Entwicklung eines synergetischen Verfahrens zur temperaturinduzierten Fällung von Fucoxanthin aus entsprechenden Lipidextrakten. Dieses Verfahren stellt verglichen mit bisher beschriebenen Verfahren eine einfache Möglichkeit zur Trennung von Fettsäuren und Fucoxanthin dar. Nach unmittelbarer Abkühlung der Extrakte auf Raumtemperatur konnten durch Filtration Fucoxanthinpartikel bzw. Partikelagglomerate aus der hexanolischen Suspension abgetrennt werden. Untersuchungen mittels REM und UHPLC-MS des auf diese Weise erzeugten Fucoxanthinpulvers mit einer Reinheit von bis zu 97 %<sub>w/w</sub> zeigten, dass es sich um strukturell intaktes Fucoxanthin handelt. Eine etwaige temperaturbedingte cis/trans-Isomerisierung des Moleküls während der Extraktion kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da hierfür keine Analytik zur Verfügung stand.

Durch eine Skalierung des PLE- und Fällungsverfahrens vom Milliliter- in den 1-Liter-Maßstab war es möglich, Produktmuster im Gramm-Maßstab für weiterführende Untersuchungen zur Funktionalität von Fucoxanthin und dessen ernährungsphysiologischen Eigenschaften bereit zu stellen. Diese Untersuchungen wurden gemeinsam mit dem Institut für Ernährungsmedizin der Universität Hohenheim und dem Max-Rubner-Institut, Karlsruhe, durchgeführt (Neumann und Derwenskus et al., 2019; Neumann et al., 2018a, 2018b; Gille et al., 2019). Zur Abschätzung

der anti-oxidativen Wirkung des Fucoxanthins wurden der FRAP-Assay zur Quantifizierung der reduzierenden Eigenschaften des Moleküls sowie der DPPH-Assay zur Abschätzung der Eigenschaft freie Radikale zu eliminieren, herangezogen. Das isolierte Fucoxanthin zeigte in den genannten Assays vergleichbare Eigenschaften wie das Xanthophyll Astaxanthin, ein bekanntes Antioxidans aus der Grünalge *H. pluvialis*, welches kommerziell vermarktet wird. Die Wirkung des Fucoxanthins war zudem deutlich höher als die von beta-Carotin, der Vorstufe von Provitamin A. Zusätzlich war eine dosis-abhängige, reduzierende Wirkung des Fucoxanthins auf die metabolische Aktivität von verschiedenen Krebszelllinien und auch eine Wirkung auf die Caspase 3/7-Aktivität der Zellen, was ein Indiz für eine induzierte Apoptose der Zellen darstellt (Neumann und Derwenskus et al., 2019).

Untersuchungen der mittels PLE gewonnenen Fucoxanthin- und EPA-haltigen Lipidfraktionen zeigten, dass der anti-oxidative Effekt der Extrakte jedoch nicht ausschließlich auf den spezifischen Fucoxanthingehalt zurückgeführt werden kann. Die Assays zeigten hingegen eine bessere Korrelation mit dem Gesamtphenolgehalt der Lipidfraktionen. Dies ist vermutlich auf die in den Extrakten enthaltenen stark anti-oxidativen Polyphenole und reduzierende Polysaccharide zurückzuführen. Mit den in dieser Arbeit erzeugten Lipidfraktionen wurden zudem Untersuchungen zur Zytotoxizität der Extrakte, der Bioverfügbarkeit von Fucoxanthin und dem Einfluss der Extrakte auf den Fettstoffwechsel von übergewichtigen Mäusen durchgeführt (Gille et al., 2019; Neumann et al., 2018a, 2018b). Zusammenfassend können die gewonnenen Daten grundlegende Informationen im Hinblick auf eine gesetzliche Zulassung von Extrakten aus *P. tricornutum* als Nahrungsergänzungsmittel oder als „functional food“ liefern. Solche Zulassungen für Extrakte aus *P. tricornutum* wurden bei der Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) im Jahre 2019 bereits beantragt (EFSA, 2019).

In dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse und eine umfangreiche Datenbasis zur Entwicklung eines ganzheitlichen Herstellungsverfahrens zur Produktion von EPA und Fucoxanthin mit *P. tricornutum* geschaffen. Es erfolgte zudem eine erstmalige ökonomische Bewertung verschiedener Produktionsszenarien des entwickelten Verfahrens im Pilotmaßstab und im industriellen Maßstab. Unter der Annahme einer Übertragbarkeit des Prozesses vom 30 L- in den 180 L-FPA-PBR konnten die wesentlichen Betriebs- und Investitionskosten identifiziert werden. Szenarien-übergreifend stellen der zur Kultivierung der Mikroalgen einzubringende artifizielle Lichteintrag sowie die Kühlung der Reaktoren die mit Abstand größten operativen Kostenfaktoren im Gesamtprozess dar. Dies untermauert auch die Vorteile von mehrstufigen Produktionsprozessen wie sie in Kap. 5.3.5 diskutiert werden, um beispielsweise Lichtenergie

einzusparen und zeitgleich Fucoxanthin unter starker Lichtlimitierung in der Biomasse anzureichern. Für die detaillierte Auslegung solcher zukünftigen Kultivierungsprozesse ist es notwendig, genauere Daten zu den genauen Zeitskalen der Photoadaptation in *P. tricornutum* zu erheben.

Insgesamt zeigte die ökonomische Betrachtung der photoautotrophen Kultivierung der Mikroalgen, dass aufgrund der modularen Bauweise der Module bzw. Reaktoren und der definierten Maximalgröße von 180 L pro Reaktor nur geringfügig Einsparungen über eine Anlagenvergrößerung erreicht werden können. Ansatzpunkte für Einsparungen liegen aber in einer Vergrößerung des Photobioreaktorvolumens oder einer Erhöhung der Reaktoren pro Modul. Speziell eine Vergrößerung des Reaktorvolumens dürfte sich jedoch, aufgrund des für die effiziente Lichtversorgung notwendigen hohen A/V-Verhältnisses und der Notwendigkeit einer Erhöhung der Schichtdicke der Reaktoren aufgrund der Statik bei einem Scale-up, nur sehr aufwendig realisieren lassen. Hier besteht in Zukunft massiver Entwicklungsbedarf.

Die Daten der ökonomischen Bewertung zeigen, dass die Aufarbeitung der Mikroalgenbiomasse bis zu den Endprodukten Fucoxanthin und einem EPA-reichen Algenöl mit zunehmender Anlagengröße einen relativ geringen Anteil an den Gesamtprozesskosten darstellt, obwohl die Geräte einen Großteil der Investitionskosten einer entsprechenden Anlage bilden (siehe Kap. 5.7.2 und 5.7.3). Anders als im Fall der photoautotrophen Kultivierung der Mikroalgen können im Bereich der Aufarbeitung der Biomasse durch eine Hochskalierung bzw. Vergrößerung der einzelnen Geräte massiv Kosten eingespart werden. Insgesamt führen die sehr hohen operativen Kosten (OPEX), welche größtenteils auf den hohen Energiebedarf der artifiziell beleuchteten FPA-PBR zurückzuführen sind, im industriellen Maßstab je nach Szenario zu einem Produktionspreis von etwa 227 bis 406 €kg<sup>-1</sup> für den Standort Deutschland. Dieser Preis kann z.B. durch eine Verlegung der Anlage in Länder mit geringeren Energiekosten oder durch die Integration von Verfahren zur Gewinnung von Strom aus regenerativen Quellen, wie Windkraft, drastisch reduziert werden. Die Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses hängt zudem wesentlich von dem aktuellen Marktpreis für das Endprodukt Fucoxanthin ab. Eine Sensitivitätsanalyse zeigte, dass bei postulierten Marktpreisen im Bereich von 45.000 US\$ kg<sup>-1</sup> für Fucoxanthin, der Wert der prozessierten Biomasse die ermittelten Produktionskosten übersteigt und somit eine kommerzielle Produktion für den Standort Deutschland mit dem in dieser Arbeit aufgezeigten Gesamtprozess wirtschaftlich darstellbar sein könnte.

## 7 Literaturverzeichnis

- Acién, F.G., Fernández, J.M., Magán, J.J., Molina, E., 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnol. Adv.* 30, 1344–1353. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.005>
- Allen, A.E., LaRoche, J., Maheswari, U., Lommer, M., Schauer, N., Lopez, P.J., Finazzi, G., Fernie, A.R., Bowler, C., 2008. Whole-cell response of the pennate diatom *Phaeodactylum tricorutum* to iron starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 10438. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711370105>
- Ambati, R.R., Gogisetty, D., Aswathanarayana, R.G., Ravi, S., Bikkina, P.N., Bo, L., Yuepeng, S., 2019. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, 1880–1902. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1432561>
- Andreou, A., Brodhun, F., Feussner, I., 2009. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog. Lipid Res.* 48, 148–170. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.02.002>
- Anning, T., MacIntyre, H.L., Pratt, S.M., Sammes, P.J., Gibb, S., Geider, R.J., 2000. Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1807–1817. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.8.1807>
- Apt, K.E., Behrens, P.W., 1999. Commercial Developments in Microalgal Biotechnology. *J. Phycol.* 35, 215–226. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520215.x>
- Armbrust, E.V., 2009. The life of diatoms in the world's oceans. *Nature* 459, 185–192. <https://doi.org/10.1038/nature08057>
- Armbrust, E.V., Berges, J.A., Bowler, C., Green, B.R., Martinez, D., Putnam, N.H., Zhou, S., Allen, A.E., Apt, K.E., Bechner, M., Brzezinski, M.A., Chaal, B.K., Chiovitti, A., Davis, A.K., Demarest, M.S., Detter, J.C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M.Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B.D., Jurka, J., Kapitonov, V.V., Kröger, N., Lau, W.W.Y., Lane, T.W., Larimer, F.W., Lippmeier, J.C., Lucas, S., Medina, M., Montsant, A., Obornik, M., Parker, M.S., Palenik, B., Pazour, G.J., Richardson, P.M., Ryneerson, T.A., Saito, M.A., Schwartz, D.C., Thamtrakoln, K., Valentin, K., Vardi, A., Wilkerson, F.P., Rokhsar, D.S., 2004. The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* 306, 79. <https://doi.org/10.1126/science.1101156>
- Ayalon, O., 2017. Improved process for producing fucoxanthin and/or polysaccharides from microalgae (WO2017037692A1).
- Bähr, L., Wüstenberg, A., Ehwald, R., 2016. Two-tier vessel for photoautotrophic high-density cultures. *J. Appl. Phycol.* 28, 783–793. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0614-5>
- Banerjee, S., Ramaswamy, S., 2019. Dynamic process model and economic analysis of microalgae cultivation in flat panel photobioreactors. *Algal Res.* 39, 101445. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101445>
- Barclay, W., Weaver, C., Metz, J., Hansen, J., 2010. 4 - Development of a Docosahexaenoic Acid Production Technology Using Schizochytrium: Historical Perspective and Update, in: Cohen, Z., Ratledge, C. (Eds.), *Single Cell Oils* (Second Edition). AOCS Press, pp. 75–96. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-73-8.50008-6>
- Becker, W., 2007a. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25, 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
- Becker, W., 2007b. Microalgae for Aquaculture: The Nutritional Value of Microalgae for Aquaculture, in: *Handbook of Microalgal Culture*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 380–391. <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch21>
- Beheshtipour, H., Mortazavian, A.M., Mohammadi, R., Sohrabvandi, S., Khosravi-Darani, K., 2013. Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* Algae into Probiotic Fermented

- Milks: Algae addition into probiotic fermented milks.... Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 12, 144–154. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12004>
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. Anal. Biochem. 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bergmann, P., Ripplinger, P., Beyer, L., Trösch, W., 2013. Disposable Flat Panel Airlift Photobioreactors. Chem. Ing. Tech. 85, 202–205. <https://doi.org/10.1002/cite.201200132>
- Bergmann, P., Trösch, W., 2016. Repeated fed-batch cultivation of *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 in flat-panel airlift photobioreactors with static mixers for improved light utilization: Influence of nitrate, carbon supply and photobioreactor design. Algal Res. 17, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.040>
- Bertrand, M., 2010. Carotenoid biosynthesis in diatoms. Photosynth. Res. 106, 89–102. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9589-x>
- Bitaubé Pérez, E., Caro Pina, I., Pérez Rodríguez, L., 2008. Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor. Biochem. Eng. J. 40, 520–525. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.02.007>
- Blainski, A., Lopes, G., de Mello, J., 2013. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. Molecules 18, 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Blanken, W., Cuaresma, M., Wijffels, R.H., Janssen, M., 2013. Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. Algal Res. 2, 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.004>
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature 181, 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- BMBF, 2012. Roadmap Bioraffinerien im Rahmen der Aktionspläne der Bundesregierung zur stofflichen und energetischen Nutzung nachwachsender Rohstoffe 106.
- Borowitzka, M.A., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters, in: Osinga, R., Tramper, J., Burgess, J.G., Wijffels, R.H. (Eds.), Progress in Industrial Microbiology. Elsevier, pp. 313–321. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80123-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80123-4)
- Boudière, L., Michaud, M., Petroustos, D., Rébeillé, F., Falconet, D., Bastien, O., Roy, S., Finazzi, G., Rolland, N., Jouhet, J., Block, M.A., Maréchal, E., 2014. Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. 1837, 470–480. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.09.007>
- Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otilar, R.P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., Verret, F., Berges, J.A., Brownlee, C., Cadoret, J.-P., Chiovitti, A., Choi, C.J., Coesel, S., De Martino, A., Detter, J.C., Durkin, C., Falciatore, A., Fournet, J., Haruta, M., Huysman, M.J.J., Jenkins, B.D., Jiroutova, K., Jorgensen, R.E., Joubert, Y., Kaplan, A., Kröger, N., Kroth, P.G., La Roche, J., Lindquist, E., Lommer, M., Martin-Jézéquel, V., Lopez, P.J., Lucas, S., Mangogna, M., McGinnis, K., Medlin, L.K., Montsant, A., Secq, M.-P.O., Napoli, C., Obornik, M., Parker, M.S., Petit, J.-L., Porcel, B.M., Poulsen, N., Robison, M., Rychlewski, L., Rynearson, T.A., Schmutz, J., Shapiro, H., Siaut, M., Stanley, M., Sussman, M.R., Taylor, A.R., Vardi, A., von Dassow, P., Vyverman, W., Willis, A., Wyrwicz, L.S., Rokhsar, D.S., Weissenbach, J., Armbrust, E.V., Green, B.R., Van de Peer, Y., Grigoriev, I.V., 2008. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. Nature 456, 239–244. <https://doi.org/10.1038/nature07410>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Sci. Technol. 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Brinitzer, G., 2019. pers. Kommunikation und Erfahrungswerte aus dem Besuch der Pilotanlage am Fraunhofer CBP in Leuna, 2019
- Britton, G., 1993. Structure and nomenclature of carotenoids, in: Young, A.J., Britton, George (Eds.), *Carotenoids in Photosynthesis*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–15. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-2124-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2124-8_1)
- Bundesregierung, 2019. [www.bundesregierung.de/breg-de/themen/klimaschutz/co2-bepreisung](http://www.bundesregierung.de/breg-de/themen/klimaschutz/co2-bepreisung). (12.02.2020)
- Caballero, M.A., Jallet, D., Shi, L., Rithner, C., Zhang, Y., Peers, G., 2016. Quantification of chrysolaminarin from the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.* 20, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.008>
- Caporgno, M.P., Mathys, A., 2018. Trends in Microalgae Incorporation Into Innovative Food Products With Potential Health Benefits. *Front. Nutr.* 5. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00058>
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., Hernández-Méndez, J., 2005. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *J. Chromatogr. A* 1089, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.072>
- Castro-Puyana, M., Herrero, M., Urreta, I., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibáñez, E., Suárez-Alvarez, S., 2013. Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the microalga *Neochloris oleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 4607–4616. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6687-y>
- Cerón-García, M.C., Fernández-Sevilla, J.M., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., Contreras-Gómez, A., Molina-Grima, E., 2013. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on fructose and glycerol in fed-batch and semi-continuous modes. *Bioresour. Technol.* 147, 569–576. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.092>
- Cha, K.H., Lee, H.J., Koo, S.Y., Song, D.-G., Lee, D.-U., Pan, C.-H., 2010. Optimization of Pressurized Liquid Extraction of Carotenoids and Chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.* 58, 793–797. <https://doi.org/10.1021/jf902628j>
- Chandrasekaran, R., Barra, L., Carillo, S., Caruso, T., Corsaro, M.M., Dal Piaz, F., Graziani, G., Corato, F., Pepe, D., Manfredonia, A., Orefice, I., Ruban, A.V., Brunet, C., 2014. Light modulation of biomass and macromolecular composition of the diatom *Skeletonema marinoi*. *J. Biotechnol.* 192, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.10.016>
- Chemat, F., Vian, M.A., Cravotto, G., 2012. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chen, C.-R., Lin, D.-M., Chang, C.-M.J., Chou, H.-N., Wu, J.-J., 2017. Supercritical carbon dioxide anti-solvent crystallization of fucoxanthin chromatographically purified from *Hinckesia mitchellae* P.C. Silva. *J. Supercrit. Fluids* 119, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.013>
- Chen, C.-Y., Jesisca, Hsieh, C., Lee, D.-J., Chang, C.-H., Chang, J.-S., 2016. Production, extraction and stabilization of lutein from microalga *Chlorella sorokiniana* MB-1. *Bioresour. Technol.* 200, 500–505. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.071>
- Chen, C.-Y., Nagarajan, D., Cheah, W.Y., 2018. Eicosapentaenoic acid production from *Nannochloropsis oceanica* CY2 using deep sea water in outdoor plastic-bag type photobioreactors. *Bioresour. Technol.* 253, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.102>
- Chiaromonti, D., Prussi, M., Casini, D., Tredici, M.R., Rodolfi, L., Bassi, N., Zittelli, G.C., Bondioli, P., 2013. Review of energy balance in raceway ponds for microalgae cultivation: Re-thinking a

- traditional system is possible. *Appl. Energy* 102, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.040>
- Chrimadha, T., Borowitzka, M.A., 1994. Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricorutum* grown in a tubular photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* 6, pp 67–74. <https://doi.org/10.1007/BF02185906>
- Ciferri, O., 1983. Spirulina, the Edible Microorganism. *Microbiol. Rev.* 47, 551.
- Coesel, S., Oborník, M., Varela, J., Falciatore, A., Bowler, C., 2008. Evolutionary Origins and Functions of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in Marine Diatoms. *PLoS ONE* 3, e2896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002896>
- Cooney, M., Young, G., Nagle, N., 2009. Extraction of Bio-oils from Microalgae. *Sep. Purif. Rev.* 38, 291–325. <https://doi.org/10.1080/15422110903327919>
- Custódio, L., Soares, F., Pereira, H., Barreira, L., Vizetto-Duarte, C., Rodrigues, M.J., Rauter, A.P., Alberício, F., Varela, J., 2014. Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp.: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. *J. Appl. Phycol.* 26, 151–161. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0098-0>
- Daboussi, F., Leduc, S., Maréchal, A., Dubois, G., Guyot, V., Perez-Michaut, C., Amato, A., Falciatore, A., Juillerat, A., Beurdeley, M., Voytas, D.F., Cavarec, L., Duchateau, P., 2014. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricorutum* for biotechnology. *Nat. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4831>
- Dambek, M., Eilers, U., Breitenbach, J., Steiger, S., Büchel, C., Sandmann, G., 2012. Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Exp. Bot.* 63, 5607–5612. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers211>
- Degen, J., Uebele, A., Retze, A., Schmid-Staiger, U., Trösch, W., 2001. A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. *J. Biotechnol.* 92, 89–94.
- Delbrut, A., Albina, P., Lapierre, T., Pradelles, R., Dubreucq, E., 2018. Fucoxanthin and Polyunsaturated Fatty Acids Co-Extraction by a Green Process. *Molecules* 23, 874. <https://doi.org/10.3390/molecules23040874>
- Denery, J.R., Dragull, K., Tang, C., Li, Q.X., 2004. Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Anal. Chim. Acta* 501, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.09.026>
- Derwenskus, F., Metz, F., Gille, A., Schmid-Staiger, U., Briviba, K., Schließmann, U., Hirth, T., 2019. Pressurized extraction of unsaturated fatty acids and carotenoids from wet *Chlorella vulgaris* and *Phaeodactylum tricorutum* biomass using subcritical liquids. *GCB Bioenergy* 11, 335–344. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12563>
- Dillon, J.T., Aponte, J.C., Tarozo, R., Huang, Y., 2013. Purification of omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil using silver-thiolate chromatographic material and high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1312, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.064>
- Domozych, D.S., Ciancia, M., Fangel, J.U., Mikkelsen, M.D., Ulvskov, P., Willats, W.G.T., 2012. The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Front. Plant Sci.* 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00082>
- Doucha, J., Lívanský, K., 1995. Novel outdoor thin-layer high density microalgal culture system: Productivity and operational parameters. *Algological studies*, ISBN: 0342-1120/95/0106-012
- EFSA, W.G., 2019. Produktzertifizierung Mikroalgenextrakte, Novel Food Regulation.
- Einstein, A., 1905. 5. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, *Annalen der Physik.* 17, 549-560, *Annalen der Physik.*

- Eisfeld, W., Mehling, A., 2003. Verwendung von Astaxanthin (WO2003105791A1).
- Englert, G., Bjørnland, T., Liaaen-Jensen, S., 1990. 1D and 2D NMR study of some allenic carotenoids of the fucoxanthin series. *Magn. Reson. Chem.* 28, 519–528. <https://doi.org/10.1002/mrc.1260280610>
- Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M.J., Sijtsma, L., Parisi, C., Rodriguez Cerezo, E., 2014. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. 10.2791/3339.
- European Commission, 2019. Electricity prices for non-household consumers. URL [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Electricity\\_price\\_statistics#Electricity\\_prices\\_for\\_non-household\\_consumers](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Electricity_price_statistics#Electricity_prices_for_non-household_consumers) (accessed 12.7.19).
- European Commission, 2009. Directive 2009/32/EC, 2009L0032.
- Fajardo, A.R., Cerdán, L.E., Medina, A.R., Fernández, F.G.A., Moreno, P.A.G., Grima, E.M., 2007. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 120–126. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600216>
- Falciatore, A., Bowler, C., 2002. Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 109–130. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091701.153921>
- Falkowski, P.G., Chen, Y.-B., 2003. Photoacclimation of Light Harvesting Systems in Eukaryotic Algae, in: Green, B.R., Parson, W.W. (Eds.), *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 423–447. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2087-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2087-8_15)
- Falkowski, P.G., LaRoche, J., 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 27, 8–14. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00008.x>
- FAO (Ed.), 2010. Fats and fatty acids in human nutrition: report of an expert consultation: 10-14 November 2008, Geneva, FAO food and nutrition paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- FAO/WHO, E.C., 1987. Energy and protein requirements. World Health Organization, Geneva 1985.
- Farrar, W.V., 1966. Tecuitlatl; A Glimpse of Aztec Food Technology. *Nature* 211, 341–342. <https://doi.org/10.1038/211341a0>
- Feller, R., Matos, Â.P., Mazzutti, S., Moecke, E.H.S., Tres, M.V., Derner, R.B., Oliveira, J.V., Junior, A.F., 2018. Polyunsaturated  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids, total carotenoids and antioxidant activity of three marine microalgae extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical n-butane. *J. Supercrit. Fluids* 133, 437–443. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.11.015>
- Fengzheng, G., 2019. Fucoxanthin production and monitoring at pilot scale.
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P., 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281, 237–240.
- Foo, S.C., Yusoff, F.M., Ismail, M., Basri, M., Chan, K.W., Khong, N.M.H., Yau, S.K., 2015. Production of fucoxanthin-rich fraction (FxRF) from a diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968. *Algal Res.* 12, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.004>
- Francavilla, M., Trotta, P., Luque, R., 2010. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application. *Bioresour. Technol.* 101, 4144–4150. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.139>
- Fung, A., Hamid, N., Lu, J., 2013. Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chem.* 136, 1055–1062. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.024>
- Gao, B., Chen, A., Zhang, W., Li, A., Zhang, C., 2017. Co-production of lipids, eicosapentaenoic acid, fucoxanthin, and chrysolaminarin by *Phaeodactylum tricorutum* cultured in a flat-plate photobioreactor under varying nitrogen conditions. *J. Ocean Univ. China* 16, 916–924. <https://doi.org/10.1007/s11802-017-3174-2>
- García, J.L., de Vicente, M., Galán, B., 2017. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microb. Biotechnol.* 10, 1017–1024. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12800>

- Gerardo, M.L., Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Coward, T., Skill, S.C., 2015. Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. *Algal Res.* 11, 248–262. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.019>
- Gille, A., Hollenbach, R., Trautmann, A., Posten, C., Briviba, K., 2017a. Effect of sonication on bioaccessibility and cellular uptake of carotenoids from preparations of photoautotrophic *Phaeodactylum tricorutum*. *Food Res. Int.* <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.040>
- Gille, A., Stojnic, B., Derwenskus, F., Trautmann, A., Schmid-Staiger, U., Posten, C., Briviba, K., Palou, A., Bonet, M., Ribot, J., 2019. A Lipophilic Fucoxanthin-Rich *Phaeodactylum tricorutum* Extract Ameliorates Effects of Diet-Induced Obesity in C57BL/6J Mice. *Nutrients* 11, 796. <https://doi.org/10.3390/nu11040796>
- Gille, A., Trautmann, A., Posten, C., Briviba, K., 2016. Bioaccessibility of carotenoids from *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 67, 507–513. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1181158>
- Giovagnetti, V., Ruban, A.V., 2017. Detachment of the fucoxanthin chlorophyll a / c binding protein (FCP) antenna is not involved in the acclimative regulation of photoprotection in the pennate diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1858, 218–230. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.12.005>
- Gladyshev, M.I., Sushchik, N.N., Makhutova, O.N., 2013. Production of EPA and DHA in aquatic ecosystems and their transfer to the land. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 107, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.03.002>
- Glibert, P.M., Wilkerson, F.P., Dugdale, R.C., Raven, J.A., Dupont, C.L., Leavitt, P.R., Parker, A.E., Burkholder, J.M., Kana, T.M., 2016. Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions: Pluses and minuses of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. *Limnol. Oceanogr.* 61, 165–197. <https://doi.org/10.1002/lno.10203>
- Globenewswire, 2017. Industry Analysis Report, Regional Analysis, Application Potential, Price Trend, Competitive Market Share & Forecast, 2015 – 2022” ; <https://www.globenewswire.com/news-release/2017/06/14/1018640/0/en/EPA-DHA-Omega-3-Ingredients-Market-worth-over-4-billion-by-2022-Global-Market-Insights-Inc.html>.
- Gómez-Loredo, A., Benavides, J., Rito-Palomares, M., 2016. Growth kinetics and fucoxanthin production of *Phaeodactylum tricorutum* and *Isochrysis galbana* cultures at different light and agitation conditions. *J. Appl. Phycol.* 28, 849–860. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0635-0>
- Gómez-Loredo, A., Benavides, J., Rito-Palomares, M., 2014. Partition behavior of fucoxanthin in ethanol-potassium phosphate two-phase systems: Partition behavior of fucoxanthin in ethanol-potassium phosphate two-phase systems. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 1637–1645. <https://doi.org/10.1002/jctb.4514>
- Gómez-Loredo, A., González-Valdez, J., Rito-Palomares, M., 2015. Insights on the downstream purification of fucoxanthin, a microalgal carotenoid, from an aqueous two-phase system stream exploiting ultrafiltration. *J. Appl. Phycol.* 27, 1517–1523. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0443-y>
- Gong, M., Bassi, A., 2016. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnol. Adv.* 34, 1396–1412. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>
- Goto, M., Kanda, H., Wahyudiono, Machmudah, S., 2015. Extraction of carotenoids and lipids from algae by supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical dimethyl ether. *J. Supercrit. Fluids* 96, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.10.003>
- Greene, R.M., Geider, R.J., Kolber, Z., Falkowski, P.G., 1992. Iron-Induced Changes in Light Harvesting and Photochemical Energy Conversion Processes in Eukaryotic Marine Algae. *Plant Physiol.* 100, 565–575. <https://doi.org/10.1104/pp.100.2.565>

- Grossmann, L., Hinrichs, J., Weiss, J., 2019. Cultivation and downstream processing of microalgae and cyanobacteria to generate protein-based technofunctional food ingredients. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1–29. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1672137>
- Guihéneuf, F., Mimouni, V., Ulmann, L., Tremblin, G., 2008. Environmental factors affecting growth and omega-3 fatty acid composition in *Skeletonema costatum*. The influence of irradiance and carbon source. *Diatom Res.* 23, 93–103. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2008.9705739>
- Guillard, R.R., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Grun. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Guo, B., Liu, B., Yang, B., Sun, P., Lu, X., Liu, J., Chen, F., 2016. Screening of Diatom Strains and Characterization of *Cyclotella cryptica* as A Potential Fucoxanthin Producer. *Mar. Drugs* 14, 125. <https://doi.org/10.3390/md14070125>
- Hallmann, H., 2018. Aufschwung dank Algen auf der grünen Wiese. *Neue Zür. Ztg.* <https://www.nzz.ch/international/aufschwung-dank-algen-auf-der-gruenen-wiese-ld.1393360> (16.11.2019)
- Harel, M., Clayton, D., 2004. Feed formulation for terrestrial and aquatic animals. (WO2004080196A2).
- Hausmann, H., 2019. Herstellung und Charakterisierung von Inhaltsstoffen, insbesondere von Proteinen, stärkehaltiger Mikroalgen zur Entwicklung eines Bioaffinerie-Konzeptes. Dissertation, Universität Stuttgart.
- Hempel, F., Maier, U.G., 2012. An engineered diatom acting like a plasma cell secreting human IgG antibodies with high efficiency. *Microb. Cell Factories* 11, 126. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-126>
- Heo, S.-J., Jeon, Y.-J., 2009. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *J. Photochem. Photobiol. B* 95, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.11.011>
- Heo, S.-J., Yoon, W.-J., Kim, K.-N., Oh, C., Choi, Y.-U., Yoon, K.-T., Kang, D.-H., Qian, Z.-J., Choi, I.-W., Jung, W.-K., 2012. Anti-inflammatory effect of fucoxanthin derivatives isolated from *Sargassum siliquastrum* in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage. *Food Chem. Toxicol.* 50, 3336–3342. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.025>
- Herbstová, M., Bína, D., Koník, P., Gardian, Z., Vácha, F., Litvín, R., 2015. Molecular basis of chromatic adaptation in pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1847, 534–543. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.016>
- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibanez, E., 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. A review. *Food Chem.* 98, 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058>
- Herrero, M., Sánchez-Camargo, A. del P., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2015. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *TrAC Trends Anal. Chem.* 71, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.01.018>
- Hii, S.-L., Choong, P.-Y., Woo, K.-K., Wong, C.-L., 2010. Stability studies of fucoxanthin from *Sargassum binderi*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(10): 4580-4584, 2010
- Hildebrand, M., Davis, A.K., Smith, S.R., Traller, J.C., Abbriano, R., 2012. The place of diatoms in the biofuels industry. *Biofuels* 3, 221–240. <https://doi.org/10.4155/bfs.11.157>
- Holdmann, C., 2018. Vergleichende Analyse des Wachstums von *Chlorella sorokiniana* im FPA-Reaktor bei verschiedenen Photoperioden im Labor und im Freiland. Dissertation, University of Stuttgart.

- Holdmann, C., Schmid-Staiger, U., Hornstein, H., Hirth, T., 2018. Keeping the light energy constant — Cultivation of *Chlorella sorokiniana* at different specific light availabilities and different photoperiods. *Algal Res.* 29, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.005>
- Hosokawa, M., Kudo, M., Maeda, H., Kohno, H., Tanaka, T., Miyashita, K., 2004. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR $\gamma$  ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1675, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.08.012>
- Hosokawa, M., Wanezaki, S., Miyauchi, K., Kurihara, H., Kohno, H., Kawabata, J., Odashima, S., Takahashi, K., 1999. Apoptosis-Inducing Effect of Fucoxanthin on Human Leukemia Cell Line HL-60. *Food Sci. Technol. Res.* 5, 243–246. <https://doi.org/10.3136/fstr.5.243>
- Hu, H., Gao, K., 2003. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis sp.*, with enriched carbon sources. *Biotechnol. Lett.* 25, 421–425.
- Hu, Q., 2019. Current status, emerging technologies, and future perspectives of the world microalgal industry., Conference talk, EABA AlgaEurope 2019, Paris
- Janssen, M., Bahtke, L., Marquardt, J., Krumbein, W., Rhiel, E., 2000. Changes in the photosynthetic apparatus of diatoms in response to low and high light intensities. *Int. Microbiol.* 4, 27–33.
- Jaswir, I., Noviendri, D., Salleh, H.M., Miyashita, K., 2012. Fucoxanthin Extractions of Brown Seaweeds and Analysis of Their Lipid Fraction in Methanol. *Food Sci. Technol. Res.* 18, 251–257. <https://doi.org/10.3136/fstr.18.251>
- Jeon, S.-M., Kim, H.-J., Woo, M.-N., Lee, M.-K., Shin, Y.C., Park, Y.B., Choi, M.-S., 2010. Fucoxanthin-rich seaweed extract suppresses body weight gain and improves lipid metabolism in high-fat-fed C57BL/6J mice. *Biotechnol. J.* 5, 961–969. <https://doi.org/10.1002/biot.201000215>
- Jin, W., Ren, L., Liu, B., Zhang, Q., Zhong, W., 2018. Structural Features of Sulfated Glucuronomannan Oligosaccharides and Their Antioxidant Activity. *Mar. Drugs* 16, 291. <https://doi.org/10.3390/md16090291>
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E.A., Embiruçu, M., Ghirardi, M.L., 2010. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresour. Technol.* 101, 1406–1413. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.038>
- Jouenne, V., Barbosa, M.J., 2018. EU-Horizon2020-Report D5.18: “Microalgae As a Green source for Nutritional Ingredients for Food/Feed and Ingredients for Cosmetics by cost-Effective New Technologies.”
- Kajikawa, T., Okumura, S., Iwashita, T., Kosumi, D., Hashimoto, H., Katsumura, S., 2012. Stereocontrolled Total Synthesis of Fucoxanthin and Its Polyene Chain-Modified Derivative. *Org. Lett.* 14, 808–811. <https://doi.org/10.1021/ol203344c>
- Kanazawa, K., Ozaki, Y., Hashimoto, T., Das, S.K., Matsushita, S., Hirano, M., Okada, T., Komoto, A., Mori, N., Nakatsuka, M., 2008. Commercial-scale Preparation of Biofunctional Fucoxanthin from Waste Parts of Brown Sea Algae *Laminalia japonica*. *Food Sci. Technol. Res.* 14, 573–582. <https://doi.org/10.3136/fstr.14.573>
- Kawee-ai, A., Kuntiya, A., Kim, S.M., 2013. Anticholinesterase and Antioxidant Activities of Fucoxanthin Purified from the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Nat. Prod. Commun.* 8, 1934578X1300801. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300801010>
- Kim, J.-C., 2014. Solvent Extraction of Fucoxanthin from *Phaeodactylum tricornutum*. *Sep. Sci. Technol.* 49, 410–415. <https://doi.org/10.1080/01496395.2013.839703>
- Kim, J.H., Kim, S.M., Pan, C.-H., Choi, J.-K., Lee, J.K., 2013. Evaluation of Anti-inflammatory Activities and Mechanisms of Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Appl. Biol. Chem.* 56, 61–67. <https://doi.org/10.3839/jabc.2013.011>

- Kim, K.-N., Heo, S.-J., Kang, S.-M., Ahn, G., Jeon, Y.-J., 2010a. Fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway. *Toxicol. In Vitro* 24, 1648–1654. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.05.023>
- Kim, K.-N., Heo, S.-J., Yoon, W.-J., Kang, S.-M., Ahn, G., Yi, T.-H., Jeon, Y.-J., 2010b. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- $\kappa$ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 649, 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.032>
- Kim, S.M., Jung, Y.-J., Kwon, O.-N., Cha, K.H., Um, B.-H., Chung, D., Pan, C.-H., 2012a. A Potential Commercial Source of Fucoxanthin Extracted from the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 1843–1855. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9602-2>
- Kim, S.M., Kang, S.-W., Kwon, O.-N., Chung, D., Pan, C.-H., 2012b. Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: Characterization of extraction for commercial application. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 55, 477–483. <https://doi.org/10.1007/s13765-012-2108-3>
- Kolber, Z., Falkowski, P.G., 1993. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ. *Limnol. Oceanogr.* 38, 1646–1665. <https://doi.org/10.4319/lo.1993.38.8.1646>
- Kost, D.C., Schlegl, D.T., Ise, F., 2018. Stromgestehungskosten erneuerbare Energien (März 2018). Fraunhofer ISE (Bericht)
- Kotake-Nara, E., Kushiro, M., Zhang, H., Sugawara, T., Miyashita, K., Nagao, A., 2001. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *J. Nutr.* 131, 3303–3306.
- Krause, G.H., Weis, E., 1991. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 313–349. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>
- Kröger, N., Sumper, M., 1998. Diatom Cell Wall Proteins and the Cell Biology of Silica Biomineralization. *Protist* 149, 213–219. [https://doi.org/10.1016/S1434-4610\(98\)70029-X](https://doi.org/10.1016/S1434-4610(98)70029-X)
- Krzemińska, I., Pawlik-Skowrońska, B., Trzeńska, M., Tys, J., 2014. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 735–741. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1044-x>
- Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K., 2015. Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Mar. Drugs* 13, 5847–5881. <https://doi.org/10.3390/md13095847>
- Laug, A., 2014. Neues Flachplatten-Airlift-Reaktorsystem. DE102014221428 (A1).
- Le Costaouëc, T., Unamunzaga, C., Mantecon, L., Helbert, W., 2017. New structural insights into the cell-wall polysaccharide of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.* 26, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.021>
- Lee, J.H., O’Keefe, J.H., Lavie, C.J., Harris, W.S., 2009. Omega-3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability. *Nat. Rev. Cardiol.* 6, 753–758. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.188>
- Lee, J.H., O’Keefe, J.H., Lavie, C.J., Marchioli, R., Harris, W.S., 2008. Omega-3 Fatty Acids for Cardioprotection. *Mayo Clin. Proc.* 83, 324–332. <https://doi.org/10.4065/83.3.324>
- Lembke, P., 2013. Production Techniques for Omega-3 Concentrates, in: De Meester, F., Watson, R.R., Zibadi, S. (Eds.), *Omega-6/3 Fatty Acids: Functions, Sustainability Strategies and Perspectives*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 353–364. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-215-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-215-5_19)
- Lepage, G., Roy, C.C., 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res.* 25, 1391–1396.
- Lepetit, B., Goss, R., Jakob, T., Wilhelm, C., 2012. Molecular dynamics of the diatom thylakoid membrane under different light conditions. *Photosynth. Res.* 111, 245–257. <https://doi.org/10.1007/s11120-011-9633-5>

- Lewandowski, I., 2017. Bioeconomy: shaping the transition to a sustainable, biobased economy, 1st edition. ed. Springer Berlin Heidelberg, New York, NY.
- Li, Y., Ghasemi Naghdi, F., Garg, S., Adarme-Vega, T., Thurecht, K.J., Ghafor, W., Tannock, S., Schenk, P.M., 2014. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microb. Cell Factories* 13, 14. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-14>
- Liang, Y., Beardall, J., Heraud, P., 2006. Changes in growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition with culture age in batch cultures of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *Bot. Mar.* 49. <https://doi.org/10.1515/BOT.2006.021>
- Liu, J., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2013. Screening and characterization of *Isochrysis strains* and optimization of culture conditions for docosahexaenoic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4785–4798. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4749-5>
- Lohr, M., 2000. Beziehungen zwischen den Xanthophyllzyklen und der Biosynthese von Lichtsammelxanthophyllen in Chlorophyll a/c-haltigen Algen. Dissertation, Universität Mainz, Mainz.
- Lohr, M., Wilhelm, C., 2001. Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model. *Planta* 382–391. <https://doi.org/10.1007/s004250000403>
- Lohr, M., Wilhelm, C., 1999. Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 8784–8789. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8784>
- Lu, X., Sun, H., Zhao, W., Cheng, K.-W., Chen, F., Liu, B., 2018. A Hetero-Photoautotrophic Two-Stage Cultivation Process for Production of Fucoxanthin by the Marine Diatom *Nitzschia laevis*. *Mar. Drugs* 16, 219. <https://doi.org/10.3390/md16070219>
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., Miyashita, K., 2005. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.002>
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyashita, K., 2006. Fucoxanthin and its metabolite, fucoxanthinol, suppress adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Int. J. Mol. Med.* 6.
- Mann, J.E., Myers, J., 1968. On pigments, growth, and photosynthesis of *Phaeodactylum Tricornutum*. *J. Phycol.* 4, 349–355.
- Mario Fernández, P., Juan, S., 2000. Fatty Acid Composition of Commercial Spanish Fast Food and Snack Food. *J. Food Compos. Anal.* 13, 275–281. <https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0893>
- Martino, A.D., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K., Bowler, C., 2007. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions<sup>1</sup>. *J. Phycol.* 43, 992–1009. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00384.x>
- Masse, G., Belt, S.T., Rowland, S.J., Rohmer, M., 2004. Isoprenoid biosynthesis in the diatoms *Rhizosolenia setigera* (Brightwell) and *Haslea ostrearia* (Simonsen). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 4413–4418. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400902101>
- Matos, Â.P., 2017. The Impact of Microalgae in Food Science and Technology. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 94, 1333–1350. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-3050-7>
- McClure, D.D., Luiz, A., Gerber, B., Barton, G.W., Kavanagh, J.M., 2018. An investigation into the effect of culture conditions on fucoxanthin production using the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.* 29, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.015>
- Meiser, A., Schmid-Staiger, U., Trösch, W., 2004. Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor. *J. Appl. Phycol.* 16, 215–225. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000048507.95878.b5>

- Merriman, R.W., 1913. CXC.V.—The azeotropic mixtures of ethyl acetate, ethyl alcohol, and water at pressures above and below the atmospheric pressure. Part II. J. Chem. Soc. Trans. 103, 1801–1816.
- Michels, M.H.A., van der Goot, A.J., Vermuë, M.H., Wijffels, R.H., 2016. Cultivation of shear stress sensitive and tolerant microalgal species in a tubular photobioreactor equipped with a centrifugal pump. J. Appl. Phycol. 28, 53–62. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0559-8>
- Milledge, J.J., 2011. Microalgae – commercial potential for fuel, food and feed. Food Sci. Technol. 26. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9214-7>
- Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J.A., García Sánchez, J.L., García Camacho, F., López Alonso, D., 1992. EPA from *Isochrysis galbana*. Growth conditions and productivity. Process Biochem. 27, 299–305. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(92\)85015-T](https://doi.org/10.1016/0032-9592(92)85015-T)
- Mouget, J.-L., Rosa, P., Tremblin, G., 2004. Acclimation of *Haslea ostrearia* to light of different spectral qualities – confirmation of ‘chromatic adaptation’ in diatoms. J. Photochem. Photobiol. B 75, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.04.002>
- Mouget, J.-L., Tremblin, G., Morant-Manceau, A., Morançais, M., Robert, J.-M., 1999. Long-term photoacclimation of *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta): effect of irradiance on growth rates, pigment content and photosynthesis. Eur. J. Phycol. 34, 109–115. <https://doi.org/10.1080/09670269910001736162>
- Müller, J., 2018. Masterthesis: Acclimation of *Phaeodactylum tricorutum* UTEX 640 to different light conditions - Development of a two-stage process for fucoxanthin production, University of Stuttgart
- Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V., 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. Food Chem. 129, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.045>
- Muller, P., 2001. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. PLANT Physiol. 125, 1558–1566. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1558>
- Münkel, R., 2015. Dissertaion: Entwicklung eines zweistufigen Freilandprozesses zur Produktion lipidreicher Algenbiomasse mit *Chlorella vulgaris* im Flachplatten-Airlift-Reaktor. Fraunhofer Verlag, Stuttgart.
- Münkel, R., Schmid-Staiger, U., Werner, A., Hirth, T., 2013. Optimization of outdoor cultivation in flat panel airlift reactors for lipid production by *Chlorella vulgaris*. Biotechnol. Bioeng. 110, 2882–2893.
- Mustafa, A., Turner, C., 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. Anal. Chim. Acta 703, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>
- Nelson, D.M., Tréguer Paul, Brzezinski Mark A., Leynaert Aude, Quéguiner Bernard, 1995. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. Glob. Biogeochem. Cycles 9, 359–372. <https://doi.org/10.1029/95GB01070>
- Neumann and Derwenskus, U. and F., Flaiz Flister, V., Schmid-Staiger, U., Hirth, T., Bischoff, S., 2019. Fucoxanthin, A Carotenoid Derived from *Phaeodactylum tricorutum* Exerts Antiproliferative and Antioxidant Activities In Vitro. Antioxidants 8, 183. <https://doi.org/10.3390/antiox8060183>
- Neumann, U., Derwenskus, F., Gille, A., Louis, S., Schmid-Staiger, U., Briviba, K., Bischoff, S.C., 2018a. Bioavailability and Safety of Nutrients from the Microalgae *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica* and *Phaeodactylum tricorutum* in C57BL/6 Mice. Nutrients 10, 16. <https://doi.org/doi:10.3390/nu10080965>
- Neumann, U., Louis, S., Gille, A., Derwenskus, F., Schmid-Staiger, U., Briviba, K., Bischoff, S.C., 2018b. Anti-inflammatory effects of *Phaeodactylum tricorutum* extracts on human blood

- mononuclear cells and murine macrophages. *J. Appl. Phycol.* 30, 2837–2846. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1352-7>
- Nisizawa, K., Noda, H., Kikuchi, R., Watanabe, T., 1987. The main seaweed foods in Japan. *Hydrobiologia* 151, 5–29. <https://doi.org/10.1007/BF00046102>
- Nomura, T., Kikuchi, M., Kubodera, A., Kawakami, Y., 1997. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH). *IUBMB Life* 42, 361–370. <https://doi.org/10.1080/15216549700202761>
- Norsker, N.-H., Barbosa, M.J., Vermuë, M.H., Wijffels, R.H., 2011. Microalgal production — A close look at the economics. *Biotechnol. Adv.* 29, 24–27. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.005>
- Novoveská, L., Ross, M.E., Stanley, M.S., Pradelles, R., Wasiolek, V., Sassi, J.-F., 2019. Microalgal Carotenoids: A Review of Production, Current Markets, Regulations, and Future Direction. *Mar. Drugs* 17, 640. <https://doi.org/10.3390/md17110640>
- Nymark, M., Valle, K.C., Brembu, T., Hancke, K., Winge, P., Andresen, K., Johnsen, G., Bones, A.M., 2009. An Integrated Analysis of Molecular Acclimation to High Light in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS ONE* 4, e7743. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007743>
- Oliveira, N.A. de, Cornelio-Santiago, H.P., Fukumasu, H., Oliveira, A.L. de, 2018. Green coffee extracts rich in diterpenes – Process optimization of pressurized liquid extraction using ethanol as solvent. *J. Food Eng.* 224, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.021>
- Onofrejšová, L., Vašíčková, J., Klejdus, B., Stratil, P., Mišurcová, L., Kráčmar, S., Kopecký, J., Vacek, J., 2010. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51, 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.027>
- Oosterland, P., 2019. Microalgae production cost in aquaculture. Conference talk, EABA AlgaEurope 2019, Paris
- Oscarsson, J., Hurt-Camejo, E., 2017. Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and their mechanisms of action on apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans: a review. *Lipids Health Dis.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0541-3>
- Otero, P., Saha, S.K., Gushin, J.M., Moane, S., Barron, J., Murray, P., 2017. Identification of optimum fatty acid extraction methods for two different microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Haematococcus pluvialis* for food and biodiesel applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 4659–4667. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0412-9>
- Papagiannakis, E., H.M. van Stokkum, I., Fey, H., Büchel, C., van Grondelle, R., 2005. Spectroscopic Characterization of the Excitation Energy Transfer in the Fucoxanthin–Chlorophyll Protein of Diatoms. *Photosynth. Res.* 86, 241–250. <https://doi.org/10.1007/s11120-005-1003-8>
- Pasquet, V., Chérouvrier, J.-R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J.-M., Bérard, J.-B., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J.-P., Picot, L., 2011. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochem.* 46, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.009>
- Peng, J., Yuan, J.-P., Wu, C.-F., Wang, J.-H., 2011. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. *Mar. Drugs* 9, 1806–1828. <https://doi.org/10.3390/md9101806>
- Peterman, E.J., Dukker, F.M., van Grondelle, R., van Amerongen, H., 1995. Chlorophyll a and carotenoid triplet states in light-harvesting complex II of higher plants. *Biophys. J.* 69, 2670–2678. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80138-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80138-4)
- Peters, M.S., Timmerhaus, K.D., 1991. Plant design and economics for chemical engineers, 4. ed. ed, McGraw-Hill chemical engineering series. McGraw-Hill, New York.

- Petrushkina, M., Gusev, E., Sorokin, B., Zotko, N., Mamaeva, A., Filimonova, A., Kulikovskiy, M., Maltsev, Y., Yampolsky, I., Guglya, E., Vinokurov, V., Namsaraev, Z., Kuzmin, D., 2017. Fucoxanthin production by heterokont microalgae. *Algal Res.* 24, 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.016>
- Pieber, S., Schober, S., Mittelbach, M., 2012. Pressurized fluid extraction of polyunsaturated fatty acids from the microalga *Nannochloropsis oculata*. *Biomass Bioenergy* 47, 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.10.019>
- Piovan, A., Seraglia, R., Bresin, B., Caniato, R., Filippini, R., 2013. Fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*: Photostability and Coextractive Effects. *Molecules* 18, 6298–6310. <https://doi.org/10.3390/molecules18066298>
- Poojary, M., Barba, F., Aliakbarian, B., Donsi, F., Pataro, G., Dias, D., Juliano, P., 2016. Innovative Alternative Technologies to Extract Carotenoids from Microalgae and Seaweeds. *Mar. Drugs* 14, 214. <https://doi.org/10.3390/md14110214>
- Posten, C., 2009. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng. Life Sci.* 9, 165–177. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900003>
- Posten, C., Feng Chen, S. (Eds.), 2016. *Microalgae Biotechnology, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham. ISBN: 978-3-319-23807-4
- Premvardhan, L., Robert, B., Beer, A., Büchel, C., 2010. Pigment organization in fucoxanthin chlorophyll *a/c2* proteins (FCP) based on resonance Raman spectroscopy and sequence analysis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1797, 1647–1656. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.05.002>
- Pulz, O., 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 287–293. <https://doi.org/10.1007/s002530100702>
- Qiao, H., Cong, C., Sun, C., Li, B., Wang, J., Zhang, L., 2016. Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricorutum*. *Aquaculture* 452, 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.011>
- QY Research, 2015. Report: Global Fucoxanthin Market 2015 Industry Trend and Forecast 2020.
- Ragni, M., d'Alcalà, M.R., 2007. Circadian variability in the photobiology of *Phaeodactylum tricorutum*: pigment content. *J. Plankton Res.* 29, 141–156. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbm002>
- Rajauria, G., Foley, B., Abu-Ghannam, N., 2016. Characterization of dietary fucoxanthin from *Himantalia elongata* brown seaweed. *Food Res. Int.* <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.023>
- Rambjør, G.S., Wølen, A.I., Windsor, S.L., Harris, W.S., 1996. Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oil in humans. *Lipids* 31, S45–S49. <https://doi.org/10.1007/BF02637050>
- Ratlidge, C., Kanagachandran, K., Anderson, A.J., Grantham, D.J., Stephenson, J.C., 2001. Production of docosahexaenoic acid by *Cryptocodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source. *Lipids* 36, 1241–1246. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0838-x>
- Reboloso-Fuentes, M.M., Navarro-Pérez, A., Ramos-Miras, J.J., Guil-Guerrero, J.L., 2001. Biomass Nutrient Profiles of the Microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Food Biochem.* 25, 57–76. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2001.tb00724.x>
- Remmers, I.M., Martens, D.E., Wijffels, R.H., Lamers, P.P., 2017. Dynamics of triacylglycerol and EPA production in *Phaeodactylum tricorutum* under nitrogen starvation at different light intensities. *PLOS ONE* 12, e0175630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175630>

- Reportstack, Qyr., 2016. Global Fucoxanthin Sales 2016 Market Research Report [WWW Document]. URL <https://www.whatech.com/market-research/materials-chemicals/archive/123291-explore-global-fucoxanthin-sales-for-2016-that-was-about-500-tons-in-2015-and-is-expected-to-grow-at-a-cagr-of-5-3-from-2016-to-2021> (accessed 3.19.19).
- Reyes, F.A., Mendiola, J.A., Ibañez, E., del Valle, J.M., 2014. Astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* using CO<sub>2</sub>-expanded ethanol. *J. Supercrit. Fluids* 92, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.05.013>
- Reza, R., 2019. Heterotrophic cultivation of microalgae at industrial scale - market study, opportunities, challenges and new trends. Conference talk, EABA AlgaEurope 2019, Paris
- Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C., 1996. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Anal. Chem.* 68, 1033–1039. <https://doi.org/10.1021/ac9508199>
- Rico, M., López, A., Santana-Casiano, J.M., González, A.G., González-Dávila, M., 2013. Variability of the phenolic profile in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* growing under copper and iron stress. *Limnol. Oceanogr.* 58, 144–152. <https://doi.org/10.4319/lo.2013.58.1.0144>
- Rodolfi, L., Biondi, N., Guccione, A., Bassi, N., D’Ottavio, M., Arganaraz, G., Tredici, M.R., 2017. Oil and eicosapentaenoic acid production by the diatom *Phaeodactylum tricornutum* cultivated outdoors in Green Wall Panel (GWP®) reactors: Oil and EPA by *P. tricornutum* Outdoors. *Biotechnol. Bioeng.* 114, 2204–2210. <https://doi.org/10.1002/bit.26353>
- Rodríguez, F., Chauton, M., Johnsen, G., Andresen, K., Olsen, L.M., Zapata, M., 2006. Photoacclimation in phytoplankton: implications for biomass estimates, pigment functionality and chemotaxonomy. *Mar. Biol.* 148, 963–971. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0138-7>
- Rösch, C., Roßmann, M., Weickert, S., 2018. Microalgae for integrated food and fuel production. *GCB Bioenergy*. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12579>
- Rosen, B.H., Lowe, R.L., 1984. Physiological und ultra-structural responses of *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyta) to light intensity and nutrient starvation. *J. Phycol.* 20, 173–183. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1984.00173.x>
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Goiris, K., Muylaert, K., Foubert, I., 2014a. Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food Chem.* 160, 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.087>
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Muylaert, K., Foubert, I., 2014b. Influence of extraction solvent system on extractability of lipid components from different microalgae species. *Algal Res.* 3, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.001>
- Ryckebosch, E., Muylaert, K., Foubert, I., 2012. Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 89, 189–198. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1903-z>
- Sachindra, N.M., Sato, E., Maeda, H., Hosokawa, M., Niwano, Y., Kohno, M., Miyashita, K., 2007. Radical Scavenging and Singlet Oxygen Quenching Activity of Marine Carotenoid Fucoxanthin and Its Metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8516–8522. <https://doi.org/10.1021/jf071848a>
- Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C., Pontalier, P.-Y., 2013. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *J. Appl. Phycol.* 25, 523–529. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9886-1>
- Safi, C., Charton, M., Ursu, A.V., Laroche, C., Zebib, B., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C., 2014a. Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treatments. *Algal Res.* 3, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.017>

- Safi, C., Ursu, A.V., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C., 2014b. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Res.* 3, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.12.004>
- Sahin, M.S., Khazi, M.I., Demirel, Z., Dalay, M.C., 2019. Variation in growth, fucoxanthin, fatty acids profile and lipid content of marine diatoms *Nitzschia sp.* and *Nanofrustulum shiloi* in response to nitrogen and iron. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 17, 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.12.023>
- Saini, R.K., Keum, Y.-S., 2018. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chem.* 240, 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
- Sangeetha, R.K., Bhaskar, N., Baskaran, V., 2009. Comparative effects of  $\beta$ -carotene and fucoxanthin on retinol deficiency induced oxidative stress in rats. *Mol. Cell. Biochem.* 331, 59. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0145-y>
- Santos-Ballardo, D.U., Rendón-Unceta, M.D.C., Rossi, S., Vázquez-Gómez, R., Hernández-Verdugo, S., Valdez-Ortiz, A., 2016. Effects of outdoor cultures on the growth and lipid production of *Phaeodactylum tricorutum* using closed photobioreactors. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2089-1>
- Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., Fernandez, E., 2015. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front. Plant Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00899>
- Schäfer, B., 2018. Masterarbeit: Charakterisierung der subkritischen Hochdruckflüssigextraktion zur Wertstoffgewinnung aus der Kieselalge *Phaeodactylum tricorutum.*, Universität Stuttgart
- Schmid-Staiger, U., Preisner, R., Trösch, W., Marek, P., 2009. Kultivierung von Mikroalgen im Photobioreaktor zur stofflichen und energetischen Nutzung. *Chem. Ing. Tech.* 81, 1783–1789. <https://doi.org/10.1002/cite.200900079>
- Schwenzfeier, A., Wierenga, P.A., Gruppen, H., 2011. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis sp.* *Bioresour. Technol.* 102, 9121–9127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.046>
- Seel, M., Huwer, J., Luxenburger-Becker, H., Hempelmann, R., Eilks, I., Garner, N., Siol, A., 2017. Omega-3-Fettsäuren in Schülerlabor und Unterricht. *Chemkon* 24, 391–396. <https://doi.org/10.1002/ckon.201710309>
- Seibert, A., 2013. Entwicklung eines Verfahrens zur Gewinnung von EPA-Ethylestern aus *Phaeodactylum tricorutum* mit überkritischen Fluiden, Berichte aus Forschung und Entwicklung IGB. Fraunhofer Verlag, Stuttgart.
- Shang, Y.F., Kim, S.M., Lee, W.J., Um, B.-H., 2011. Pressurized liquid method for fucoxanthin extraction from *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell. *J. Biosci. Bioeng.* 111, 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.10.008>
- Shimidzu, N., Goto, M., Miki, W., 1996. Carotenoids as Singlet Oxygen Quenchers in Marine Organisms. *Fish. Sci.* 62, 134–137. <https://doi.org/10.2331/fishsci.62.134>
- Sierra, L.S., Dixon, C.K., Wilken, L.R., 2017. Enzymatic cell disruption of the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for lipid and protein extraction. *Algal Res.* 25, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.004>
- Silva Benavides, A.M., Torzillo, G., Kopecký, J., Masojádek, J., 2013. Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass Bioenergy* 54, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.03.016>
- Simopoulos, A.P., 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 560s-569s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.3.560s>

- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sørensen, M., Berge, G.M., Reitan, K.I., Ruyter, B., 2016. Microalga *Phaeodactylum tricorutum* in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*) —Effect on nutrient digestibility, growth and utilization of feed. *Aquaculture* 460, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.010>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Steinrücken, P., Prestegard, S.K., de Vree, J.H., Storesund, J.E., Pree, B., Mjøs, S.A., Erga, S.R., 2018. Comparing EPA production and fatty acid profiles of three *Phaeodactylum tricorutum* strains under western Norwegian climate conditions. *Algal Res.* 30, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.12.001>
- Strug, I., Utzat, C., Cappione, A., Gutierrez, S., Amara, R., Lento, J., Capito, F., Skudas, R., Chernokalskaya, E., Nadler, T., 2014. Development of a Univariate Membrane-Based Mid-Infrared Method for Protein Quantitation and Total Lipid Content Analysis of Biological Samples. *J. Anal. Methods Chem.* 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/657079>
- Sun, P., Wong, C.-C., Li, Y., He, Y., Mao, X., Wu, T., Ren, Y., Chen, F., 2019. A novel strategy for isolation and purification of fucoxanthinol and fucoxanthin from the diatom *Nitzschia laevis*. *Food Chem.* 277, 566–572. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.133>
- Sun, Z., Wang, X., Liu, J., 2019. Screening of Isochrysis strains for simultaneous production of docosahexaenoic acid and fucoxanthin. *Algal Res.* 41, 101545. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101545>
- Tabernero, A., Martin del Valle, E., Galán, M., 2012. Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: Scale-up and economics. *Biochem. Eng. J.* 63, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.11.006>
- Takao, M., 2002. Aquatic animal carotenoids. *Fish. Sci.* 67, 771–783. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00323.x>
- Tassoni, D., Kaur, G., Weisinger, R.S., 2008. The role of eicosanoids in the brain. *Asia Pac J Clin Nutr* 1, 220–228.
- Taucher, J., Baer, S., 2016. Cell Disruption and Pressurized Liquid Extraction of Carotenoids from Microalgae. *J. Thermodyn. Catal.* 07. <https://doi.org/10.4172/2157-7544.1000158>
- Tesson, B., Gaillard, C., Martin-Jézéquel, V., 2009. Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. *Bot. Mar.* 52. <https://doi.org/10.1515/BOT.2009.012>
- Thomassen, G., Egiguren Vila, U., Van Dael, M., Lemmens, B., Van Passel, S., 2016. A techno-economic assessment of an algal-based biorefinery. *Clean Technol. Environ. Policy* 18, 1849–1862. <https://doi.org/10.1007/s10098-016-1159-2>
- Trautmann, A.M., 2018. *Prozessstrategien zur Beeinflussung der makromolekularen Zellzusammensetzung photoautotropher Mikroorganismen bei Kultivierungen im Labor- und Pilotmaßstab*. Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe. <https://doi.org/10.5445/IR/1000084996>
- Trösch, W., Schmid-Staiger, U., Zastrow, A., Retze, A., Brucker, F., 2000. Photobioreactor with improved supply of light by surface enlargement, wavelength shifter bars or light transport. US6509188B1.
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M.K., Forde, G.M., Hoadley, A., 2010. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *J. Renew. Sustain. Energy* 2, 012701. <https://doi.org/10.1063/1.3294480>
- United Nations, D. of E. and S.A., 2017. World population projected to reach 9.8 billion in 2050, and 11.2 billion in 2100 [WWW Document]. URL

- <https://www.un.org/development/desa/en/news/population/world-population-prospects-2017.html> (accessed 3.18.19).
- United Nations, S.G.A.S.C., 2009. Food Production Must Double by 2050 to Meet Demand from World's Growing Population, Innovative Strategies Needed to Combat Hunger, Experts Tell Second Committee. URL <https://www.un.org/press/en/2009/gaef3242.doc.htm> (accessed 3.18.19).
- Vadiei, A., Martin, V., 2013. Energy analysis and thermoeconomic assessment of the closed greenhouse – The largest commercial solar building. Spec. Issue Adv. Sustain. Biofuel Prod. Use - XIX Int. Symp. Alcohol Fuels - ISAF 102, 1256–1266. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.06.051>
- van der Spiegel, M., Noordam, M.Y., van der Fels-Klerx, H.J., 2013. Safety of Novel Protein Sources (Insects, Microalgae, Seaweed, Duckweed, and Rapeseed) and Legislative Aspects for Their Application in Food and Feed Production: Safety aspects of novel protein sources. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 12, 662–678. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12032>
- Vazhappilly, R., Chen, F., 1998. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. J. Am. Oil Chem. Soc. 75, 393–397. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0057-0>
- Veith, T., Brauns, J., Weisheit, W., Mittag, M., Büchel, C., 2009. Identification of a specific fucoxanthin-chlorophyll protein in the light harvesting complex of photosystem I in the diatom *Cyclotella meneghiniana*. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. 1787, 905–912. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.04.006>
- Vigani, M., Parisi, C., Rodríguez-Cerezo, E., Barbosa, M.J., Sijtsma, L., Ploeg, M., Enzing, C., 2015. Food and feed products from microalgae: Market opportunities and challenges for the EU. Trends Food Sci. Technol. 42, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.004>
- Wageningen UR, 2015. “Cost-effective algae production within reach” <http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Facilities/AlgaePARC/News/Show/Costeffective-algae-production-within-reach.htm>. (accessed: 15.05.2018)
- Wang, C., Lan, C.Q., 2018. Effects of shear stress on microalgae – A review. Biotechnol. Adv. 36, 986–1002. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.001>
- Wang, H., Zhang, Y., Chen, L., Cheng, W., Liu, T., 2018. Combined production of fucoxanthin and EPA from two diatom strains *Phaeodactylum tricorutum* and *Cylindrotheca fusiformis* cultures. Bioprocess Biosyst. Eng. 41, 1061–1071. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1935-y>
- Wang, J.-K., Seibert, M., 2017. Prospects for commercial production of diatoms. Biotechnol. Biofuels 10. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0699-y>
- Wang, Q., Ye, H., Sen, B., Xie, Y., He, Y., Park, S., Wang, G., 2018. Improved production of docosahexaenoic acid in batch fermentation by newly-isolated strains of *Schizochytrium sp.* and *Thraustochytriidae sp.* through bioprocess optimization. Synth. Syst. Biotechnol. 3, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.04.001>
- Wang, S., Verma, S.K., Hakeem Said, I., Thomsen, L., Ullrich, M.S., Kuhnert, N., 2018. Changes in the fucoxanthin production and protein profiles in *Cylindrotheca closterium* in response to blue light-emitting diode light. Microb. Cell Factories 17. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0957-0>
- Wang, W., Yu, L.-J., Xu, C., Tomizaki, T., Zhao, S., Umena, Y., Chen, X., Qin, X., Xin, Y., Suga, M., Han, G., Kuang, T., Shen, J.-R., 2019. Structural basis for blue-green light harvesting and energy dissipation in diatoms. Science 363, eaav0365. <https://doi.org/10.1126/science.aav0365>
- Weickert, S., 2019. Pers. Kommunikation und gemeinsame Arbeit im Projekt FuTuRes (Förderkennzeichen: 22017218, FNR) gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL).

- White, F., 2011. PNNL Studies Algae Petroleum Replacement (<http://www.algaeindustrymagazine.com/pnnl-studies-algae-petroleum-replacement/>) (accessed: 15.05.2018).
- Wilhelm, C., 1990. The biochemistry and physiology of light-harvesting processes in chlorophyll b- and chlorophyll c-containing algae. *Plant Physiology and Biochemistry* 28(2):293-306
- Wilhelm, C., Jungandreas, A., Jakob, T., Goss, R., 2014. Light acclimation in diatoms: From phenomenology to mechanisms. *Mar. Genomics* 16, 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2013.12.003>
- Willstätter, R., Page, H.J., 1914. Untersuchungen über Chlorophyll. XXIV. Über die Pigmente der Braunalgen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 404, 237–271. <https://doi.org/10.1002/jlac.19144040302>
- Winwood, R.J., 2013. Recent developments in the commercial production of DHA and EPA rich oils from micro-algae. *OCL* 20, D604. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013030>
- Woo, M.-N., Jeon, S.-M., Kim, H.-J., Lee, M.-K., Shin, S.-K., Shin, Y.C., Park, Y.-B., Choi, M.-S., 2010. Fucoxanthin supplementation improves plasma and hepatic lipid metabolism and blood glucose concentration in high-fat fed C57BL/6N mice. *Chem. Biol. Interact.* 186, 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.05.006>
- Woo, M.-N., Jeon, S.-M., Shin, Y.C., Lee, M.-K., Kang, M.A., Choi, M.-S., 2009. Anti-obese property of fucoxanthin is partly mediated by altering lipid-regulating enzymes and uncoupling proteins of visceral adipose tissue in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 1603–1611. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900079>
- Wu, H., Li, T., Wang, G., Dai, S., He, H., Xiang, W., 2016. A comparative analysis of fatty acid composition and fucoxanthin content in six *Phaeodactylum tricornutum* strains from different origins. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 34, 391–398. <https://doi.org/10.1007/s00343-015-4325-1>
- Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q., Zhang, C., 2013. Production, Characterization, and Antioxidant Activity of Fucoxanthin from the Marine Diatom *Odontella aurita*. *Mar. Drugs* 11, 2667–2681. <https://doi.org/10.3390/md11072667>
- Yan, X., Chuda, Y., Suzuki, M., Nagata, T., 1999. Fucoxanthin as the Major Antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a Common Edible Seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 605–607. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.605>
- Yang, Y.-H., Du, L., Hosokawa, M., Miyashita, K., Kokubun, Y., Arai, H., Taroda, H., 2017. Fatty Acid and Lipid Class Composition of the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Oleo Sci.* 66, 363–368. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16205>
- Yen, H.-W., Yang, S.-C., Chen, C.-H., Jesisca, Chang, J.-S., 2015. Supercritical fluid extraction of valuable compounds from microalgal biomass. *Bioresour. Technol.* 184, 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.030>
- Young, A., Britton, G., 1993. Carotenoids in Photosynthesis. ISBN: 9789401121248, Springer Verlag.
- Zarekarizi, A., Hoffmann, L., Burritt, D., 2019. Approaches for the sustainable production of fucoxanthin, a xanthophyll with potential health benefits. *J. Appl. Phycol.* 31, 281–299. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1558-3>
- Zhang, W., Wang, F., Gao, B., Huang, L., Zhang, C., 2018. An integrated biorefinery process: Stepwise extraction of fucoxanthin, eicosapentaenoic acid and chrysolaminarin from the same *Phaeodactylum tricornutum* biomass. *Algal Res.* 32, 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.002>
- Zhang, Y., Wu, H., Wen, H., Fang, H., Hong, Z., Yi, R., Liu, R., 2015. Simultaneous Determination of Fucoxanthin and Its Deacetylated Metabolite Fucoxanthinol in Rat Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Mar. Drugs* 13, 6521–6536. <https://doi.org/10.3390/md13106521>

- Zhao, D., Kim, S.-M., Pan, C.-H., Chung, D., 2014. Effects of heating, aerial exposure and illumination on stability of fucoxanthin in canola oil. *Food Chem.* 145, 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.045>
- Zhao, P., Gu, W., Huang, A., Wu, S., Liu, C., Huan, L., Gao, S., Xie, X., Wang, G., 2017. Effect of iron on the growth of *Phaeodactylum tricornutum* via photosynthesis. *J. Phycol.* <https://doi.org/10.1111/jpy.12607>
- Zittelli, G.C., Lavista, F., Bastianini, A., Rodolfi, L., Vincenzini, M., Tredici, M.R., 1999. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis sp.* cultures in outdoor tubular photobioreactors. *J. Biotechnol.* 70, 299–312.

## 8 Anhang

### A1 Materialien und Methoden

#### A1.1 Geräteliste

Tabelle 20: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Model	Hersteller
Analysenwaage	Entris 224L-18	Sartorius, Göttingen, DE
Autoklav	Fedegari FVS 3	Ibs Tecnomara, Fernwald, DE
Lösungsmittel-extraktor	ASE 350	Thermo-Scientific, USA
Feuchtemessgerät	MA 35 M-000230V1	Sartorius, DE
Drucksensor	DMU 03	Afriso-Euro-Index, Güglingen, DE
Fließinjektionsanalysator	QuickChem 8500	Lachat Instruments, Milwaukee, USA
Fourier-Transform-Infrarot - Spektroskop	Direct Detect	Merck-Millipore, USA
Gaschromatograph	7890A	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Gefriertrockner	VaCo 5	Zirbus Technology, Bad Grund, DE
Heizblock	TR-L 288	Gebr. Liebisch, Bielefeld, DE
Hochdruckflüssigkeits- chromatograph	1200	Agilent Technologies, USA
Hochdruckflüssigkeits- chromatograph	1290	Agilent Technologies, USA
Homogenisator	Precellys 24	Bertin Technologies, Rockville, MD, USA
Inkubator	INCU-Line	VWR International, DE
Leuchtdioden-Panel	NSSL157-H3	Nichia, Anan, JP
Lichtmessgerät	-	Ott Hydromet, Kempten, DE
Magnetrührer	IKA RCT standard	Lab Logistics Group, Meckenheim, DE
Massenspektrometer	LTQ XL	Thermo Scientific, USA
Messwandler	-	Endress & Hauser, Reinach, CH
Mikrotiterplatten-Reader	Infinity 200	Tecan, CH
Mikrozentrifuge	Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
pH-Elektrode mit Temperatursensor	-	Endress & Hauser, Reinach, CH
pH-Meter	-	Xylem Analytics Germany Sales, Weilheim, DE
Partikelgrößenmessgerät	Mastersizer 2000	Malvern Instruments, UK
Photobioreaktor	HD10	Cell-DEG, DE
Photobioreaktor	FPA-PBR 6L	Subitec, Stuttgart, DE

## ANHANG

Gerät	Model	Hersteller
Photobioreaktor	FPA-PBR 30L	Subitec, Stuttgart, DE
Photobioreaktor	FPA-PBR 180L	Subitec, Stuttgart, DE
Rasterelektronenmikroskop	Leo Gemini 1530 VP	Zeiss, DE
Reinstwasseranlage	Aquintus	MembraPure, Henningsdorf, Berlin
Rotationsschüttler	Innova 4430	New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA
Rührwerkskugelmühle	PML-2	Bühler, CH
Speicherprogrammierbare Steuerung	Simatic S7-1200	Siemens, Berlin/München, DE
Spektrophotometer	150-20	Hitachi, Tokio, JP
Thermoschüttler	MHR 11	DITABIS, Pforzheim, DE
Auswertegerät (für Nährstoffe)	Quantofix Relax	Macherey Nagel, Düren, DE
Trockenschrank	UF 750 plus	Memmert, Schwabach, DE
Vakuumpumpe	MZ 2C	VACUUBRAND, Wertheim, DE
Vortex-Mischer	7-2020	NeoLab Migge, Heidelberg, DE
Waage	FCB 6k0.02B	Kern und Sohn GmbH, Balingen, DE
Zentrifuge	Pico 17	Heraeus, Hanau, DE
Zentrifuge	Haraeus Multifuge 1 S-R	Thermo Fisher Scientific, USA

### A1.2 Verwendete Chemikalien

Tabelle 21: Liste der verwendeten Chemikalien.

Name	Summenformel	Hersteller
Aceton (z. A.)	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	Th. Geyer, DE
Acetylchlorid (z. A.)	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> ClO	Merck, Darmstadt, DE
Ammoniumhydrogencarbonat	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	VWR International, Ohio, USA
Ascorbinsäure	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich, DE
α-Tocopherol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, DE
Biotin (reinst)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	AppliChem, Darmstadt, DE
Borsäure (z. A.)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Merck-Millipore, DE
Butylhydroxytoluol (reinst)	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	Carl Roth, Karlsruhe, DE
β-Carotin	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	Sigma-Aldrich, DE
Calciumchlorid-Dihydrat (reinst)	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	VWR International, DE
Cobalt(III)-chlorid-Hexahydrat (z. A.)	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	Merck-Millipore, DE
Cobalt(II)-nitrat-Hexahydrat (z. A.)	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Merck-Millipore, DE

ANHANG

Name	Summenformel	Hersteller
Diatomeenerde	SiO <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, DE
Dimethylsulfoxid	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	Merck-Schuchardt, DE
Di-Kaliumhydrogenphosphat (reinst)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	neoLab Migge, Heidelberg, DE
DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	Thermo Fisher, USA
Eisen(III)-citrat-Hydrat (reinst)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> · H <sub>2</sub> O	Applichem, Darmstadt, DE
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	Merck-Millipore, DE
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	Cl <sub>3</sub> Fe*6H <sub>2</sub> O	Merck-Millipore, DE
Eisessig	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	VWR International, DE
Ethanol (z. A.)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Merck-Millipore, DE
Ethylacetat (z. A.)	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	VWR International, DE
Folin-Ciocalteu-Reagenz	H <sub>3</sub> [PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> ] + H <sub>3</sub> PW <sub>12</sub> O <sub>40</sub>	Merck-Millipore, DE
Fucoxanthin	C <sub>42</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich, USA
Gallussäure 3,4,5-Trihydroxybenzoesäure	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Merck-Millipore, DE
Kalium-Dihydrogenphosphat (reinst)	H <sub>2</sub> KO <sub>4</sub> P	neoLab Migge, DE
Kaliumhydroxid (z. A.)	KOH	Merck-Millipore, DE
Kaliumnitrat (rein)	KNO <sub>3</sub>	AppliChem, DE
Küchensalz HALAGORA (reinst)	NaCl	Esco Hannover, DE
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat (reinst)	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	Merck-Millipore, DE
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (reinst)	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	Häberle Labortechnik, Lonsee Ettlenschieß, DE
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (reinst)	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	Carl Roth, DE
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat (reinst)	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	Merck-Millipore, DE
Methanol (z. A.)	CH <sub>3</sub> OH	Carl Roth, DE
Methylpentadecanoat (z. A.)	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Merck-Millipore, DE
Methyltridecanoat (z. A.)	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	Merck-Millipore, DE
Natriumacetat	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	Merck-Millipore, DE
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth, DE
Natriumhydroxid (z. A.)	NaOH	Merck-Millipore, DE
Natriummolybdat-Dihydrat (z. A.)	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Merck-Millipore, DE
n-Hexan (z. A.)	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	Carl Roth, DE
Thiamine-HCl (rein)	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS · HCl	AppliChem, DE
Toluol (z. A.)	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	Carl Roth, DE
TPTZ 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich, USA

Name	Summenformel	Hersteller
Trolox 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, USA
Methyl-Tridecanoat (z. A.)	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> COOCH <sub>3</sub>	Merck-Millipore, DE
Methylpentadecanoat	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, USA
Vitamin B12 (rein)	C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> O <sub>14</sub> P	Merck-Millipore, DE
Wasserstoffperoxid (technisch)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Th. Geyer, DE
Zinksulfat-Heptahydrat (rein)	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	Merck-Millipore, DE

### A1.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 22: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Spezifikation	Hersteller
Bördelkappe	11 mm, Aluminium mit Naturkautschuk-Septum	Altmann Analytik, München, DE
Chromatographiesäule	Suplex pKb 100 (5 mm, 250 x 4,6mm)	Supelco, USA
Chromatographiesäule	Zorbax C18 (2,1 mm x 50mm)	Agilent, USA
Chromatographiesäule	SBP-PUFA	Supelco, USA
Filterpapier	MN 85/70, Glasfaser, d: 0,55 mm	Macherey-Nagel, Düren, DE
Filter (PTFE)	N1690-64	BOLA, DE
Glasgefäß	1,5 mL, Braunglas 1,5 mL, Klarglas	Altmann Analytik, München, DE
Halb-Mikro-Küvette	10 x 4 x 45 mL, Polystyrol	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kanüle	0,8 x 50 mm, Rostfreier Stahl	Henke-Sass Wolf, Tuttlingen, DE
Semiquantitative Teststäbchen	Quantofix Ammonium 91315 Quantofix Phosphat 91320	Macherey-Nagel, Düren, DE
Reaktionsgefäße	1,5 mL, Polypropylen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reaktionsgläser	Pyrex 612-20, 20 x 200 mm	Thermo Fischer Scientific
Spritzen	20 mL, PP	Henke-Sass Wolf
Spritzenvorsatzfilter	Minisart NML, Celluloseacetat, d: 0,2 µm Puradisc FP 30, Celluloseacetat, d: 0,2µm	Sartorius, Göttingen, DE VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Sterilfilter	Midisart 2000 PTFE, d <sub>p</sub> : 0,2 µm, Satobran P Midi Caps, d <sub>p</sub> : 0,2 µm	Sartorius, Göttingen, DE
Pipettenspitzen	200-5000 µL, Polypropylen	Th. Geyer, Renningen, DE

Material	Spezifikation	Hersteller
Probenröhrchen	2 mL, Polypropylen	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, DE
Glaskugeln	Zirkonia/Glas, d: 0,5 mm	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Zentrifugenröhrchen	15 ml und 50 ml Polypropylen	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA

### A1.4 Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien und Nährstofflösungen

Tabelle 23: Zusammensetzung des Mann & Myers (M&M-)Kulturmediums (Mann and Myers, 1968).

Lösung	Komponente	Konzentration
<b>Lösung 1 (Salzlösung)</b>	NaCl	10 g L <sup>-1</sup>
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,4 g L <sup>-1</sup>
	KNO <sub>3</sub>	2,4 g L <sup>-1</sup>
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,8 g L <sup>-1</sup>
<b>Lösung 2</b>	Phosphatlösung	2,25 mL L <sup>-1</sup>
<b>Lösung 3</b>	Spurenelementlösung	20 mL L <sup>-1</sup>
<b>Lösung 4</b>	Vitamin- und Spurenelemente-Lösung	1 mL L <sup>-1</sup>

Tabelle 24: Zusammensetzung der Vitamin- und Spurenelemente-Lösung für das M&M-Kulturmedium (Mann and Myers, 1968).

Lösung	Komponente	Konzentration
<b>Spurenelementlösung</b>	Eisencitrat-Lösung	250 mL L <sup>-1</sup>
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	600 mg L <sup>-1</sup>
	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	220 mg L <sup>-1</sup>
	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	33 mg L <sup>-1</sup>
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,7 mg L <sup>-1</sup>
	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,2 mg L <sup>-1</sup>
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	25 mg L <sup>-1</sup>
	Biotin	400 mg L <sup>-1</sup>
<b>Vitaminlösung</b>	Thiamine HCl	2000 mg L <sup>-1</sup>
	Vitamin B <sub>12</sub>	100 mg L <sup>-1</sup>

Tabelle 25: Zusammensetzung der verwendeten Nährstofflösungen.

Stammlösung	Komponente(n)	Konzentration
<b>Ammoniumlösung</b>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	153,4 g L <sup>-1</sup>
<b>Eisenlösung</b>	Fe(III)-Citrat	4,7 g L <sup>-1</sup>
<b>Phosphatlösung</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	45,35 g L <sup>-1</sup>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	35,8 g L <sup>-1</sup>

## A1.5 Zusammensetzung der Reagenzien für die lebensmitteltechnologischen Assays

Tabelle 26: Zusammensetzung der DPPH-Stocklösung und der Arbeitslösung.

Komponente	Menge
DPPH	9,85 mg
Methanol	ad 10 ml

Komponente	Menge
DPPH-Stocklösung	1325 $\mu\text{L}$
Methanol	ad 20 ml

Tabelle 27: Zusammensetzung des Acetatpuffer (300 mM, pH 3,6) und der FRAP-Lösung für den FRAP-Assay.

Komponente	Menge
Natriumacetat-trihydrat	3,1 g
Eisessig	16 mL
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

Komponente	Menge
TPTZ	1325 $\mu\text{L}$
HCl (40 mM)	ad 50 ml

## A2 Ergebnisse und Diskussion

### A2.1 Aufschlusskinetik der für das DSP verwendeten *P. tricornutum*-Biomasse

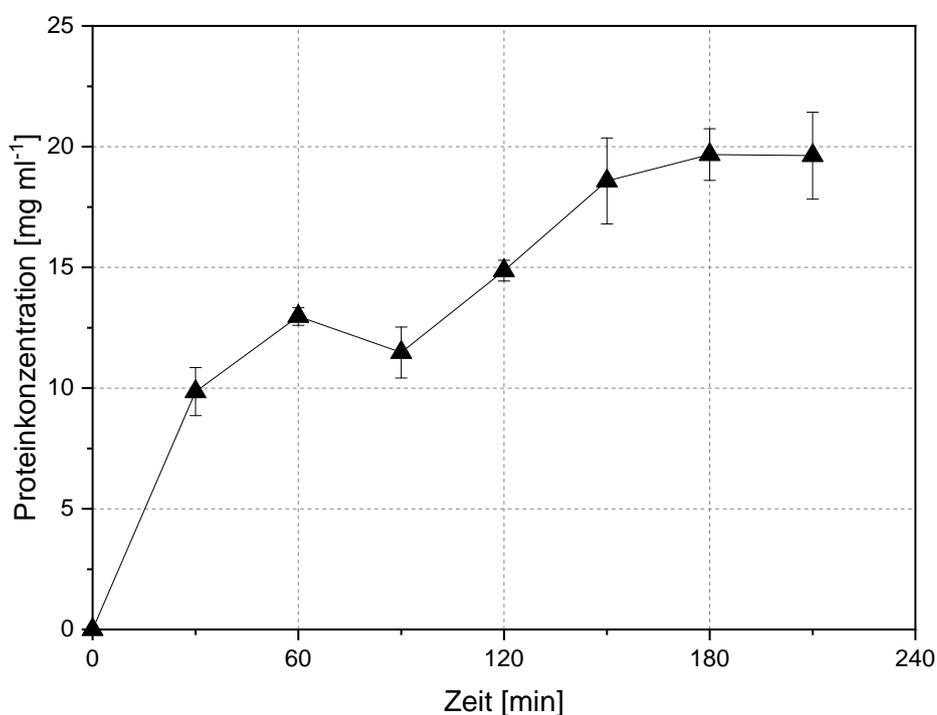


Abbildung 46: Aufschlusskinetik zu der für die Hochdruckflüssigextraktion verwendeten Biomasse-Charge (*P. tricornutum* UTEX 640). Daten und Darstellung übernommen aus (Schäfer, 2018).

## A2.2 Annahmen und Parameter zur Berechnung der Szenarien

### A2.2.1 Prozessparameter für die ökonomische Bewertung.

Tabelle 28: Zusammenfassung wesentlicher Prozessparameter für die ökonomische Bewertung auf Grundlage der vorliegenden Arbeit.

	Wert		
<b>Mikroalgenspezies</b>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX 640		
<b>Medium</b>	Modifiziertes Mann und Myers Medium		
<b>Optimale Temperatur</b>	20 °C		
<b>pH-Wert</b>	7,3		
	Basisszenario (BS)	Industrieszenario (IS)	Industrieszenario (HIS)
<b>Nennvolumen (FPA-PBR)</b>	30 L Reaktor <sup>-1</sup>	30 L Reaktor <sup>-1</sup>	180 L Reaktor <sup>-1</sup>
<b>operatives Volumen (FPA-PBR)</b>	26 L Reaktor <sup>-1</sup>	26 L Reaktor <sup>-1</sup>	178,5 L Reaktor <sup>-1</sup>
<b>Modulgröße (Anzahl FPA-PBR)</b>	5	5	5
<b>vol. Biomasseproduktivität</b>	1,53 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	1,53 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	1,53 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
<b>Massenanteil Fucoxanthin</b>	16,2 mg g <sup>-1</sup>	16,2 mg g <sup>-1</sup>	16,2 mg g <sup>-1</sup>
<b>Massenanteil EPA<sup>(1)</sup></b>	40,2 mg g <sup>-1</sup>	40,2 mg g <sup>-1</sup>	40,2 mg g <sup>-1</sup>
<b>Relative Lichtverfügbarkeit</b>	8 µmol g <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	8 µmol g <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	8 µmol g <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
<b>Beleuchtete Reaktoroberfläche</b>	1 m <sup>2</sup>	1 m <sup>2</sup>	5 m <sup>2</sup>
<b>Initiale Biomassekonzentration</b>	6 g L <sup>-1</sup>	6 g L <sup>-1</sup>	6 g L <sup>-1</sup>
<b>Anzahl Reaktoren (Module)</b>	50 (10)	12100 (2420)	1765(353)
<b>Gesamtvolumen</b>	1,3 m <sup>3</sup>	314,6 m <sup>3</sup>	315,1 m <sup>3</sup>
<b>Flächenbedarf</b>	0,02 ha	4,25 ha	1,04 ha
<b>Preis für Industrieland<sup>(1)</sup></b>	16,42 €m <sup>-2</sup>	16,42 €m <sup>-2</sup>	16,42 €m <sup>-2</sup>
<b>Produktionstage pro Jahr</b>	353 d a <sup>-1</sup>	353 d a <sup>-1</sup>	353 d a <sup>-1</sup>
<b>Arbeitszeit pro Arbeiter</b>	8 h d <sup>-1</sup>	8 h d <sup>-1</sup>	8 h d <sup>-1</sup>
<b>Einkommen pro Arbeiter</b>	36.000 €a <sup>-1</sup>	36.000 €a <sup>-1</sup>	36.000 €a <sup>-1</sup>
<b>Anzahl der Arbeiter USP</b>	1	15	15
<b>Anzahl der Arbeiter DSP</b>	1	17	17
<b>Anzahl der Gesamtarbeiter</b>	2	32	32
<b>tägl. Betriebsdauer</b>	24 h d <sup>-1</sup>	24 h d <sup>-1</sup>	24 h d <sup>-1</sup>
<b><i>P. tricornutum</i> Gesamtbiomasse</b>	0,7 t a <sup>-1</sup>	170 t a <sup>-1</sup>	170 a <sup>-1</sup>

<sup>(1)</sup> für Sachsen-Anhalt (Quelle: <https://statistik.sachsen-anhalt.de>)

### A2.2.2 Investitionskosten und Stromverbrauch für wesentliche Geräte, Sensoren und Maschinen.

Die nachfolgenden Angaben stammen jeweils aus Angeboten, Dokumentationen und persönlichen Gesprächen mit den beteiligten Herstellern im Jahre 2019.

Tabelle 29: Beschaffungskosten und Nennvolumen für die in der ökonomischen Bewertung betrachteten Flachplatten-Airlift-Photobioreaktoren.

Nennvolumen	Operatives Volumen	Firma	Kosten per Einheit	Einheiten pro Modul
30 L	26,00 L	Subitec GmbH	200,00 €	5
180 L	178,50 L	Subitec GmbH	1.000,00 €	5

ANHANG

Tabelle 30: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der in der ökonomischen Bewertung betrachteten Pumpen, Sensoren und Ventile.

Equipment	Kapazität	Stromverbrauch	Firma	Kosten pro Einheit	FPA-PBR	Einheiten pro Modul
Umwälzpumpe	8 bar	1,50 kW	Prebena	150,00 €	30 L	1
Umwälzpumpe	10 bar	7,50 kW	Renner	6.670,00 €	180 L	1
pH/Temp.-Sonde	-	-	Jumo	270,00 €	Alle	1
Messumformer	-	10,00 W	Mettler-Toledo	1.600,00 €	Alle	1
Drucksensor	0-0,60 Bar	0,48 W	Afriso	240,00 €	Alle	1
Mass flow controller CO <sub>2</sub>	0-250 l h <sup>-1</sup>	3,00 W	M+W Instruments	1.500,00 €	Alle	1
Rhotameter Luft	0-600 l h <sup>-1</sup>	-	Key Instruments	100,00 €	Alle	5
Ventil Fütterung	-	14,00 W	SFB Industries	45,00 €	Alle	4
Ventil Ernte	-	13,00 W	SFB Industries	55,00 €	Alle	2
Pumpe Fütterung	26 ml min <sup>-1</sup>	25,00 W	Watson	2.285,00 €	Alle	1
Pumpe Ernte	2.400 ml min <sup>-1</sup>	135,00 W	Watson	5.560,00 €	Alle	1
Waage	150 kg	4,56 W	Kern	800,00 €	Alle	1

Tabelle 31: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der in der ökonomischen Bewertung betrachteten Geräte zur Kühlung.

Equipment	Kapazität	Stromverbrauch	Firma	Kosten pro Einheit	FPA-PBR	Einheiten pro Modul
Kühlbecken	113,75 L	-	Diverse	225,00 €	30 L	5
Kühlbecken	250,00 L	-	Diverse	494,51 €	180 L	5
Kühlwendel	-	-	Diverse	300,00 €	-	1
Umwälzpumpe	-	-	Diverse	20,00 €	-	1
Kühleinheit	1.200 W Kälteleistung	2.509,62 W	Fryka	3.500,00 €	30 L	1
Kühleinheit	2.300 W Kälteleistung	5.515,64 W	Fryka	4.950,00 €	180 L	1

Tabelle 32: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der in der ökonomischen Bewertung betrachteten Geräte zur künstlichen Beleuchtung der Mikroalgen.

Equipment	Kapazität	Energieverbrauch	Firma	Kosten pro Einheit	FPA-PBR	Einheiten pro Modul
LED Matrix	4.000 K	927,40 W m <sup>-2</sup>	Lumitronix	142,00 €	30 L	45
LED Matrix	4.000 K	927,40 W m <sup>-2</sup>	Lumitronix	142,00 €	180 L	225
Potentiometer		In LED-Matrix integriert	Lumitronix	3,28 €		1
Spannungsversorgung	320 W	In LED-Matrix integriert	Lumitronix	71,85 €	30 L	9
Spannungsversorgung	320 W	In LED-Matrix integriert	Lumitronix	71,85 €	180L	45

## ANHANG

Tabelle 33: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der in der ökonomischen Bewertung betrachteten Geräte zur Steuerung der Reaktoren.

Equipment	Kapazität	Stromverbrauch	Firma	Kosten pro Einheit	FPA-PBR	Einheiten pro Modul
Schaltschrank	-	-	diverse	1.600,00 €	-	1
Steuereinheit	-	32,88 W	Siemens	3.500,00 €	-	1

Tabelle 34: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der in der ökonomischen Bewertung betrachteten Geräte zur Aufkonzentrierung der Biomasse.

Equipment	Kapazität	Stromverbrauch	Firma	Kosten pro Einheit	Szenario	Einheiten
Separator	1.0000 l h <sup>-1</sup>	1,26 kW	Alfa Laval Mid Europe GmbH	65.000,00 €	BS	1
Separator	9.0000 l h <sup>-1</sup>	11,36 kW	Alfa Laval Mid Europe GmbH	65.000,00 €	IS, HIS	2

Tabelle 35: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der in der ökonomischen Bewertung betrachteten Geräte zum Aufschluss der Biomasse.

Equipment	Kapazität	Stromverbrauch	Firma	Kosten pro Einheit	Szenario	Einheiten
Kugelmühle	150 l h <sup>-1</sup>	22,75 kW	Bühler	103.000,00 €	BS	1
Kugelmühle	1650 l h <sup>-1</sup>	118,25 kW	Bühler	248.165,64 €	IS, HIS	1

Tabelle 36: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der in der ökonomischen Bewertung betrachteten Geräte zur Trocknung der Biomasse.

Equipment	Kapazität	Stromverbrauch	Firma	Kosten pro Einheit	Szenario	Einheiten
Sprüh-trockner	20 kg h <sup>-1</sup> (Verdunstung von Wasser)	1,20 kWh kg <sup>-1</sup>	Hosokawa Micron B.V.	416.255,04 €	BS	1
Sprüh-trockner	2.525 kg h <sup>-1</sup> (Verdunstung von Wasser)	1,20 kWh kg <sup>-1</sup>	Hosokawa Micron B.V.	2.000.000,00 €	IS, HIS	1

Tabelle 37: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der in der ökonomischen Bewertung betrachteten Geräte zur Extraktion der Biomasse.

Equipment	Kapazität	Stromverbrauch	Firma	Kosten pro Einheit	Szenario	Einheiten
Hochdruck-reaktoren	3x 10 L	7,33 kW	Based on Berghof Products + Instruments GmbH	123.608,90 €	BS	1

## ANHANG

Equipment	Kapazität	Stromverbrauch	Firma	Kosten pro Einheit	Szenario	Einheiten
Hochdruckreaktoren	3x 600 L	361,33 kW	Based on Berghof Products + Instruments GmbH	871.552,86 €	IS, HIS	4
Vakuumpumpe	0,002 Bar	1,47 kW	Vacuubrand	18.340,00 €	BS, IS, HIS	1
Filtrationseinheit	-	-	diverse	422,39 €	BS	1
Filtrationseinheit	-	-	diverse	422,39 €	IS, HIS	73

Tabelle 38: Beschaffungskosten und Stromverbrauch der in der ökonomischen Bewertung betrachteten Geräte zur Rückgewinnung des Lösungsmittels.

Equipment	Kapazität	Stromverbrauch	Firma	Kosten pro Einheit	Szenario	Einheiten
Vakuumdestillationsanlage	13,50 l h <sup>-1</sup>	7,10 kW	OFRU Recycling GmbH & Co. KG	33.000,00 €	BS	1
Vakuumdestillationsanlage	979,17 l h <sup>-1</sup>	207,20 kW	OFRU Recycling GmbH & Co. KG	450.000,00 €	IS, HIS	1

Tabelle 39:Standortspezifische Kosten für Wasser und Industrieland.

Kostenpunkt	Preis	Quelle
Trinkwasser	3,91 €m <sup>-3</sup>	Preis für Trinkwasser inkl. Abwassergebühr für den Raum Stuttgart, Stand Jan. 2019;
Industrieland	16,42 €m <sup>-2</sup>	Preise für Industrieland in Sachsen-Anhalt im Jahr 2018, Stand August 2019

### A2.2.3 Kosten für Medienbestandteile, Substrate und Chemikalien.

Tabelle 40: Kosten der in der ökonomischen Bewertung betrachteten Medienbestandteile, Substrate und Chemikalien.

Medienbestandteil	Konzentration	Kosten	Hersteller
NaCl	10,00 g l <sup>-1</sup>	3,10 €kg <sup>-1</sup>	Diverse
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	2,40 g l <sup>-1</sup>	10,76 €kg <sup>-1</sup>	Diverse
CaCl <sub>2</sub>	0,60 g l <sup>-1</sup>	0,72 €kg <sup>-1</sup>	Diverse
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,15 g l <sup>-1</sup>	17,56 €kg <sup>-1</sup>	Diverse
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,12 g l <sup>-1</sup>	7,58 €kg <sup>-1</sup>	Diverse
Fe(III)Citrat Monohydrat	3,50 mg l <sup>-1</sup>	72,90 €kg <sup>-1</sup>	Diverse
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	600,00 mg l <sup>-1</sup>	6,78 €kg <sup>-1</sup>	Diverse
MnCl <sub>2</sub>	140,00 mg l <sup>-1</sup>	27,96 €kg <sup>-1</sup>	Diverse
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	33,00 mg l <sup>-1</sup>	21,00 €kg <sup>-1</sup>	Diverse
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,70 mg l <sup>-1</sup>	112,50 €kg <sup>-1</sup>	Diverse
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	25,00 mg l <sup>-1</sup>	117,90 €kg <sup>-1</sup>	Diverse
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	0,20 mg l <sup>-1</sup>	8,90 €kg <sup>-1</sup>	Diverse

Medienbestandteil	Konzentration	Kosten	Hersteller
H <sub>2</sub> O	-	3,91 €m <sup>-3</sup>	Preis für Trinkwasser inkl. Abwassergebühr für den Raum Stuttgart, Stand Jan. 2019
CO <sub>2</sub>	-	0,30 €m <sup>-3</sup>	Persönliche Informationen vom Zulieferer
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (35 %)	-	0,69 €l <sup>-1</sup>	Diverse
N <sub>2</sub> (200 bar)	-	1,64 €l <sup>-1</sup>	Linde Gas
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	-	16,47 €l <sup>-1</sup>	Merck-Millipore

Tabelle 41: Kosten der in der ökonomischen Bewertung betrachteten Verbrauchsmaterialien.

Material	Porendurchmesser	Kosten pro Einheit	Hersteller
CP-Tiefenfilterkerze	1,0 µm	8,45 €	Wolftechnik
Medien-Sterilfilter	0,2 µm	145,25 €	Sartorius AG
Gas-Sterilfilter	0,2 µm	55,80 €	Sartorius AG
PTFE Filterpapier (Ø 142 mm)	0,2 µm	18,84 €	Millipore-Merck

### A2.3 Tabellen zur Berechnung von OPEX und CAPEX des Basisszenarios (BS)

Tabelle 42: Ermittlung der Fixkosten für das Basisszenario (BS) nach Ación et al. (2012) auf Basis der Hauptgerätekosten.

Fixed capital estimated for the case study analysed				
Item	Detail	Factor	of	Costs [€]
1	Major purchased equipment (MEC)	1,000	MEC	1.105.375,51
2	Installations costs	0,200	MEC	221.075,10
3	Instrumentation and control	0,150	MEC	165.806,33
4	Piping	0,200	MEC	221.075,10
5	Electrical	0,100	MEC	110.537,55
6	Building	0,225	MEC	248.709,49
7	Yard improvements	0,120	MEC	132.645,06
8	Service facilities	0,200	MEC	221.075,10
9	Land	0,003	MEC	3.605,66
10	Engineering and supervision	0,300	MEC	331.612,65
11	Construction expenses	0,050	Σ1-9	121.495,25
12	Contractor's fee	0,025	Σ1-9	60.747,62
13	Contingency	0,080	Σ1-12	235.500,83
	<b>Total fixed capital, A</b>			<b>3.179.261,26</b>
Item	Lifetime	Factor	of	Costs [€]
1	Lifetime	20,000		
2	Depreciation	1,000	Σ1-6,8-13/10	152.330,81
3	Property tax	0,010	Depreciation	1.523,31
4	Insurance	0,006	Depreciation	913,98
5	Purchase tax	0,173	Σ1-12/10	25.434,09
	<b>Total fix capital per annum, B</b>			<b>180.202,19</b>

ANHANG

Tabelle 43: Ermittlung der operativen Kosten für das Basisszenario (BS) nach Acién et al. (2012).

Item	Raw material		Units	€units	Costs [€]
1	CO <sub>2</sub>	kg	7.511,99	0,30	2.253,60
2	Medium	l	93.242,63	0,07	6.783,94
3	Nutrition	kg	472,49	98,04	4.610,47
4	Sterilization	l	1.800,00	0,69	1.242,00
5	Hexan	l	231,20	16,47	3.808,72
6	N <sub>2</sub>	l	211,80	1,64	348,06
7	Consumables				8.743,57
Item	Utilities		Units	€cent/units	Costs [€]
8	H <sub>2</sub> O	m <sup>3</sup>	231,27	3,91	904,27
9	Power consumption	kWh	732.037,00	15,57	113.978,16
Item	Labor and Others	Units/ Factor	of	€units	Costs [€]
10	Labor	2		36.000,00	72.000,00
11	Supervision	0,20	labor	72.000,00	14.400,00
12	Payroll charges	0,20	labor and supervision	86.400,00	17.280,00
13	Maintenance	0,04	MEC	1.105.375,51	44.215,02
14	Operating supplies	0,004	Σ1-9,11-12	142.672,78	570,69
15	General plants overhead	0,55	Σ10,11,13	130.615,02	71.838,26
16	Tax	0,16	Σ1-11,13-14	273.858,49	43.817,36
17	Contingency	0,05	Σ1-11	229.072,78	11.453,64
18	Marketing	0,05	Σ1-17	418.247,75	20.912,39
	<b>Total raw materials, C</b>				<b>27.790,35</b>
	<b>Total utilities, D</b>				<b>114.882,43</b>
	<b>Total labor and others, E</b>				<b>296.487,36</b>

Tabelle 44: Ermittlung der Gesamtkosten (OPEX und CAPEX) und der Kostenstruktur für das Basisszenario (BS) nach Acién et al. (2012).

<b>Total production cost, F (B+C+D+E)</b>	<b>[€a]</b>	<b>619.362,33 €</b>
<b>Total biomass production</b>	<b>[kg/a]</b>	<b>702,12</b>
<b>Unit cost of producing biomass</b>	<b>[€/kg]</b>	<b>882,14</b>
		Share %
<b>B, Fixed Capital</b>	180.202,19 €	29,09
<b>C, Raw Materials</b>	27.790,35 €	4,49
<b>D, Utilities</b>	114.882,43 €	18,55
<b>E, Labour and others</b>	296.487,36 €	47,87
<b>CAPEX</b>	180.202,19 €	29,09
<b>OPEX</b>	439.160,14 €	70,91

		Share %
<b>Mayor Equipment</b>	55.268,78 €	8,92
<b>Land</b>	180,28 €	0,03
<b>Construction and fixed costs</b>	124.753,13 €	20,14
<b>Others</b>	192.807,36 €	31,13
<b>Nutrients</b>	13.648,01 €	2,20
<b>Sterilization</b>	1.242,00 €	0,20
<b>Extraction chemicals</b>	4.156,77 €	0,67
<b>Consumables</b>	8.743,57 €	1,41
<b>Water usage</b>	904,27 €	0,15
<b>Energy</b>	113.978,16 €	18,40
<b>Labour</b>	103.680,00 €	16,74
<b>Total</b>	619.362,33 €	100,00

## A2.4 Tabellen zur Berechnung von OPEX und CAPEX des Industrieszenarios (IS)

Tabelle 45: Ermittlung der Fixkosten für das Industrieszenario (IS) nach Ación et al. (2012) auf Basis der Hauptgerätekosten.

<b>Fixed capital estimated for the case study analysed</b>				
<b>Item</b>	<b>Detail</b>	<b>Factor</b>	<b>of</b>	<b>Costs [€]</b>
<b>1</b>	Major purchased equipment (MEC)	1,000	MEC	88.237.199,97
<b>2</b>	Installations costs	0,200	MEC	17.647.439,99
<b>3</b>	Instrumentation and control	0,150	MEC	13.235.580,00
<b>4</b>	Piping	0,200	MEC	17.647.439,99
<b>5</b>	Electrical	0,100	MEC	8.823.720,00
<b>6</b>	Building	0,225	MEC	19.853.369,99
<b>7</b>	Yard improvements	0,120	MEC	10.588.464,00
<b>8</b>	Service facilities	0,200	MEC	17.647.439,99
<b>9</b>	Land	0,008	MEC	714.017,90
<b>10</b>	Engineering and supervision	0,300	MEC	26.471.159,99
<b>11</b>	Construction expenses	0,050	Σ1-9	9.719.733,59
<b>12</b>	Contractor's fee	0,025	Σ1-9	4.859.866,80
<b>13</b>	Contingency	0,080	Σ1-12	18.835.634,58
	<b>Total fixed capital, A</b>			<b>254.281.066,80</b>
<b>Item</b>	<b>Lifetime</b>	<b>Factor</b>	<b>of</b>	<b>Costs [€]</b>
<b>1</b>	Lifetime	20,000		
<b>2</b>	Depreciation	1,000	Σ1-6,8-13/10	12.184.630,14
<b>3</b>	Property tax	0,010	Depreciation	121.846,30
<b>4</b>	Insurance	0,006	Depreciation	73.107,78
<b>5</b>	Purchase tax	0,173	Σ1-12/10	2.034.248,53
	<b>Total fix capital per annun, B</b>			<b>14.413.832,76</b>

ANHANG

Tabelle 46: Ermittlung der operativen Kosten für das Industrieszenario nach Acién et al. (2012).

Item	Raw material		Units	€units	Costs [€]
1	CO <sub>2</sub>	kg	1.817.901,84	0,30	545.370,55
2	Medium	l	22.564.716,33	0,07	1.641.713,54
3	Nutrition	kg	114.342,10	98,04	1.115.733,24
4	Sterilization	l	435.600,00	0,69	300.564,00
5	Hexan	l	55.488,00	16,47	914.091,79
6	N <sub>2</sub>	l	50.832,00	1,64	83.533,92
7	Consumables				1.724.012,53
Item	Utilities		Units	€cent/units	Costs [€]
8	H <sub>2</sub> O	m <sup>3</sup>	55.967,55	3,91	218.833,13
9	Power consumption	kWh	186.726.023,82	15,57	29.073.241,91
Item	Labor and Others	Units/ Factor	of	€units	Costs [€]
10	Labor	32		36.000,00	1.152.000,00
11	Supervision	0,20	labor	1.152.000,00	230.400,00
12	Payroll charges	0,20	labor and supervision	1.382.400,00	276.480,00
13	Maintenance	0,04	MEC	88.237.199,97	3.529.488,00
14	Operating supplies	0,004	Σ1-9,11-12	35.617.094,61	142.468,38
15	General plants overhead	0,55	Σ10,11,13	4.911.888,00	2.701.538,40
16	Tax	0,16	Σ1-11,13-14	40.671.450,98	6.507.432,16
17	Contingency	0,05	Σ1-11	36.999.494,61	1.849.974,73
18	Marketing	0,05	Σ1-17	52.006.876,27	2.600.343,81
	<b>Total raw materials, C</b>				<b>6.325.019,57</b>
	<b>Total utilities, D</b>				<b>29.292.075,04</b>
	<b>Total labor and others, E</b>				<b>18.990.125,48</b>

Tabelle 47: Ermittlung der Gesamtkosten (OPEX und CAPEX) und der Kostenstruktur für das Industrieszenario (IS) nach Acién et al. (2012).

<b>Total production cost, F (B+C+D+E)</b>	<b>[€a]</b>	<b>69.021.052,84 €</b>	
<b>Total biomass production</b>	<b>[kg/a]</b>	<b>169.912,31</b>	
<b>Unit cost of producing biomass</b>	<b>[€/kg]</b>	<b>406,22</b>	
		Share %	
<b>B, Fixed Capital</b>	14.413.832,76 €	20,88	%
<b>C, Raw Materials</b>	6.325.019,57 €	9,16	%
<b>D, Utilities</b>	29.292.075,04 €	42,44	%
<b>E, Labour and others</b>	18.990.125,48 €	27,51	%
<b>CAPEX</b>	14.413.832,76 €	20,88	%
<b>OPEX</b>	54.607.220,09 €	79,12	%

		Share %	
<b>Mayor Equipment</b>	4.411.860,00 €	6,39	%
<b>Land</b>	35.700,90 €	0,05	%
<b>Construction and fixed costs</b>	9.966.271,86 €	14,44	%
<b>Others</b>	17.331.245,48 €	25,11	%
<b>Nutrients</b>	3.302.817,33 €	4,79	%
<b>Sterilization</b>	300.564,00 €	0,44	%
<b>Extraction chemicals</b>	997.625,71 €	1,45	%
<b>Consumables</b>	1.724.012,53 €	2,50	%
<b>Water usage</b>	218.833,13 €	0,32	%
<b>Energy</b>	29.073.241,91 €	42,12	%
<b>Labour</b>	1.658.880,00 €	2,40	%
<b>Total</b>	69.021.052,84 €	100,00	%

### A2.5 Tabellen zur Berechnung von OPEX und CAPEX des hypothetischen Industrieszenarios (HIS)

Tabelle 48: Ermittlung der Fixkosten für das hypothetische Industrieszenario (HIS) nach Ación et al. (2012) auf Basis der Hauptgerätekosten.

<b>Fixed capital estimated for the case study analysed</b>				<b>AL</b>
<b>Item</b>	<b>Detail</b>	<b>Factor</b>	<b>of</b>	<b>Costs [€]</b>
<b>1</b>	Major purchased equipment (MEC)	1,000	MEC	35.235.470,32
<b>2</b>	Installations costs	0,200	MEC	7.047.094,06
<b>3</b>	Instrumentation and control	0,150	MEC	5.285.320,55
<b>4</b>	Piping	0,200	MEC	7.047.094,06
<b>5</b>	Electrical	0,100	MEC	3.523.547,03
<b>6</b>	Building	0,225	MEC	7.927.980,82
<b>7</b>	Yard improvements	0,120	MEC	4.228.256,44
<b>8</b>	Service facilities	0,200	MEC	7.047.094,06
<b>9</b>	Land	0,005	MEC	186.498,31
<b>10</b>	Engineering and supervision	0,300	MEC	10.570.641,10
<b>11</b>	Construction expenses	0,050	Σ1-9	3.876.417,78
<b>12</b>	Contractor's fee	0,025	Σ1-9	1.938.208,89
<b>13</b>	Contingency	0,080	Σ1-12	7.513.089,88
	<b>Total fixed capital, A</b>			<b>101.426.713,32</b>
<b>Item</b>	<b>Lifetime</b>	<b>Factor</b>	<b>of</b>	<b>Costs [€]</b>
<b>1</b>	Lifetime	20,000		
<b>2</b>	Depreciation	1,000	Σ1-6,8-13/10	4.859.922,84
<b>3</b>	Property tax	0,010	Depreciation	48.599,23
<b>4</b>	Insurance	0,006	Depreciation	29.159,54
<b>5</b>	Purchase tax	0,173	Σ1-12/10	811.413,71
	<b>Total fix capital per annun, B</b>			<b>5.749.095,32</b>

ANHANG

Tabelle 49: Ermittlung der operativen Kosten für das hypothetische Industrieszenario (HIS) nach Acién et al. (2012).

Item	Raw material		Units	€/units	Costs [€]
1	CO <sub>2</sub>	kg	1.820.516,59	0,30	546.154,98
2	Medium	l	22.597.171,94	0,07	1.644.074,87
3	Nutrition	kg	114.506,56	98,04	1.117.338,04
4	Sterilization	l	436.226,54	0,69	300.996,31
5	Hexan	l	55.488,00	16,47	914.091,79
6	N <sub>2</sub>	l	50.832,00	1,64	83.533,92
7	Consumables				1.724.012,53
Item	Utilities		Units	€/cent/units	Costs [€]
8	H <sub>2</sub> O	m <sup>3</sup>	43.865,69	3,91	171.514,85
9	Power consumption	kWh	97.348.600,15	15,57	15.157.177,04
Item	Labor and Others	Units/ Factor	of	€/units	Costs [€]
10	Labor	32		36.000,00	1.152.000,00
11	Supervision	0,20	labor	1.152.000,00	230.400,00
12	Payroll charges	0,20	labor and supervision	1.382.400,00	276.480,00
13	Maintenance	0,04	MEC	35.235.470,32	1.409.418,81
14	Operating supplies	0,004	Σ1-9,11-12	21.658.894,33	86.635,58
15	General plants overhead	0,55	Σ10,11,13	2.791.818,81	1.535.500,35
16	Tax	0,16	Σ1-11,13-14	24.537.348,72	3.925.975,80
17	Contingency	0,05	Σ1-11	23.041.294,33	1.152.064,72
18	Marketing	0,05	Σ1-17	31.427.369,58	1.571.368,48
	<b>Total raw materials, C</b>				<b>6.330.202,44</b>
	<b>Total utilities, D</b>				<b>15.328.691,90</b>
	<b>Total labor and others, E</b>				<b>11.339.843,73</b>

Tabelle 50: Ermittlung der Gesamtkosten (OPEX und CAPEX) und der Kostenstruktur für das hypothetische Industrieszenario (HIS) nach Acién et al. (2012).

<b>Total production cost, F (B+C+D+E)</b>	<b>[€a]</b>	<b>38.747.833,38 €</b>	
<b>Total biomass production</b>	<b>[kg/a]</b>	<b>170.156,70</b>	
<b>Unit cost of producing biomass</b>	<b>[€/kg]</b>	<b>227,72</b>	
		Share %	
<b>B, Fixed Capital</b>	5.749.095,32 €	14,84	%
<b>C, Raw Materials</b>	6.330.202,44 €	16,34	%
<b>D, Utilities</b>	15.328.691,90 €	39,56	%
<b>E, Labour and others</b>	11.339.843,73 €	29,27	%

		Share %	
<b>CAPEX</b>	5.749.095,32 €	14,84	%
<b>OPEX</b>	32.998.738,06 €	85,16	%
<b>Mayor Equipment</b>	1.761.773,52 €	4,55	%
<b>Land</b>	9.324,92 €	0,02	%
<b>Construction and fixed costs</b>	3.977.996,88 €	10,27	%
<b>Others</b>	9.680.963,73 €	24,98	%
<b>Nutrients</b>	3.307.567,89 €	8,54	%
<b>Sterilization</b>	300.996,31 €	0,78	%
<b>Extraction chemicals</b>	997.625,71 €	2,57	%
<b>Consumables</b>	1.724.012,53 €	4,45	%
<b>Water usage</b>	171.514,85 €	0,44	%
<b>Energy</b>	15.157.177,04 €	39,12	%
<b>Labour</b>	1.658.880,00 €	4,28	%
<b>Total</b>	38.747.833,38 €	100,00	%

### A3 Liste der Veröffentlichungen im Zeitraum der Anfertigung dieser Arbeit

**F. Derwenskus** “Tailored-production of fucoxanthin and EPA with *P. tricornutum*: High-value ingredients for food- and cosmetic applications” (2019), Conference talk, Day of Industrial Biotechnology, University of Stuttgart IBVT (Stuttgart, 22<sup>th</sup> of November 2019)

**F. Derwenskus** “Up- and downstream processing of microalgae” (2019), Conference talk, EIT-Food EU-Workshop on Algal Biotechnology (Stuttgart, 13<sup>th</sup> of November 2019)

**F. Derwenskus**, U. Schmid-Staiger, U. Schließmann “Wertstoffe aus Mikroalgen –Erhöhung der Wertschöpfung durch Kaskadennutzung und Fraktionierung“ (2019), Book chapter in „Biologische Transformation“, Hrsg. Reimund Neugebauer, Fraunhofer-Forschungsfokus, Springer Verlag, ISBN: 978-3-662-58242-8

A. Gille, B. Stojnic, **F. Derwenskus**, A. Trautmann, C. Posten, K. Briviba, A. Palou, M. Bonet, J. Ribot: „A Lipophilic Fucoxanthin-Rich *Phaeodactylum tricornutum* Extract Ameliorates Effects of Diet-Induced Obesity in C57BL/6J Mice” (2019), *Nutrients* 11, 796, <https://doi.org/10.3390/nu11040796>

U. Neumann\* and **F. Derwenskus\***, U. Schmid-Staiger, T. Hirth, S. C. Bischoff: „Fucoxanthin, A Carotenoid Derived from *Phaeodactylum tricornutum* Exerts Antiproliferative and Antioxidant Activities In Vitro” (2019), *Antioxidants* 8, 183, <https://doi.org/10.3390/antiox8060183>; (\*) contributed equally.

**F. Derwenskus**, F. Metz, A. Gille, U. Schmid-Staiger, K. Briviba, U. Schließmann, T. Hirth: “Pressurized extraction of unsaturated fatty acids and carotenoids from wet *C. vulgaris* and *P. tricornutum* biomass using subcritical liquids” (2019), *GCB Bioenergy*, doi: 10.1111/gcbb.12563

**F. Derwenskus**, U. Schmid-Staiger, U. Schließmann, T. Hirth: „Microalgae biorefinery – cascaded fractionation of microalgae ingredients for food and feed applications”, Poster, 4<sup>th</sup> Status Seminar of the Bioeconomy Research Program of Baden-Württemberg (Stuttgart-Hohenheim, 8<sup>th</sup> of January 2019) - *Awarded for the best poster* –

U. Neumann, **F. Derwenskus**, A. Gille, K. Briviba, S.C. Bischoff: „Bioverfügbarkeit, gesundheitlicher Nutzen und Sicherheit von Nährstoffen aus Mikroalgen”, Poster, 4<sup>th</sup> Status Seminar of the Bioeconomy Research Program of Baden-Württemberg (Stuttgart-Hohenheim, 8<sup>th</sup> of January 2019)

**F. Derwenskus**, A. Gille, U. Schmid-Staiger, K. Briviba, J. Ribot, M. L. Bonet, T. Hirth: “Subcritical lipophilic extracts from *P. tricornutum* - Impact on diet-induced obesity in C57bl/6J mice”, Poster, EABA Alga Europe 2018 (Amsterdam, 3<sup>rd</sup> to 6<sup>th</sup> of December 2018)

P. Bodenberger, **F. Derwenskus**, B. Schäfer, A. Gille, U. Neumann, U. Schmid-Staiger, C. Briviba, T. Hirth: “Influence of specific components on the antioxidant activity of subcritical extracts of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*”, Poster, EABA Alga Europe 2018 (Amsterdam, 3<sup>rd</sup> to 6<sup>th</sup> of December 2018)

**F. Derwenskus**: “Process development and downstream techniques for microalgal ingredients”, Conference talk, EIT Food EU-Workshop on Algal Biotechnology, (Stuttgart, 26<sup>th</sup> to 27<sup>th</sup> of November 2018)

J. Müller, B. Schäfer, **F. Derwenskus**, U. Schmid-Staiger, T. Hirth: „Entwicklung eines ganzheitlichen Produktionsprozesses für Fucoxanthin und EPA mit der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum*“, Poster, DECHEMA Bundesalgenstammtisch 2018 (Karlsruhe, Germany, 27<sup>th</sup> to 28<sup>th</sup> of September 2018)

U. Neumann, **F. Derwenskus**, S. C. Bischoff „Effects of microalgae supplementation on hypercaloric fed mice“, Poster, Food 2030 Congress, (Stuttgart-Hohenheim, Germany, 5<sup>th</sup> to 6<sup>th</sup> of September 2018)

U. Neumann, **F. Derwenskus**, A. Gille, S. Louis, U. Schmid-Staiger, K. Briviba, S.C. Bischoff, „Bioavailability and safety of nutrients from microalgae *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica* and *Phaeodactylum tricornutum* in C57BL/6 mice” (2018), *Nutrients* 10, 965; doi:10.3390/nu10080965

U. Neumann, S. Louis, A. Gille, **F. Derwenskus**, U. Schmid-Staiger, K. Briviba, S.C. Bischoff, „Anti-inflammatory effects of *Phaeodactylum tricornutum* extracts on human blood mononuclear cells and murine macrophages” *Journal of Applied Phycology*, 2018, doi: 10.1007/s10811-017-1352-7

U. Schließmann, **F. Derwenskus**, U. Schmid-Staiger „Microalgae“, Book chapter in “Bioeconomy - Shaping the Transition to a Sustainable Bio-based Economy”, P. 151-157, Springer Publishing 2018 (ISBN: 978-3-319-68151-1)

**F. Derwenskus**, U. Neumann, A. Gille, U. Schmid-Staiger, J. El-Benna, U. Schließmann, S. C. Bischoff, T. Hirth „Production of fucoxanthin and eicosapentaenoic acid with *P. tricornutum* – Antioxidant extracts for food and cosmetic applications” Conference talk, EABA AlgaEurope 2017 (Berlin, Germany, 5<sup>th</sup> to 7<sup>th</sup> of December 2017)

G. Brinitzer, **F. Derwenskus**, R. E. Oben, C. Kuhnhardt, A. Laug, U. Schmid-Staiger „Scaling of phototrophic processes in a pilot plant at Fraunhofer CBP” Poster, EABA AlgaEurope 2017 (Berlin, Germany, 5<sup>th</sup> to 7<sup>th</sup> of December 2017)

**F. Derwenskus**, K. Frick, F. Metz, M. Hardtmann, A. Gille, U. Schmid-Staiger, U. Schließmann, T. Hirth „Production of microalgae extracts for food- and feed applications”, Poster, 2. Bioeconomy Congress (Stuttgart-Hohenheim, 12<sup>th</sup> to 13<sup>th</sup> of September 2017).

U. Neumann, **F. Derwenskus**, A. Gille, S. Louis, S. C. Bischoff „Bioavailability and safety of three microalgae in C57Bl/6 mice”, Conference talk, 2. Bioeconomy Congress (Stuttgart-Hohenheim, 12<sup>th</sup> to 13<sup>th</sup> of September 2017).

**F. Derwenskus**, M. Hardtmann, K. Frick, A. Gille, U. Schmid-Staiger, U. Schließmann, T. Hirth „Einfluss der relativen Lichtverfügbarkeit auf den EPA- und Fucoxanthingehalt von *P. tricornutum* bei semi-kontinuierlicher Kultivierung im FPA-Reaktor“, Conference talk, (DECHEMA Bundesalgenstammtisch 2017, Merseburg, 11<sup>th</sup> to 12<sup>th</sup> of September 2017).

U. Neumann, **F. Derwenskus**, A. Gille, S. Louis, S. C. Bischoff “Bioavailability and safety of three microalgae in C57BL/6 mice”, Poster, Nutrition 2017 (Zurich, Switzerland, 29<sup>th</sup> of June to 1<sup>st</sup> of July 2017) – Winner of GESKES Poster Award sponsored by Fresenius Kabi-

U. Neumann, S. Louis, **F. Derwenskus**, A. Gille, S.C. Bischoff „Bioavailability and safety of the microalgae *Nannochloropsis oceanica*, *Chlorella vulgaris* and *Phaeodactylum tricornutum* in C57BL/6 mice”, Poster, ISAP 2017 (Nantes, France, 20<sup>th</sup> of June 2017)

U. Neumann, S. Louis, **F. Derwenskus**, A. Gille, S.C. Bischoff „Anti-inflammatory effects of different *Phaeodactylum tricornutum* extracts on human primary and RAW 264.7 cells”, Conference talk, ISAP 2017 (Nantes, France, 20<sup>th</sup> of June 2017)

**F. Derwenskus**, U. Schmid-Staiger “Wertstoffe aus Mikroalgen für Lebensmittelanwendungen”, Annual Report 2016/17, Fraunhofer Institute of Interfacial Engineering and Plasmatechnology IGB, p. 50 - 51

**F. Derwenskus**, G. Brinitzer, A. Gille, U. Schmid-Staiger, U. Schließmann, T. Hirth: “Pressurized liquid extraction of EPA- and fucoxanthin from *P. tricornutum* produced in flat panel airlift reactors in an outdoor pilot scale plant”, Poster, Alga Europe 2016 (Madrid, Spain, 13<sup>th</sup> to 16<sup>th</sup> of December 2016) - Poster Award for the best academic poster -

A. Gille, R. Hollenbach, A. Trautmann, **F. Derwenskus**, C. Posten, K. Briviba: “*Phaeodactylum tricornutum* in human nutrition: antioxidant properties and effect on genotoxicity”, Poster, Alga Europe 2016 (Madrid, Spain, 13<sup>th</sup> to 16<sup>th</sup> of December 2016)

U. Schmid-Staiger, G. Brinitzer, **F. Derwenskus**, U. Schließmann, T. Hirth: “Bioprocessing Strategies Towards Economic Algae Production”, Poster, Alga Europe 2016 (Madrid, Spain, 13<sup>th</sup> to 16<sup>th</sup> of December 2016)

U. Neumann, S. Louis, **F. Derwenskus**, A. Gille, S. C. Bischoff: “Anti-inflammatory effects of different *Phaeodactylum tricornutum* extracts on human peripheral blood mononuclear cells”, Conference talk, Alga Europe 2016 (Madrid, Spain, 13<sup>th</sup> to 16<sup>th</sup> of December 2016)

U. Schmid-Staiger, U. Schließmann, **F. Derwenskus** „Herstellung von Algenprodukten unter bioökonomischen Gesichtspunkten“, Ressourceneffizienz- und Kreislaufwirtschaftskongress 2016, Conference talk (Karlsruhe, Germany, 05<sup>th</sup> -06<sup>th</sup> of October 2016)

**F. Derwenskus**, U. Schmid-Staiger, U. Schließmann, T. Hirth: “Microalgae biorefinery – cascaded fractionation of microalgae ingredients for food and feed applications”, Poster, 2<sup>nd</sup> Status Seminar and

Interim Evaluation of the Bioeconomy Research Program Baden-Württemberg (Stuttgart, Germany, 13<sup>th</sup> of Oktober 2016)

U. Neumann, **F. Derwenskus**, S. Louis, S. C. Bischoff: “Anti-inflammatory effects of different *Phaeodactylum tricornutum* extracts on human primary blood cells”, Poster, 2<sup>nd</sup> Status Seminar and Interim Evaluation of the Bioeconomy Research Program Baden-Württemberg (Stuttgart, Germany, 13<sup>th</sup> of Oktober 2016)

**F. Derwenskus**, G. Brinitzer, U. Schmid-Staiger, U. Schließmann, T. Hirth: “Extraction of EPA and fucoxanthin from *P. tricornutum* biomass produced in flat panel airlift reactors in an outdoor pilot scale plant”, Poster, 9<sup>th</sup> DECHEMA Bundesalgenstammtisch (Jülich, Germany, 28<sup>th</sup> to 29<sup>th</sup> of September 2016)

U. Schließmann, U. Schmid-Staiger, **F. Derwenskus** „Einflussfaktoren auf die Wirtschaftlichkeit der Herstellung von Algenprodukten“, Conference talk, 9<sup>th</sup> DECHEMA Bundesalgenstammtisch (Jülich, Germany, 28<sup>th</sup> to 29<sup>th</sup> of September 2016)

**F. Derwenskus**, U. Schmid-Staiger, U. Schließmann, T. Hirth „Mikroalgenbioraffinerie – Entwicklung von Zellaufschluss und Extraktionsprozessen zur Kaskadennutzung von Mikroalgenbiomasse“, Conference talk, Annual ProcessNet Meeting 2016 and 32<sup>th</sup> DECHEMA Meeting of Biotechnologists (Aachen, Germany, 12<sup>th</sup> to 15<sup>th</sup> of September 2016), Wiley-VCH: DOI: 10.1002/cite.201650118

**F. Derwenskus**, F. Metz, M. Hardtmann, U. Schmid-Staiger, U. Schließmann, T. Hirth „Kaskadenextraktion von Mikroalgenbiomasse zur Gewinnung von Wertstoffen für die Lebensmittelproduktion“, Poster, Annual ProcessNet Meeting 2016 and 32<sup>th</sup> DECHEMA Meeting of Biotechnologists (Aachen, Germany, 12<sup>th</sup> – 15<sup>th</sup> of September 2016), Wiley-VCH: DOI: 10.1002/cite.201650261

G. Brinitzer, P. Brosig, **F. Derwenskus**, A. Laug, U. Schmid-Staiger „Production of EPA-rich *P. tricornutum* biomass in a pilot plant with flat panel airlift reactors” Poster, 20<sup>th</sup> International Conference for Renewable Resources, NAROSSA (Magdeburg, Germany, 13<sup>th</sup> of June 2016)

A. Trautmann, **F. Derwenskus**, U. Schmid-Staiger, C. Posten, T. Hirth “Integrated up- and downstream processing of phototrophic microalgae: A step towards global food security “, Young Algaeneers Symposium 2016 (Qawra, Malta, 23<sup>th</sup> – 25<sup>th</sup> of April 2016)

**F. Derwenskus**, U. Schmid-Staiger “Kaskadennutzung von Mikroalgenbiomasse”, Annual Report 2015/16, Fraunhofer Institute of Interfacial Engineering and Plasmatechnology IGB, p. 108 - 109

**F. Derwenskus**, F. Metz, U. Schmid-Staiger, U. Schließmann, T. Hirth „Cascading extraction processes for the utilization of microalgae biomass for food and feed applications”, Poster, Annual DECHEMA ProcessNet Meeting for Food Process Engineering 2016 (Erlangen, Germany, 10<sup>th</sup> – 11<sup>th</sup> March 2016)

**F. Derwenskus**, C. Holdmann „Microalgae – Underestimated All-rounders”, ChemistryViews Magazine, Wiley-VCH Verlag GmbH, www.chemstirviews.org, DOI: 10.1002/chemv.201500106 (January 2016)

**F. Derwenskus** „Cascading microalgae biorefinery - Development of cell disruption and extraction processes for microalgal biomass“, Conference Talk, 1<sup>st</sup> Status Seminar of the Bioeconomy Research Program Baden-Württemberg (Stuttgart-Hohenheim, Germany, 29<sup>th</sup> of December 2015)

**F. Derwenskus**, C. Bringmann, U. Schmid-Staiger, U. Schließmann, T. Hirth „Entwicklung von Zellaufschluss- und Extraktionsprozessen zur Kaskadennutzung von Mikroalgenbiomasse“, Poster, 8<sup>th</sup> DECHEMA Bundesalgenstammtisch (Munich, Germany, 7<sup>th</sup> – 8<sup>th</sup> September 2015)

**F. Derwenskus**, U. Schmid-Staiger, U. Schließmann, T. Hirth „Zell- und Extraktionsverfahren zur Kaskadennutzung von Mikroalgenbiomasse“, Poster, 1<sup>st</sup> Bioeconomy Conference (Stuttgart, Germany, 29<sup>th</sup>– 30<sup>th</sup> of October, 2014)