



MICRO-Feed: Mikrobielle Rohmaterialien als Protein-, EPA- und DHA-Quelle zur Nutzung in Aquakulturfutter

Schlussbericht

Zuwendungsempfänger: ILU Institut für Lebensmittel- und Umweltforschung e.V.

Förderkennzeichen: 2814ERA03G

Vorhabens-Bezeichnung: MICRO-Feed - Microbial raw materials as source for protein and EPA and DHA for use in aquafeed (ERA – Net)

Laufzeit des Vorhabens: 10.04.2015 – 31.03.2018

Berichtszeitraum: 10.04.2015 – 31.03.2018

Projektleiter: Dr. Michael Sandmann

Inhalt

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen	3
2. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse des Vorhabens im Vergleich zu den ursprünglichen Zielen, die erreichten Nebenergebnisse und wesentlichen Erfahrungen	3
3. Darstellung und Erläuterung der Angemessenheit von Aufwand und Zeit.....	14
4. Aufführen von Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben	14
5. Darstellung und Erläuterung der wissenschaftlichen und ggf. wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche nächste Phase.....	15
6. War der Einsatz der Bundesmittel für die Erreichung des geplanten Vorhabens ursächlich oder wäre dieses Ziel auch ohne Bundesmittel erreicht worden (einschließlich Bewertung eventueller Mitnahmeeffekte)?	15
7. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer – z.B. Anwenderkonferenzen und Darstellung der erfolgten und geplanten Veröffentlichungen.	16
8. Vergleich der entstandenen Ausgaben mit dem verbindlichen Gesamtfinanzierungsplan. Erläuterungen der Positionen des zahlenmäßigen Nachweises zur Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.	18

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen

Die Ausschreibung identifizierte eine der wesentlichen Herausforderungen für die weitere Entwicklung der europäischen Aquakultur: „Das Wachstum der Aquakultur-Industrie ist von einer breiten Menge an nachhaltigen Rohstoffen für die Tierfutterherstellung abhängig, die die Anforderungen der Tiere für gutes Wachstum, deren Gesundheit und der Produktqualität vereinen.“ Im Kontrast dazu wurden in den letzten Jahrzehnten große Mengen an marinen Ölen und Proteinen aus Fischen im Futter eingesetzt. Diese wurden zunächst erfolgreich durch pflanzliche Inhaltsstoffe ersetzt. Die starke Nutzung von pflanzlichen Supplementen verursachte jedoch negative Effekte, wie Darm-Entzündungen bei den kultivierten Fischen oder die Verringerung von essentiellen marinen Fettsäuren in den Produkten. Die bisherige Strategie der Nutzung pflanzlicher Öle konnte nur ungenügend oder keine essentiellen langkettigen omega-3 Fettsäuren im Fischfutter bereitstellen. Es wird angenommen, dass die fehlende Verfügbarkeit dieser Fettsäuren das Wachstum der Lachs- und marinen Fisch-Aquakulturen innerhalb der nächsten 10 Jahre zum Erliegen bringen könnte.

Mit dem beantragten Projekt wird ein Beitrag zur Lösung dieser Herausforderungen geleistet. Es wurde vorgeschlagen kultivierte, marine Mikroorganismen als Alternative für Fischöl und Fischmehl zu nutzen, da sie als Primärproduzenten der prominenten Fettsäuren gelten. Dazu wurden Kultivierungs-, Analyse- und Verarbeitungstechnologien von Mikroorganismen optimiert und ernährungsphysiologische Untersuchungen an verschiedenen Fischgruppen durchgeführt.

Die Einführung von mikrobieller Biomasse in das Fischfutter wird den Druck auf die Nutzung von weniger nachhaltigen Rohstoffen, wie Fischmehl und Fischöl, in der Aquakulturindustrie deutlich verringern und somit das weitere Wachstum der Aquakulturindustrie ermöglichen. Insgesamt wird es dadurch zu einer gestärkten, biobasierten, und nachhaltigen europäischen Wirtschaft führen.

2. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse des Vorhabens im Vergleich zu den ursprünglichen Zielen, die erreichten Nebenergebnisse und wesentlichen Erfahrungen

In dem internationalen Verbund-Projekt “MICRO-Feed” wird das Potential von zwei unterschiedlichen Mikroorganismengruppen (Mikroalgen und Thraustochytriden) als nachhaltige Futterquelle, mit hohen Konzentrationen an Omega-3 Fettsäuren, für Aquakulturen untersucht. Die Partner im Projekt sind aus Deutschland (ILU), Norwegen (NTNU, SINTEF Fischerei und Aquakultur, SINTEF Materialien und Chemie), Türkei (Ege Universität und MEDFRI) und Island (MATIS). Der Projektpartner des deutschen Teilprojektes

(ILU), ist Projektleader im AP2 „Phototrophe Produktion von Omega-3 Fetten und Proteinen“ und am AP4 „Project Management und Verwertung“ beteiligt. Die Aufgabe 2.2 im AP2 „Nutzung von gerichteter Evolution um Stämme mit verbesserter Quantenausbeute zu selektieren“ wird von den Partnern SINTEF und NTNU durchgeführt.

Die **Aufgabe 2.1** „Bestimmung des Einflusses der Kulturbedingungen auf das Lipid-Protein Verhältnis und auf den DHA/EPA-Gehalt in drei Modellorganismen“ beinhaltet im Wesentlichen das Ziel die Lipidgehalte in den Algen zu erhöhen und die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Kulturbedingungen auf Biomasseproduktivität und die Zusammensetzung der Modellalgen zu beschreiben. Hier sollen insbesondere kleinskalige Kultivierungssysteme zum Einsatz kommen um eine möglichst effiziente Evaluation der Ergebnisse zu ermöglichen.

Zum Auftakt des Gesamtvorhabens wurde, während des Kickoff-Meetings in Trondheim (Norwegen), der Ablauf für die Partner koordiniert und die benötigten Biomassen für die Fütterungsversuche diskutiert. Die im Antrag noch nicht vordefinierte Nannochloropsis Art wurde auf *Nannochloropsis oceanica* festgelegt. Der Partner SINTEF hat dem ILU die drei für das Projekt ausgewählten Algenarten (*Nannochloropsis oceanica*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Pavlova lutheri*) zur Verfügung gestellt.

Zur Umsetzung wurden verschiedene Kultivierungssysteme wie Zellkulturflaschen (200 ml) und Tisch-PBRs (2L) genutzt. Die kleinskaligen Kulturen ermöglichten eine effiziente, reproduzierbare und verlässliche Durchführung der Experimente. Vor der Optimierung der Lipidgehalte in den Zellen stand die Etablierung einer stabilen und produktiven Kontrollkultivation im Fokus. Bei den beiden Algen *Nannochloropsis oceanica* und *Phaeodactylum tricornutum* wurden die von den Projektpartnern zunächst vorgegebenen Standardbedingungen vom ILU optimiert, um unter dem Gesichtspunkt einer im Projekt angestrebten Massenkultivation eine maximale Biomasse-Produktivität zu erreichen. Während der Optimierungs-Experimente wurde eine Vielzahl an Bedingungen getestet und der Einfluss auf die Algenphysiologie untersucht. Die variierten Wachstumsbedingungen enthielten verschiedene Temperaturen (18 °C, 20 °C, 23 °C, 25 °C und 30 °C) und verschiedene Lichtintensitäten (50-60 $\mu\text{mol Photonen}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$, 70-90 $\mu\text{mol Photonen}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$ und 100-130 $\mu\text{mol Photonen}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$). Als Basismedium diente das F/2 Medium. Für eine biotechnologisch relevante Produktion der Biomasse, mit Zielkonzentrationen von über 2 g Trockenmasse pro L, musste die Komposition des Basismediums jedoch zusätzlich angepasst werden. Für *Nannochloropsis* und *Phaeodactylum* wurde der Nitratgehalt 2 bis 4-fach erhöht. Für *Phaeodactylum* musste zusätzlich der Phosphatgehalt 2 bis 4-fach erhöht und der Silikat-Anteil 2-fach gesteigert werden. Bei der Alge *Pavlova lutheri* gab es aufgrund unzureichender Wachstumsraten bei den ersten Up-Scaling-Schritten Probleme. Die Lösung dieses Problems

wurde auf dem Projektmeeting in Island und während mehrerer Telefonkonferenzen im Gesamtkonsortium diskutiert. Als eine Alternative versuchten die Norwegischen und Türkischen Partner die Alge *Pavlova lutheri* unter anderen Wachstumsbedingungen zu kultivieren und eine praktikable Variante der Kultivation zu erproben. Die Wachstumsraten waren bei allen Partnern unzureichend, deshalb wurde gemeinschaftlich entschieden die Alge auszuschließen und *Isochrysis* als alternative Art in das Projekt zu integrieren. Durch die entstandenen Verzögerungen im Ablauf wurde gemeinschaftlich entschieden, dass die Kultivation von *Isochrysis* durch die Türkischen Partner durchgeführt wird und ILU sich auf die detaillierte Charakterisierung der physiologischen Unterschiede der Algen unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen, der Etablierung der Up-Scaling Strategie für die Lipidproduktion und der Beschreibung der physiologischen Vorgänge in den Zellkulturen während des Up-Scaling fokussiert.

Nach der Etablierung der oben beschriebenen Referenzkultivierung, stand die Optimierung der Fettsäureproduktion im Labormaßstab im Fokus. Hier musste zum Nachweis der Lipide eine große Herausforderung gemeistert werden. Die bisher gängige Lipidanalytik für den Lebensmittel- und Futtermittel-Bereich benötigt zwischen mehreren 100 mg bis zu 10 g Biomasse. In den genutzten Laborkulturen zur initialen Optimierung der Wachstumsbedingungen und des Lipidgehaltes standen nur unzureichend große Mengen an Biomasse zur Verfügung. Dementsprechend wurde innerhalb des Projektes die Erarbeitung einer wesentlich sensitiveren Methode zur Lipidquantifizierung nötig. Sie basiert auf der quantitativen Markierung der neutralen Lipide in den Zellen mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Nil Rot. Die Quantifizierung der Signale erfolgt durch Fluoreszenzmikroskopie und mit einer im ILU etablierten automatisierten Bildanalytik und ist z.B. in der Lage den Lipid-Gehalt in einzelnen Zellen zu quantifizieren. Die neue Technik wurde routinemäßig für die Optimierung der Kulturbedingungen hinsichtlich der Lipidgehalte eingesetzt. Sie ist nicht nur wesentlich sensitiver, sondern auch schneller als die klassische Referenzanalytik aus dem Lebensmittel- und Futtermittelbereich und liefert zusätzlich einen wesentlich tieferen Einblick in die zeitlichen Dynamiken der Kulturen. Etabliert wurde die Technik an Referenzkulturen der Grünalge *Acutodesmus obliquus*, die unter induziertem Stickstoffmangel eine etwa 100-fache Steigerung der Triacylglyceride (TAG) pro Zelle zeigten. Hier wurde zunächst die Machbarkeit, die Funktionsweise und das Potenzial der Technologie gezeigt und in zwei Peer-Review Zeitschriften veröffentlicht. Die Abbildung 1 stellt zwei exemplarische mikroskopische Bilder von *Nannochloropsis o.* unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen dar. In den dargestellten Kulturen wurde die Medienkomposition verändert um den Lipidgehalt in den Zellen stark zu erhöhen.

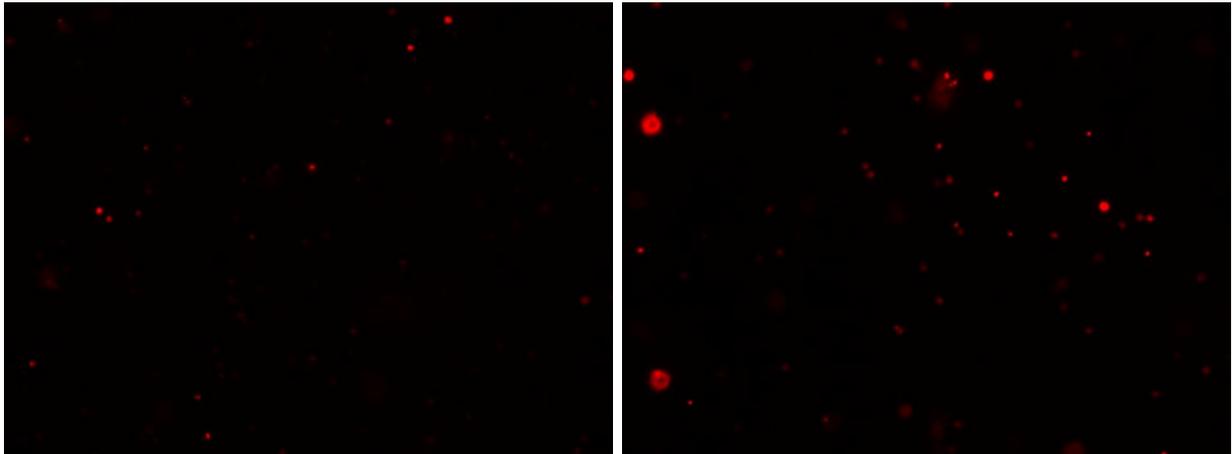


Abbildung 1: Fluoreszenz-Mikroskopische Aufnahmen nach Nilrot-Färbung von *Nannochloropsis o.* nach 12 Tagen Kultivierung. Links: Kontrolle; Rechts: Nitratmangel-Kultur mit stark erhöhtem Lipidgehalt pro Zelle.

Im Vergleich zu anderen Algen, wie *Acutodesmus o.*, sind *Nannochloropsis* und *Phaeodactylum* dafür bekannt, dass sie selbst unter von den Zellen favorisierten Wachstumsbedingungen schon einen hohen Lipidgehalt aufweisen. Innerhalb des APs wurde versucht durch gezielte Wahl der Wachstumsbedingungen einen zusätzlichen positiven Einfluss auf den Lipidgehalt und die Fettsäurezusammensetzung zu nehmen. Für die Optimierungs-Experimente, mit Fokus auf die Lipidgehalte, wurden verschiedene Mineralstoffmangel-Experimente (Nitrat, Phosphat oder Sulfat) durchgeführt. Dazu wurden entweder Mineralstoffkomponenten komplett aus dem Medium entfernt oder der Mineralstoff wurde im Medium stark reduziert. Exemplarische Fotos der 2 L Blasensäulenreaktoren aus den Optimierungsexperimenten sind in Abb. 2 gezeigt. Durch Modifizierung der Kulturbedingungen kommt es zu komplexen Veränderungen in der gesamten Zellphysiologie und der Biomasseproduktivität. Der gezielte Stickstoffmangel (Abb. 2) führte z.B. zu einem starken Anstieg der Lipidmengen in den Zellen. Die Biomasseproduktivität, die Photosyntheseraten und der Pigmentgehalt sind jedoch stark verringert.

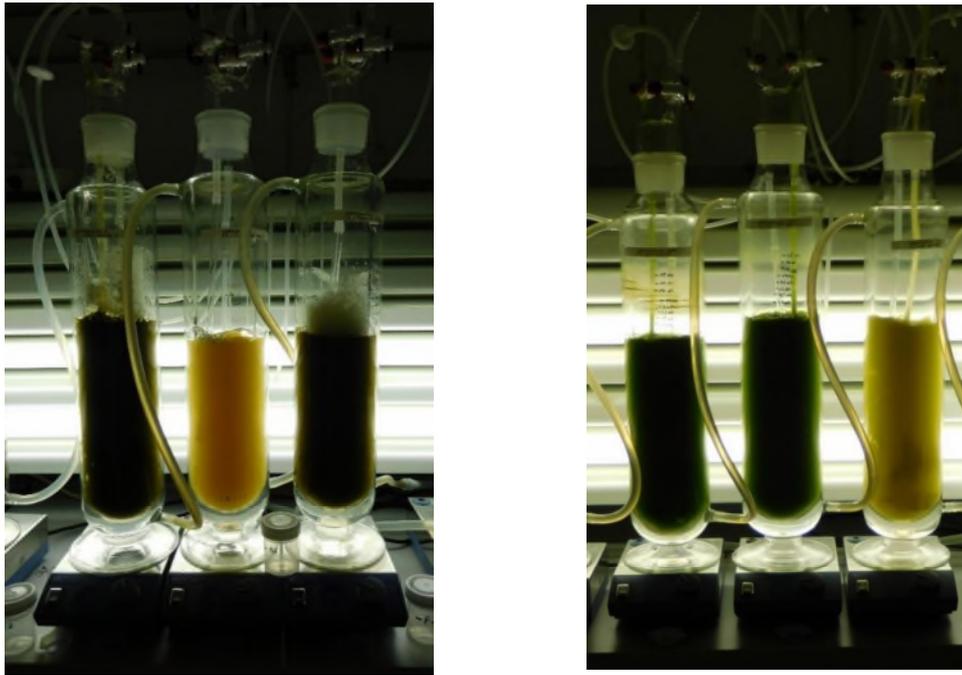


Abbildung 2: Zellkulturen von *Phaeodactylum t.* und *Nannochloropsis o.* Kultiviert in 2 L Blasensäulenreaktoren. **Links:** *Phaeodactylum t.* nach 11 Tagen (v.l.n.r.: Kontrolle I, Nitratmangel I, Phosphatmangel I); **Rechts:** *Nannochloropsis o.* nach 12 Tagen (v.l.n.r.: Kontrolle I, Phosphatmangel I, Nitratmangel I).

Insgesamt war ein starker Stickstoffmangel der effektivste Weg den Lipidgehalt in den Zellen (*Nannochloropsis* und *Phaeodactylum*) zu steigern. Zusammenfassend resultierte der Stickstoffmangel in signifikant verringerten Wachstumsraten der Zellen. Zudem wurde ein starker Einfluss auf die Pigmentgehalte, die Pigmentzusammensetzung der Zellen und auf den Photosyntheseapparat festgestellt. Der Gesamtchlorophyll-Gehalt pro Zelle sank um 50 – 80 %. Zusätzlich wurde die Gesamtleistungsfähigkeit des Photosyntheseapparates und die Quanten-Effizienz des Photosystems II verringert, während die von den Zellen abgestrahlte Energie (Fluoreszenz und Wärme) und die Absorption pro Reaktions-zentrum stark gesteigert wurden. Eine Aufstellung der analysierten Parameter ist in Tabelle 1 gegeben. Der Gehalt an Lipiden konnte durch Variation der Kultivationsbedingungen im kleinskaligen Maßstab gegenüber den gut wachsenden Kontrollkulturen bei *Nannochloropsis* und *Phaeodactylum* um das vier- bis acht-fache gesteigert werden. Im zeitlichen Verlauf trat ein Maximum nach 5 bis 7 Tagen auf. Danach verringerte sich der TAG Gehalt i.d.R. wieder. Diese zeitlichen Dynamiken sind für die weiterführenden Up-Scaling Schritte von großer Bedeutung. Bei der Variation der Phosphat- und Sulfat-Konzentration waren die Effekte geringer oder nicht nachweisbar. Durch die Nutzung der automatisierten Bildanalytik konnte Zugriff auf die Merkmalsausprägungen einzelner Zellen innerhalb der verschiedenen Zellsuspensionen erlangt werden. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass die Lipidakkumulation in den Zellen nicht einheitlich erfolgt und eine sehr ausgeprägte Heterogenität hinsichtlich der

Zellgröße, der Lipid- und der Pigmentgehalte innerhalb der Zellsuspensionen vorliegt. Die erfassten Merkmale zeigen prozessabhängig auftretende Dynamiken. Die generelle Eignung dieser innovativen Technologie für die Machbarkeit eines erweiterten „Prozessmonitorings“ für die biotechnologische Produktion wurde bereits innerhalb der Projektlaufzeit veröffentlicht.

Tabelle 1. Durchgeführte Untersuchungen innerhalb des Projektes MICRO-Feed zur Charakterisierung des Wachstums der unterschiedlichen Algenkulturen

Hintergrund der Untersuchung	Analyseparameter
➤ Zellwachstum	Biotrockenmasse Zellkonzentration Zelldurchmesser totales Zellvolumen pro ml Suspension Optische Dichte
• Inhaltstoffliche Analytik	Fettgehalt Ballaststoffgehalt Proteingehalt Kohlehydratgehalt Fettsäurezusammensetzung Aminosäurezusammensetzung der proteingebundenen AS Pigmentzusammensetzung Mineralstoffgehalt
• Zellphysiologie	Multidimensionale Analytik des Photosyntheseapparates (Analytik von: Lichtsättigungskurven und der OJIP-Induktionskinetik)
• Zellmorphologie	Mikroskopie
• Zellkultur-Medieneigenschaften	pH-Wert Nitratgehalt Phosphatgehalt Sulfatgehalt Silikatgehalt Temperatur
• Etablierung einer schnelleren und sensitiveren Methode zur Lipidbestimmung im Vergleich zu konventionellen Labormethoden aus der Lebensmittelanalytik	Markierung der Lipide in den Algenzellen mittels Fluoreszenzfarbstoffes (Nil Rot) Detektion der lipidabhängigen Fluoreszenz mittels quantitativer Fluoreszenzmikroskopie und automatisierter Bildauswertung Zellgröße Chlorophyllmenge pro Zelle Lipidmenge pro Zelle Chlorophyll Konzentration pro Zelle Lipidkonzentration pro Zelle Quantifizierung der Zell-zu-Zell Heterogenität in den gemessenen Parametern Korrelation zwischen Merkmalsverteilungen

	Identifikation von verschiedenen Subpopulationen mit z.B. unterschiedlicher Lipidproduktivität
--	--

Insgesamt wurde das AP erfolgreich abgeschlossen und lieferte wesentlich mehr Ergebnisse als ursprünglich im Projektantrag geplant. Der Gehalt an Lipiden konnte durch Variation der Wachstumsbedingungen gegenüber den gut wachsenden Kontrollkulturen bei *Nannochloropsis* und *Phaeodactylum* um das vier- bis acht-fache gesteigert werden. Basierend auf den Ergebnissen aus dem AP wurde eine zwei-stufige Up-Scaling Strategie etabliert und zur Produktion, der für die Fütterungsversuche benötigten Biomassen, angewendet (Details in AP 2.4). Die Details werden nach Koordination im Gesamtkonsortium in Fachzeitschriften veröffentlicht werden.

Die **Aufgabe 2.2** im AP2 „Nutzung von gerichteter Evolution um Stämme mit verbesserter Quantenausbeute zu selektieren“ wird von den Partnern SINTEF und NTNU durchgeführt. Nach Aussage des Koordinators sind die Ergebnisse nur bedingt aussagekräftig und deshalb wird von einer Maßstabsvergrößerung der selektierten Stämme abgesehen. Die Versuche bei NTNU und SINTEF dauern noch an und werden im gemeinsamen internationalen Abschlussbericht integriert sein.

In den **Aufgaben 2.3 und 2.4** wurde die Übertragbarkeit in größere Maßstäbe, unter Laborbedingungen und unter natürlichen Außenbedingungen, durchgeführt. Insgesamt wurden vom ILU ca. 88 kg konzentrierte Algenbiomasse geerntet, gefrostet, getrocknet und analysiert. Nach Absprache im Gesamtkonsortium wurden die vielversprechendsten Biomassen an die Partner zur Futtermittelherstellung verschickt. Die produzierten Algen entsprechen einer Gesamttrockenbiomasse von ca. 6,8 kg.

In der **Aufgabe 2.3** „Algenbiomasse-Produktion im Labormaßstab unter optimierten Kulturbedingungen und Nutzung von selektierten natürlichen und mutierten Stämmen“ des AP2 soll eine Biomasse-Produktion im Labormaßstab unter optimierten Kulturbedingungen und der Nutzung von selektierten natürlichen Stämmen stattfinden. In dem AP wurde der Maßstab für die Kultivierung von Tischreaktoren hin zu 100 L Glasröhrenreaktoren erweitert und die Kultivierbarkeit in einer Musterproduktion gezeigt. Dabei wurden die optimierten Kulturbedingungen aus dem AP 2.1 angewandt und in einem zwei-stufigen Up-Scaling Verfahren ein Stickstoffmangelzustand in der Kultur erzeugt (Details siehe Aufgabe 2.4). Alle geernteten Biomassen und die Produktgenerierung über die Zeit wurden charakterisiert. Aufgrund der konstanten Umgebungsbedingungen in der Technikumskultivierung sind die erzielten Ergebnisse insgesamt reproduzierbarer als in der Außenproduktion. Um konstante Produktqualitäten zu garantieren, sollte dieser Aspekt für eine zukünftige Produktion in Betracht gezogen werden. Hier könnten kostengünstige LED-Beleuchtungsmodule

wirtschaftliche Beleuchtungsstrategien, unter sehr reproduzierbaren Bedingungen, ermöglichen.

Die **Aufgabe 2.4** „Produktion von Mikroalgenbiomasse zur Evaluation von Fischfütterungsexperimenten und Untersuchung der phototropen Wachstumsbedingungen hinsichtlich Biomasse- und Produkt-Formation im Demonstrationsmaßstab unter natürlichen Lichtbedingungen“ des AP2 startete im April des zweiten Berichtszeitraumes. Im AP wurde ein Up-Scaling in großen Glasröhrenreaktoren (1000 L bis max. 4000 L) zur Produktion von Mikroalgenbiomasse zur Evaluation der Fischfütterungsexperimente und zur Untersuchung der phototropen Wachstumsbedingungen hinsichtlich Biomasse- und Produkt-Formation im Demonstrationsmaßstab unter natürlichen Lichtbedingungen durchgeführt. Im Gegensatz zu den Laborexperimenten, ist es beim Up-Scaling Prozess nicht möglich, mehrere Kulturen parallel zum Vergleich unter identischen Bedingungen anzuziehen. Für beide Algen wurde die Kultivierung in den Außenanlagen (115 L, 250 L und 1500 L Photobioreaktoren) etabliert. Bei beiden Algen wurden jeweils Referenzkulturen unter Standardbedingungen und Stickstoffmangelkulturen mit veränderter Lipidmenge und Fettsäurekomposition angezogen. Letztere wurden in einem zwei-stufigen Up-Scaling Verfahren erzeugt. Abb. 3 illustriert die blasse Färbung der beiden Algenkulturen nach Kultivierung unter Stickstoffmangel-Bedingungen (Endzeitpunkt des zwei-stufigen Up-Scaling Verfahrens hier exemplarisch im 250 L Reaktor). Im Gegensatz dazu lagen in den Referenzkulturen satte Grün- und Brauntöne vor (Bilder nicht dargestellt).



Abb. 3: Stickstoffmangelkulturen in der Außenkultivierung im 250 L PBR. Links: *Nannochloropsis* am Ende der Kultivierung; Rechts *Phaeodactylum* am Ende der Kultivierung.

Ziel des zwei-stufigen Up-Scaling Verfahrens ist es den Stickstoffmangelzustand in der Kultur möglichst schnell aber ohne zusätzlichen Stress der Kultur zu erzeugen. In Phase 1 werden

Zellen unter sehr produktiven Wachstumsbedingungen angezogen und möglichst viel Biomasse produziert. In Phase 2 werden die Zellen in den Stickstoffmangelzustand überführt und die Fettsäureproduktion und der Lipidstoffwechsel beeinflusst. Bei der Überführung in Phase 2 sind grundsätzlich verschiedene Varianten möglich. Erstens, das langsame Aushungern von Stickstoff, nachdem die Zellen den Anfang der stationären Wachstumshase erreicht haben. Zweitens, ein kompletter Nährmedienaustausch nach Trennung der Zellen am Ende von Phase 1 von ihrem alten, stickstoffhaltigen Medium und drittens, die Überführung eines Teils der Zellen in ein Stickstoffmangelmedium. Alle Varianten wurden hinsichtlich ihrer Machbarkeit im Pilotmaßstab untersucht. In den großen Maßstäben zeigte sich die letzte Variante als am vielversprechendsten. In Abb. 4 wird die Produktion von Biomasse im Pilotmaßstab (1500 L Außenproduktion) von *Nannochloropsis* am Anfang und am Ende der Phase 2 gezeigt. Die erzeugten Biomassen wurden durch Separation von ihrem Zellkulturmedium getrennt und mittels Gefriertrocknung getrocknet. Die Biomassen wurden anschließend hinsichtlich ihrer Zusammensetzung mit Fokus auf die Eignung für Futtermittel analysiert. Die analysierten Parameter waren zunächst: Restwasser, Asche, Fettgehalt, Fettsäurezusammensetzung, gesamt Zucker, Rohfaser, Proteingehalt, Kohlehydrate, Energiegehalt und Aminosäurezusammensetzung. Zusätzlich wurden das Wachstum und die Algenphysiologie in den Außenanlagen mit einer ganzen Reihe an Methoden untersucht um Unterschiede zu den Laborbedingungen zu evaluieren. Die so erzeugten Biomassen wurden für die Partner in Island und in der Türkei, zur Erstellung der Futtermittel und der Durchführung der Fütterungsstudien, zur Verfügung gestellt.

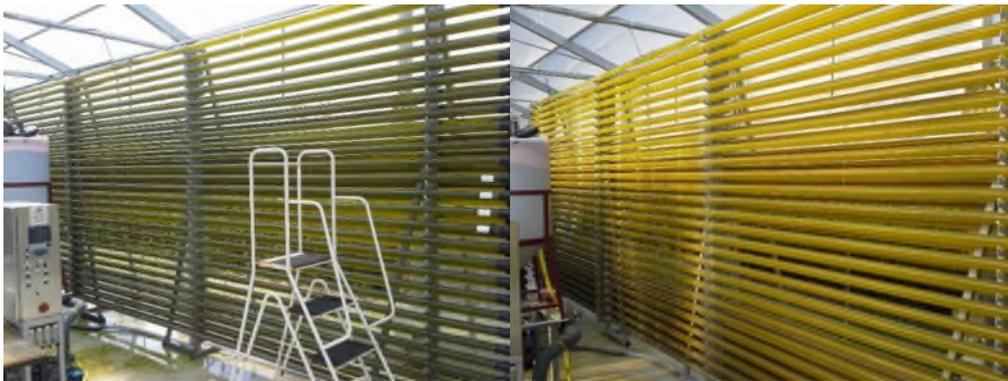


Abb. 4: Stickstoffmangelkulturen in der Außenkultivation im 1500 L PBR. Up-Scaling von *Nannochloropsis* o. Links: Start der -N Kultivation; Rechts: Ende der -N Kultivation.

Bei der **Aufgabe 2.5.** „Vergleich der Produktivität und der Produktkomposition bei zwei verschiedenen Photobioreaktor-Systemen“ trat eine inhaltliche Abweichung vom Arbeitsplan auf. In diesem AP soll ein Prototyp eines Photobioreaktors mit spezieller dreidimensionaler

Geometrie mit einem Referenz-Röhrenreaktor verglichen werden. Als Prototyp war im ursprünglichen Antrag die Nutzung einer 50m² MUTL Anlage geplant. Aufgrund der Reorganisation des ILU haben sich die Besitzverhältnisse der 50 m² Anlage geändert und sie konnte innerhalb des Projektes nicht mehr genutzt werden. Als Alternative wurde die 4 m² MUTL Anlage genutzt. Im Vergleich zur zunächst geplanten Anlage besitzt bietet die kleinere Anlage eindeutige Vorteile, wie der besseren Prozesskontrolle (wirksamere Kühlung und CO₂-Ausnutzung), die Möglichkeit der Nutzung zusätzlicher Beleuchtung und der größeren Flexibilität beim Beschicken, Reinigen und Abernten der Anlage. Die inhaltliche Änderung wurde gemeinsam im Meeting in Island beschlossen und im Sitzungsprotokoll vermerkt. Die Umsetzung des Projektes und die Erfüllung der Projektziele waren davon unbeeinflusst. Die MUTL Technologie zeigte eine wesentlich höhere Biomasseausbeute pro Suspensionsvolumen als konventionelle Röhren-Reaktoren. Die Prototypanlage generierte in den durchgeführten Kultivationen bei beiden Algen, bei vergleichbarer Kultivierungsdauer, eine mehr als drei-fach höhere maximale Biomassekonzentration als die Referenz-Röhren Reaktoren in der ersten Kultivierungsphase (Ref. Bedingungen) (Abb. 5). In der zweiten Kultivierungsphase (Stickstoffmangel) zeigte sich eine ähnliche Tendenz, jedoch fielen die Biomasseausbeuten unter Stickstoffmangel-Bedingungen insgesamt erwartungsgemäß signifikant geringer aus (Glasröhrenreaktor: 1,2 -1,4 g/L; MUTL: 2 – 2,6 g/L) als bei den Kontrollen.

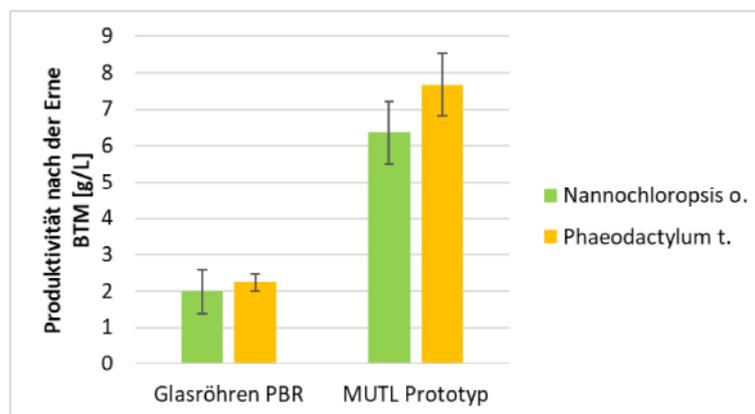


Abbildung 5: Produktivität der beiden PBR Systeme bei *Nannochloropsis* und *Phaeodactylum* unter Referenzbedingungen, Mittelwerte \pm Standardabweichung (über alle Kultivationen)

Zusätzlich zu den höheren Biomasseausbeuten in der MUTL, wurde auch die Biomassezusammensetzung der beiden Algen unter den verschiedenen Medienkompositionen und in den beiden Reaktorsystemen untersucht. Bei *Nannochloropsis* war die Biomassezusammensetzung zwischen den beiden Reaktorsystemen generell sehr ähnlich außer, dass es besonders bei der Fettsäure C20:5 Eicosapentaensäure EPA zu einer Verringerung um ca. 40 % kam. Bei *Phaeodactylum* war im Vergleich zur Anzucht im

Röhrenreaktor der Ballaststoffgehalt, der Proteingehalt verringert und insbesondere bei der Fettsäurezusammensetzung ergaben sich weitere Unterschiede. Die Fettsäure C16:1 Palmitoleinsäure war um ca. 30 % verringert und gleichzeitig der Gehalt an vielfach ungesättigten FS (um 60 %) und insbesondere an C20:5 Eicosapentaensäure EPA (um 50 %) stark erhöht. Zusätzlich wurde bei beiden Algen während der Kultivierung in der MUTL eine starke Erhöhung des Gesamt-Polyphenolgehaltes (antioxidatives Potential) um ca. 200 % bei *Phaeodactylum* und um 40 % bei *Nannochloropsis* festgestellt. Die komplexen Änderungen der Biomasse-Zusammensetzung werden in Absprache mit den anderen Konsortialpartnern in Kombination mit den Ergebnissen der Fütterungsexperimente veröffentlicht werden.

Speziell im Fall von *Phaeodactylum* konnte eine besonders hohe Steigerung des antioxidativen Potentials und des EPA Gehaltes bei der Kultivierung in der MUTL nachgewiesen werden. Unter dem Gesichtspunkt könnte die MUTL Technologie bevorzugt zur Generierung von Algenbiomasse mit einem hohen neutrazeutischen Potential für Lebensmittel, Futtermittel und kosmetische Rohstoffe genutzt werden. Diesen Vorteilen steht auch eine Reihe von Nachteilen gegenüber, die sich in der Praxis negativ auf die ökonomische Nutzung der Technologie auswirken. Zu den Nachteilen gehört der erhöhte Stromverbrauch der Pumpe um die Tropfenerzeugung an den Düsen zu gewährleisten, die dadurch stark erhöhte mechanische Belastung der Algen, die Immobilisierungen der Biomasse und den damit stark erhöhten Reinigungsaufwand der Prototypanlage. Eine Übersicht der wichtigsten Parameter für den technologischen Vergleich der PBR Systeme ist in Tabelle 2 gegeben.

Tabelle 2: Technologischer Vergleich der beiden Photobioreaktorsysteme

	Röhren PBR	Prototyp MUTL
Biomasse Produktion	Referenz	signifikant höher
Systemdruck in der Zirkulation	gering (0.25 bar)	hoch (2 bar)
Potentieller mechanischer Stress durch Pumpen und Zirkulation	gering (pumping)	hoch (Pumpen und Verteilung in Düsen)
Stromverbrauch durch Pumpe	gering	mittel bis hoch
Immobilisierungen der Biomasse	gering bis mittel	mittel
Reinigungsaufwand	gering	mittel

Die Abbildung 6 zeigt exemplarische Photographien der Immobilisierung der *Phaeodactylum*-Biomasse innerhalb der MUTL an den Seitenwänden und an der Netzmatrix. Zusätzlich kommt es zu Immobilisationen der Algen am Boden des Reaktors. Diese Immobilisationen erhöhen den Reinigungsaufwand der Anlage signifikant.



Abbildung 6: Immobilisation von *Phaeodactylum t.* innerhalb der MUTL.

Nach Abwägen der Unterschiede zwischen den generierten Biomassen und der PBR Systeme kann die MUTL Technologie je nach Alge und angestrebtem Produkt einen ökonomischen Vorteil gegenüber der klassischen Systeme erbringen. Dies gilt insbesondere, wenn die Immobilisation der Biomassen im Reaktor weiter unterbunden werden könnte.

Das **AP4 „Project Management und Verwertung“** wird von allen Partnern bearbeitet. Ziele sind die Sicherstellung von effizientem Projektmanagement mit einer guten Interaktion zwischen den Projektpartnern innerhalb der APs und die Sicherstellung der Kommunikation mit potentiellen Anwendern, Wissenschaftlern und der Öffentlichkeit mit Fokus auf die Möglichkeiten und die Nachhaltigkeit von mikrobieller Biomasse als Fischfutter in Aquakulturen. Ergebnisse der Verwertungsstrategie des ILU sind im gesonderten Abschnitt 7 in Tabelle 3 aufgeführt.

3. Darstellung und Erläuterung der Angemessenheit von Aufwand und Zeit

Die geleisteten Arbeiten waren für die Erfüllung der Planung und der Durchführung des Vorhabens notwendig und angemessen.

4. Aufführen von Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Während der Projektlaufzeit wurden Herausforderungen identifiziert, Methoden kritisch hinterfragt und Ideen verfolgt, die insgesamt zu Erkenntnissen und Lerneffekten geführt haben. Es gab dabei keine Arbeiten, die zu keiner Lösung beigetragen haben.

5. Darstellung und Erläuterung der wissenschaftlichen und ggf. wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche nächste Phase.

Die gewonnenen Ergebnisse des Projektes MICRO-Feed weisen eine hohe wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit auf. Auf wissenschaftlicher Seite sollten in Zukunft die beschriebene Heterogenität innerhalb der Zellpopulation und das im Projekt entdeckte Aufsplitten in verschiedenen produktive Lipidproduzenten näher untersucht werden. Hier sind insbesondere Fragen zu Einflüssen auf Produktausbeute und Qualität durch die verschiedenen produktiven Zellpopulationen zu klären. Dies bedarf neuer Analysetechnologien und eine stark interdisziplinäre Herangehensweise. Das Verständnis der Gründe für diese Phänomene, ermöglicht eine bessere Prozesskontrolle und wird in Zukunft die Produktausbeute und Qualität steigern. Auf der anderen Seite sollte das Wachstum der Algen im MUTL Prototyp-Photobioreaktor und die Effekte auf die Zellphysiologie und Zusammensetzung weiter untersucht werden. Auch wirtschaftlich sind die Projektergebnisse von großem Wert. Die bessere Produktivität und die veränderte Zusammensetzung der Biomasse in dem alternativen Photobioreaktor zeigt das Potenzial durch neue Kultivierungstechnologien im Generellen und damit auf die Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Ergebnisse aus anderen Forschungsprojekten zur Evaluation der Leistungsfähigkeit der MUTL-Technologie sollte die Kommerzialisierung der aussichtsreichen Technik weiter von den Patenthaltern (vornehmlich IGV GmbH, Nuthetal, Deutschland) vorangetrieben werden. Im Moment existieren hier nach aktuellem Wissensstand insgesamt vier Pilot-Anlagen, die für F&E Zwecke genutzt werden. Alternativ dazu sollten auch andere Dünnschichtsysteme wie die FPA Technologie der Firma Subitec (Stuttgart, Deutschland) in Zukunft mit in die Evaluationen einbezogen werden, da hier bereits ein vermarktungsfähiges und leistungsfähiges Produkt besteht. Außerdem sollte aus wirtschaftlicher Seite auch eine mögliche Innenproduktion unter reproduzierbaren Bedingungen und mit kostengünstigen LED Beleuchtungsmodulen in Betracht gezogen werden.

6. War der Einsatz der Bundesmittel für die Erreichung des geplanten Vorhabens ursächlich oder wäre dieses Ziel auch ohne Bundesmittel erreicht worden (einschließlich Bewertung eventueller Mitnahmeeffekte)?

Der Einsatz von Bundesmitteln war für die Durchführung des Vorhabens ursächlich. Da das ILU selber nicht über ausreichende Mittel verfügt und keine anderen Mittelgeber für ein

entsprechendes Vorhaben zur Verfügung standen, wäre das Ziel ohne Bundesmittel nicht erreicht worden.

7. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer – z.B. Anwenderkonferenzen und Darstellung der erfolgten und geplanten Veröffentlichungen.

Darstellung der erfolgten Veröffentlichungen des ILU innerhalb des Projektes Mikro-feed sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3. Bisher durchgeführte Transfermaßnahmen des ILU innerhalb des Projektes

Transfermaßnahmen der Forschungsstelle	Zeitpunkt
<ul style="list-style-type: none"> • Durchgeführte Publikation der Ergebnisse wissenschaftlichen Fachzeitschriften bzw. Branchenzeitschriften: • Chemie Ingenieur Technik • Analytical Bioanalytical Chemistry • Scientific Reports 	<ul style="list-style-type: none"> • 09/2016 • 04/2017 • 04/2018
<ul style="list-style-type: none"> • Einstellung der Projektinformationen auf der ILU-Website 	<ul style="list-style-type: none"> • 09/2015
<ul style="list-style-type: none"> • Einbeziehung der Projektinformationen in den ILU-Jahresbericht 	<ul style="list-style-type: none"> • 2015/2016 • 2016/2017 • 2017/2018
<ul style="list-style-type: none"> • Vorstellung der Ergebnisse (durch Vorträge/ Posterpräsentationen) auf folgenden Veranstaltungen: • Algae Biomass Summit 2015 (Washington, DC, USA) • Single Molecule & Single Cell Analysis Summit (Madrid, Spanien) • Bundesalgenstammtisch 2016 (Jülich, Deutschland) • ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2016 (Aachen, Deutschland) • Algae Biomass Summit 2016 (Phoenix, Arizona, USA) • Algae Biomass Summit 2017 (Salt Lake City, UT, USA) • 10. Bundesalgenstammtisch (Merseburg, Deutschland) • 4th European Conference on Process Analytics and Control Technology (EUROPACT 2017) (Potsdam, Deutschland) • 6th Congress of the International Society for Applied Phycology, (Nantes, Frankreich) 	<ul style="list-style-type: none"> • 09/2015 • 03/2016 • 09/2016 • 09/2016 • 10/2016 • 10/2017 • 09/2017 • 05/2017 • 06/2017

Innerhalb der Projektlaufzeit wurden zu den erzielten Ergebnissen innerhalb des Projektes Microfeed zahlreiche Präsentationen auf nationalen und internationalen Konferenzen durchgeführt. Zu den Präsentationen gehörten unter anderem Vorträge auf den jeweils größten und einflussreichsten Konferenzen der Welt (Algae Biomass Summit 2017), in Europa (6th Congress of the International Society for Applied Phycology) und in Deutschland (10. Bundesalgenstammtisch). Die Präsentationen stießen vielfach auf sehr positive Resonanz und regten zu konstruktiven Diskussionen über die nachhaltige Nutzung von Algen als DHA und

EPA Quelle für Lebensmittel und Futtermittel an. Erste Ergebnisse wurden bisher in renommierten Fachzeitschriften, wie dem Journal „Analytical Bioanalytical Chemistry“ und „Scientific Reports“ veröffentlicht. Aufgrund des großen Erfolges des Projektes werden hier in Absprache mit dem Gesamtkonsortium noch weitere Veröffentlichungen erarbeitet werden.