BMD
LIFE SCIENCES AGENTUR SACHSEN-ANHALT

Innovationsforum Algaestream
Jena, 12. September 2013

Technologie des Downstream Processing zur Gewinnung von Wert- und Wirkstoffen aus Mikroalgen

Dr. Werner Stuber, BMD GmbH – Life Sciences Agentur Sachsen-Anhalt

Agenda

- Einleitung
- Exkurs - Integration von Mikroalgen
- Wirtschaftliche Nutzung von Mikroalgen
- Downstream Processing
  - Überblick Trenntechniken
  - Abtrennung von Zellen
  - Zellaufschluss
  - Isolierung von Zielprodukten
- Entwurf für ein komplexes Aufarbeitungsschema

Einleitung

- 2010 im Rahmen des Clusters Life Sciences Mitteldeutschland Etablierung einer Projektgruppe „Algenbiotechnologie in Mitteldeutschland“
- Partner: HS Anhalt, Gicon GmbH, Salata GmbH, Universität Leipzig, BMD
- Koordinierung der Gruppe durch die BMD GmbH
- Langfristiges Ziel des Projektes: Aufbau eines „Mitteldeutschen Algenzentrums“ in Köthen
- 2011 im Auftrag des Clusters Erarbeitung einer Studie zu den Marktpotenzialen von Mikroalgen durch Genius GmbH unter Mitwirkung der Partner
- 2012 Fortführung der Clusteraktivitäten durch medways e.V. und Beantragung eines Innovationsforums zur Algenbiotechnologie
- 2013 in Vorbereitung des Innovationsforums Erarbeitung einer Literaturstudie zum Downstream Processing (Auftrag an BMD)

Ziele der Studie

BMD
LIFE SCIENCES AGENTUR SACHSEN-ANHALT

Inhaltliche Schwerpunkte der Projektgruppe „Algenbiotechnologie in Mitteldeutschland“

- Auswahl relevanter Algenspezies
  - Vergleich von bekannten Algen auf wirtschaftliche Relevanz und Verwertbarkeit
  - Screening auf nutzbare extrazelluläre Produkte bei Algen
  - Suche nach Algen mit möglichst hohem Ölgehalt (Biodieselproduktion)
- Entwicklung von Methoden zur effizienten Gewinnung von intrazellulären Inhaltsstoffen
  - Auswahl von Aufarbeitungsschritten (in Abhängigkeit von Alge und Produkt)
  - Entwicklung neuartiger Abtrennungstechnologien zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit

Vorarbeit dafür: Studie zu aktuellen Entwicklungen im Downstream Processing

In der Algenbiotechnologie

Exkurs: Integration von Mikroalgen

BMD
LIFE SCIENCES AGENTUR SACHSEN-ANHALT

- Grundlage: Posten und Walter 2013, „Microalgae Biotechnology: Integration an Bioeconomy“
- Ziel: nachhaltige und ökonomisch lebensfähige Nutzung des Potenzials von Algen
- Voraussetzung: Integration der Algen in technische Prozesse, in die Umwelt und in die Gesellschaft
- Lösungen nicht durch einzelne Technologien, sondern nur durch das Zusammenwirken unterschiedlicher Bereiche der Biologie und der Ingenieurwissenschaften unter Einbeziehung der Sozial- und Kulturwissenschaften
- Integration auf verschiedenen Ebenen

Exkurs: Integration von Mikroalgen

BMD
LIFE SCIENCES AGENTUR SACHSEN-ANHALT

- Integration auf dem Prozess-Level
  - Abschätzung eines „window of operation“
  - Integration einzelner Prozessschritte ineinander (in-situ-Produktabtrennung
- Integration auf dem metabolischen Level
  - Konzept des Crossfeeding (Bildung von Primär- und Sekundärprodukten)
  - Genetische Integration autotropher und heterotropher Stoffwechselschritte
- Integration in die Umweltbedingungen
  - Optimierung des Wasserverbrauchs
  - Notwendigkeit der (zusätzlichen) Energieversorgung für die Algenproduktion
- Anpassung am kulturelle Gegebenheiten
  - Akzeptanz des Einsatzes von Algen in der Lebensmittelproduktion
  - Verwendung von Algen in der „Grünen Chemie“ durch genetische Modifizierung

Wirtschaftliche Nutzung von Mikroalgen

BMD
LIFE SCIENCES AGENTUR SACHSEN-ANHALT

- Verwertung der gesamten Biomasse:
  - Energie aus Algenbiomasse (Biogas),
  - hochwertige Nahrungsmittel oder Futter- und Lebensmittelzusatzstoffe,
- Gewinnung hochwertiger Zielprodukte:
  - Carotinoide und andere Farbpigmente,
  - essentielle Fettsäuren, Aminosäuren und Vitamine,
  - Enzyme und andere Proteine,
  - antibiotisch, antiviral und andere pharmakologisch wirksame Stoffe,
- andere energetische Nutzung:
  - CO_2-Fixierung und Recycling (in Biogasanlagen und Kraftwerken),
  - H_2-Produktion
  - N_2-Fixierung (NH_4^+-Produktion)

aus Griehl et al., TERM-Studie

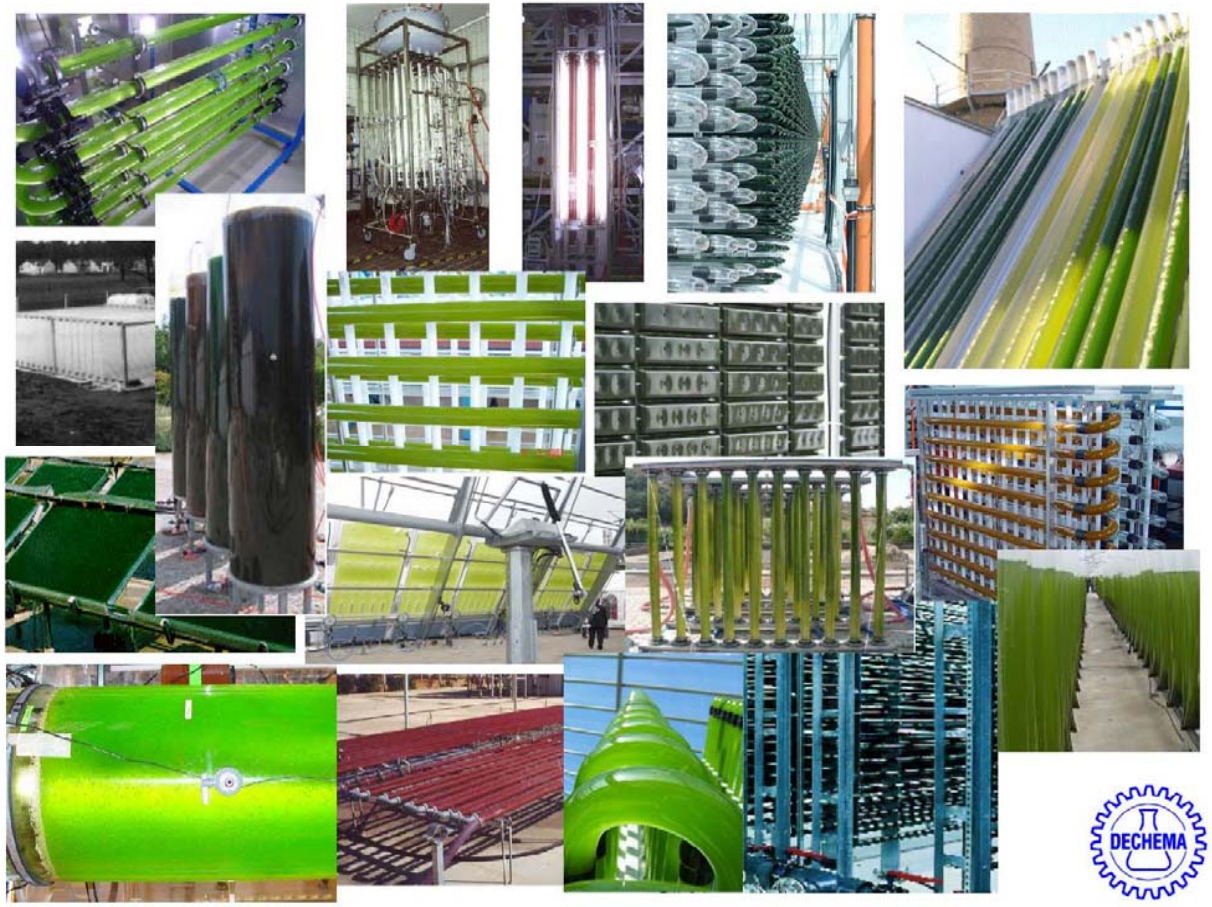
Downstream Processing - Mögliche Ansatzpunkte

BMD
LIFE SCIENCES AGENTUR SACHSEN-ANHALT

	Prozesskette	Ungelöste Engpässe
1.	Auswahl Algenspezies	Vergleich von bekannten Algenspezies auf wirtschaftliche Relevanz/Verwertbarkeit
	Produkte	Welche extra- und intrazellulären Produkte sind nutzbar? Suche nach Algen mit max. Ölgehalt (Relevanz für Biofuel- Produktion), Züchtung
2.	Ernte	effiziente Erntetechnologie
3.	Abtrennung der Biomasse	Effizienzsteigerung / Verbesserung der Wirtschaftlichkeit von derzeit bekannten Abtrennungstechnologien Verbesserung der Filtrationstechnologie (in Abhängigkeit von der Algenspezies) Vergleichsanalyse von Technologien (magnetische Separation, Filtration, Zentrifugierung)
4.	Aufschluss der Zellwand	Vergleich von Aufschlussverfahren für verschiedene Algenspezies und für verschiedene Zielsubstrate • mechanisch (Kugelmühlen, Ultraschall, Gefriertrockung + Mahlen) • physikochemisch (osmot. Schock) • chemisch (Laugung) • biologisch (enzymatisch)
5.	Isolierung des Zielsubstrates aus dem Zellbrei (Slurry)	Wirtschaftlichkeits- und Effizienzvergleich • Trennung nach Größe • polar/unipolar • nach Aufreinigungsziel der Zellprodukte

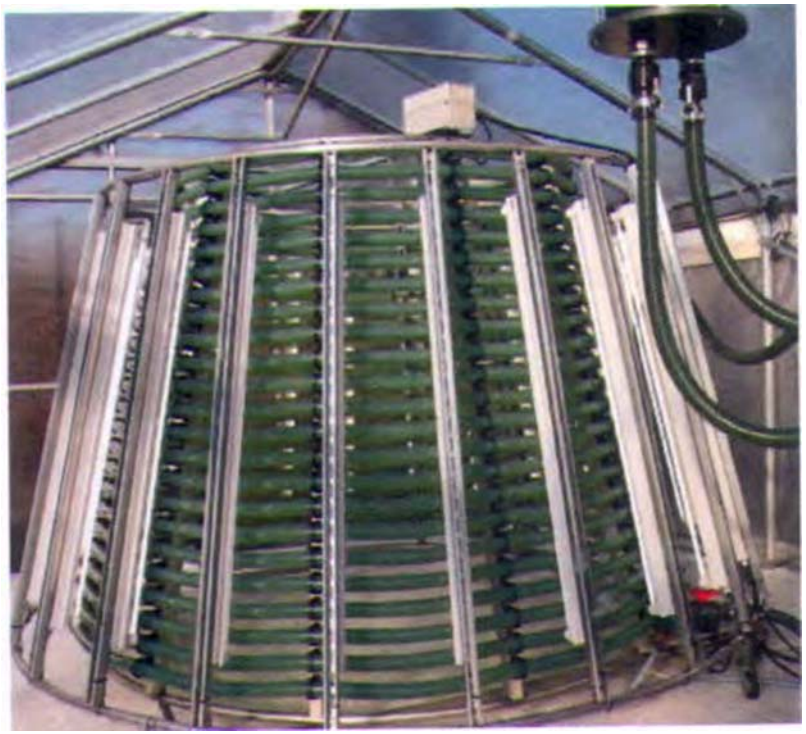
Photobioreaktoren - Auswahl

BMD
LIFE SCIENCES AGENTUR SACHSEN-ANHALT



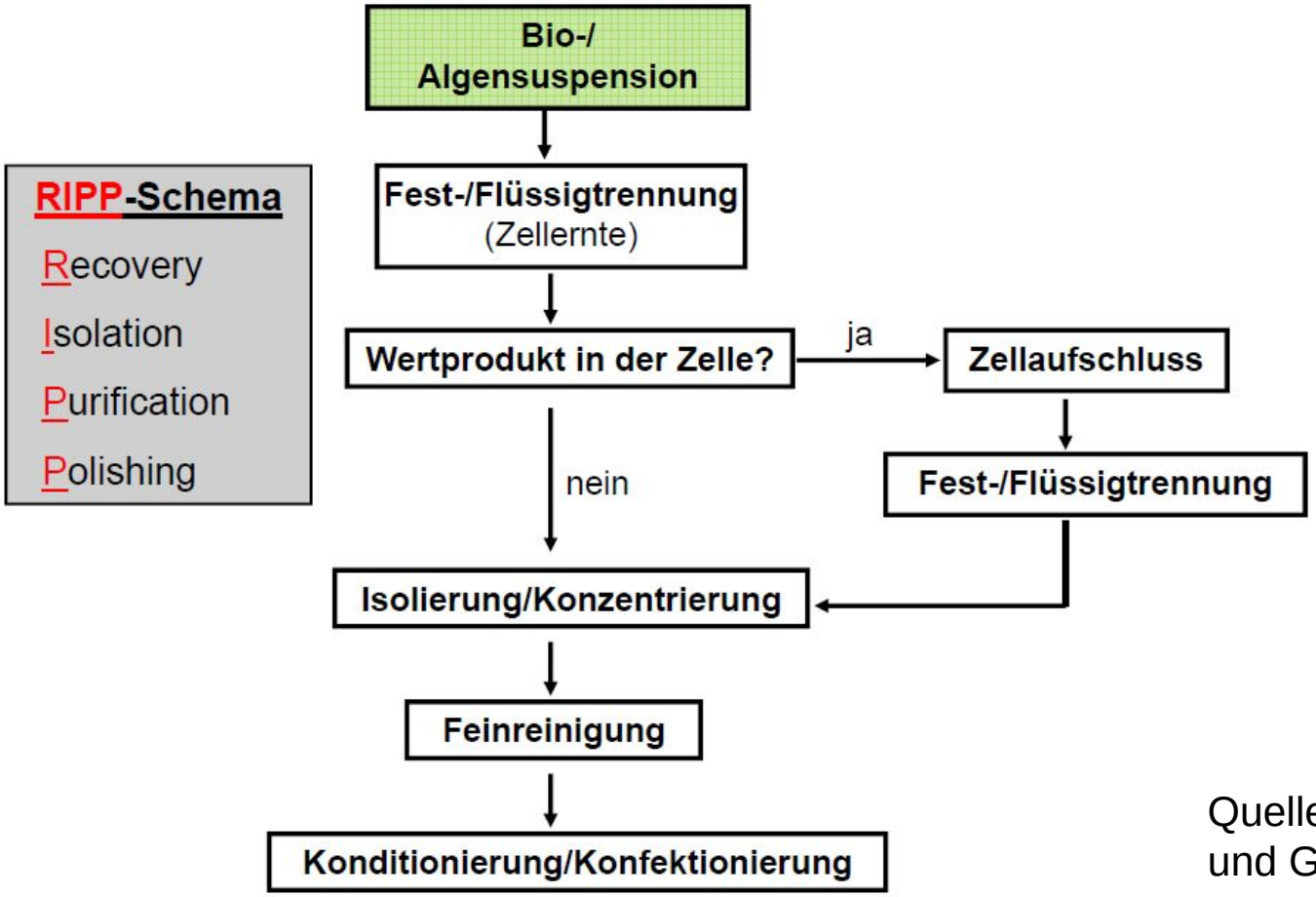
Photobioreaktoren Beispiele

Röhrenreaktor der Fa. Roquette, Klötze



Tubularreaktor der Gicon GmbH an der HS Anhalt in Köthen

Prinzipieller Aufbau des Downstream Processing



Quelle: Meusel und Griehl

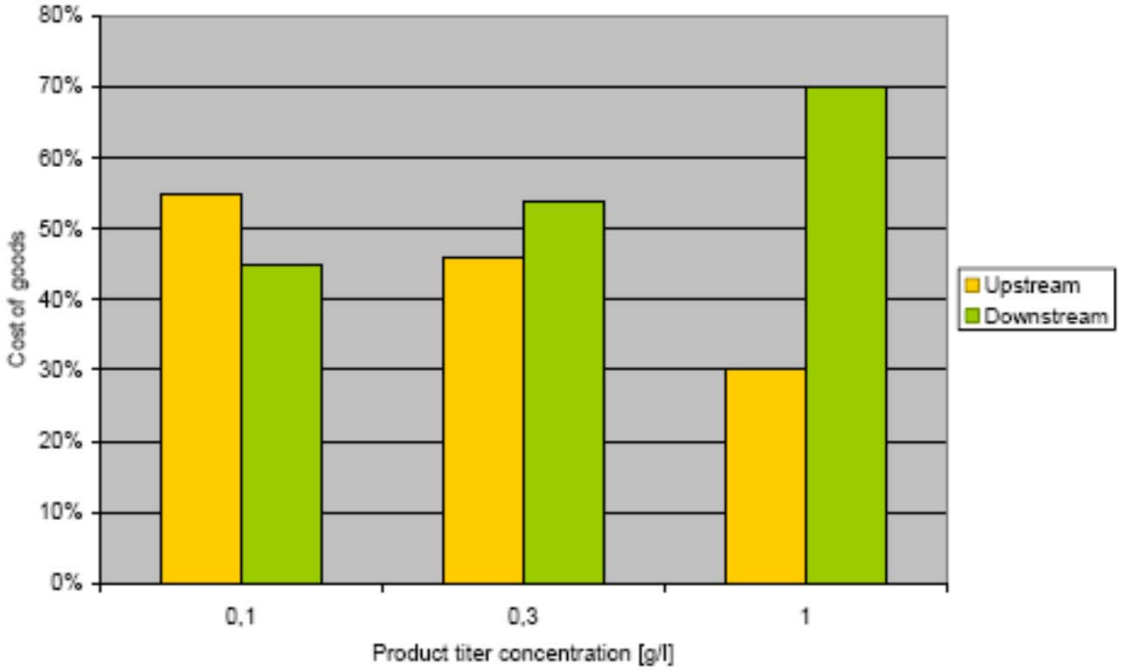
Trennoperationen mit besonderem Innovationspotenzial

BMD
LIFE SCIENCES AGENTUR SACHSEN-ANHALT

		Extraktion	Adsorption	Filtration	Kristallisation	Membran-technik	Chromato-graphie	bioreaktive Verfahren	Zentrifu-gation	Prozesssynth./ Simulation
Heteropoly-saccharide	Aufbereitung									
	Upstream Processing									
	Downstream Processing									
Bioaktive Proteine und Peptide	Aufbereitung									
	Upstream Processing									
	Downstream Processing									
Triterpene	Aufbereitung									
	Upstream Processing									
	Downstream Processing									
monoklonale Antikörper	Aufbereitung									
	Upstream Processing									
	Downstream Processing									
kurzkettige Aminosäuren	Aufbereitung									
	Upstream Processing									
	Downstream Processing									
Aromastoffe	Aufbereitung									
	Upstream Processing									
	Downstream Processing									

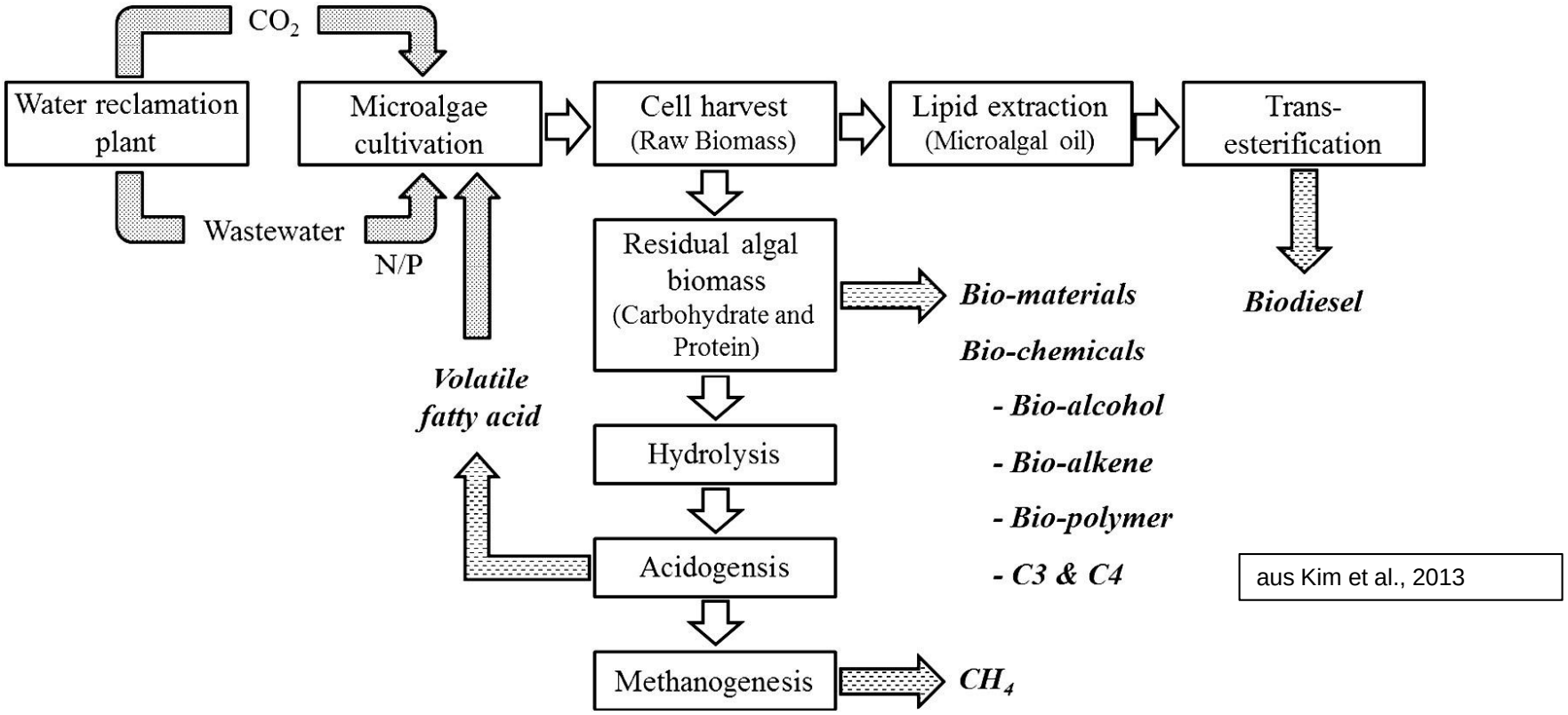
Downstream Processing

- Kostenverteilung zwischen Upstream und Downstream



Kostenverteilung zwischen Upstream und Downstream processing in Abhängigkeit vom Produkttiter (aus „Selektive Trenntechniken“, Diskussionspapier des AK 2008)

Fließschema zum Downstream Processing



aus Kim et al., 2013

Abtrennung von Zellen I

BMD
LIFE SCIENCES AGENTUR SACHSEN-ANHALT

Allgemeine Überlegungen (nach Kim et al., 2013)

- Die Wahl der Erntetechnik hängt von den Eigenschaften der Mikroalge und den Charakteristika der gewünschten Produkte ab
- Die Kombination verschiedener Erntetechniken kann die Schwächen der einzelnen Techniken kompensieren und führt häufig zu synergistischen Effekten im Ernteprozess
- Entwicklung von Prozessen, mit denen eine vollständige Abtrennung der Zellen aus der verdünnten Suspension und ein effektives Wasser- und Nährstoff-recycling erreicht wird, so dass der Ernteprozess nur einen geringen Teil der Gesamtkosten des DSP beiträgt
- Die Einflüsse der gewählten Erntetechnik auf nachfolgende Prozesse, wie die Lipidextraktion, müssen so gering wie möglich gehalten werden
- mehr Studien zu Erntetechniken für marine Mikroalgen

Abtrennung von Zellen II - Flokkulation

BMD
LIFE SCIENCES AGENTUR SACHSEN-ANHALT

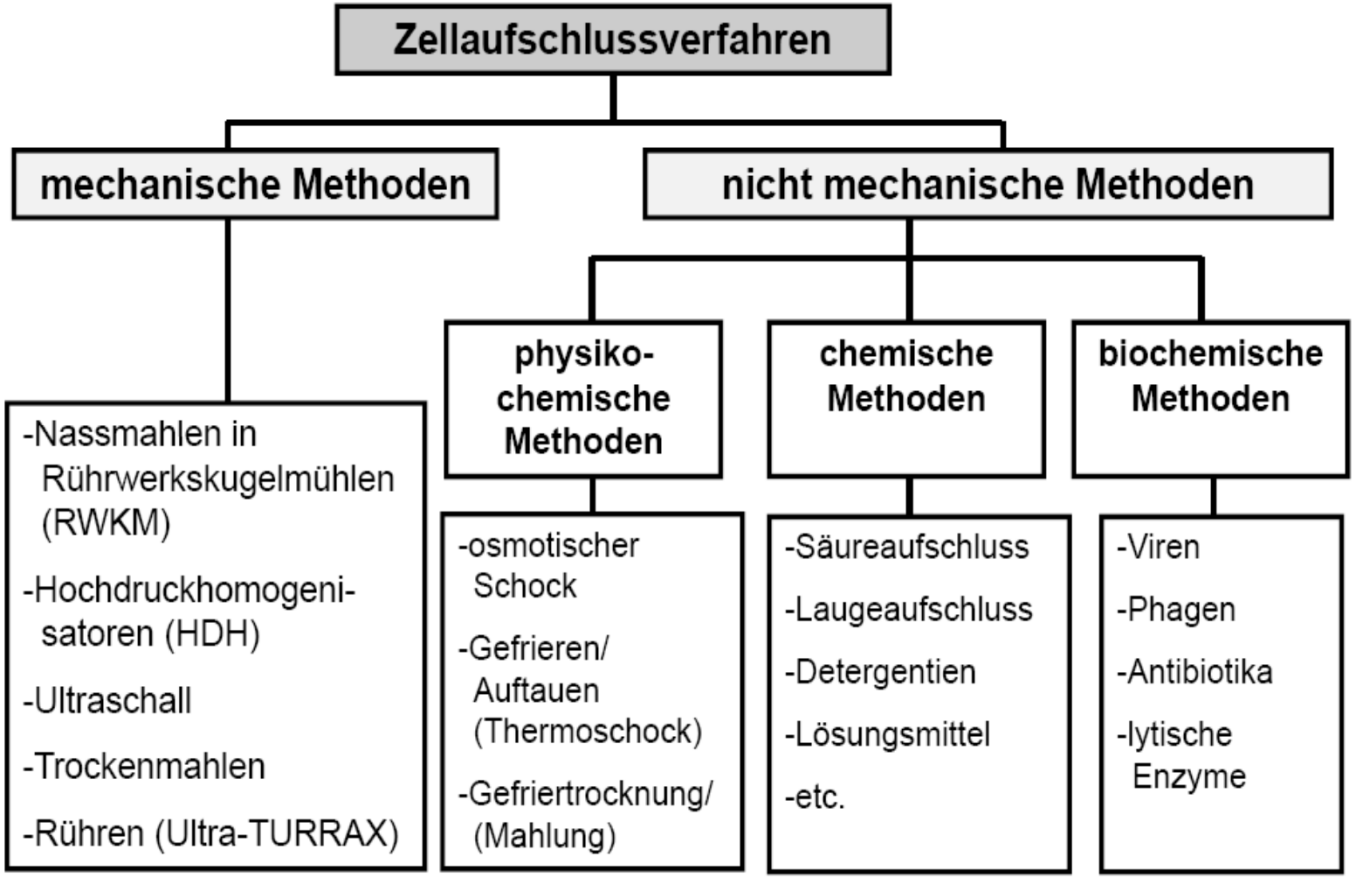
- Bildung von Partikeln mit größerem Durchmesser und höherer Sinkgeschwindigkeit durch Autoflokkulation oder durch Zugabe von Flockungsmitteln

- Ausgewählte Beispiele:
  - Ko-Kultivierung mit filamentösen Pilzen, Wachstum in Pellets
  - Flokkulation mit Poly-Glutaminsäure: Effizienz von 90 %, Konzentrierungsfaktor 20-fach, Keine Lipidverluste
  - Flokkulation durch Chitosan: z.B. 20 mg/l bei Phaeodactylum, →Möglichkeit der Kooperation mit Fa. Medical Chitosan Halle
  - Bioflokkulation durch Veränderung der Zusammensetzung des Mediums, dadurch Induktion der Flockung der Algenzellen untereinander, z.B. Zugabe eines durch Paenibacillus sp. gebildeten Bioflokkulants zur Abtrennung von Chlorella-Zellen aus der Massenkultur

Abtrennung von Zellen - Filtration

- Abtrennung von Partikeln aus einer fluiden Phase mit Hilfe poröser Träger
- Zunehmend Einsatz von Membranfiltration, aber schnelle Verstopfung der Membranen wegen der geringen Zellgröße
- Beispiele
  - dynamic cross flow filtration
    - völlig neuer Aufbau der Filter, dadurch nur ein Filtrationszyklus notwendig,
    - schonende Filtration und geringe Verstopfung
    - Ökonomisch günstiger als tangentiale cross flow filtration
- Immobilisierung
    - Einbettung der Zellen in eine Gelmatrix aus Alginat
    - Größere kugelige Gebilde, einfache Abtrennung durch Siebfiltration

Zellaufschlussverfahren



aus Meusel und Griehl

Zellaufschluss - Ultraschall

- Aufschluss von Zellen durch Erzeugung von hohen Druckunterschieden auf kleinstem Raum (Kavitationen)
- Beispiel
  - Anwendung als „lösungsmittelfreie“ Ultraschall-unterstützte Extraktion von Lipiden aus Mikroalgenzellen
  - Wasser ist Lösungsmittel für wasserlösliche Substanzen, Lipide (Öl) bilden zweite Phase, die leicht abgetrennt werden kann
  - keine zusätzliche Energie zur Phasentrennung und zur Entfernung des Lösungsmittels aus dem Zielprodukt
  - Vergleich zur klassischen Extraktion: ökologischer (keine toxischen Lösungsmittel) und ökonomischer (geringere Kosten durch Energie-ersparnis)
  - Reaktoren von 100 bis 5000 l/h bereits in der chemischen und Lebensmittelindustrie im Einsatz, Testung für Algen

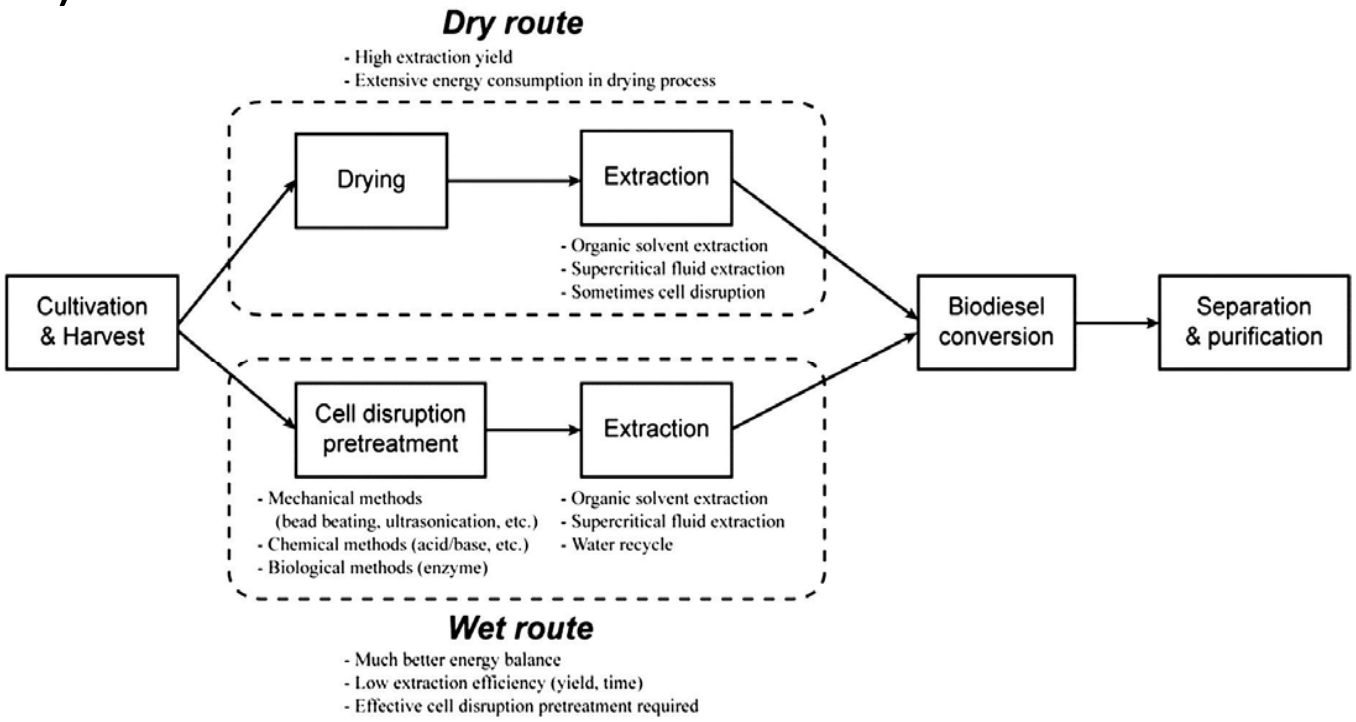
Zellaufschluss II

- Osmotischer Schock: Suspendierung von Zellen in hypertonischer Lösung, Zentrifugation, Resuspendierung in destilliertem Wasser → Platzen der Zellen
  - Direkte Extraktion von Lipiden aus feuchter Biomasse von Chlamydomonas durch drastische Erhöhung der Salinität → Bis zu zweifach höhere Lipidausbeute

- Biochemische Verfahren: schonende und spezifische Lyse von Zellen
  - Einsatz von Enzymen, z.B. Cellulasen, und Enzymgemischen, häufig besser geeignet, weil Zellwände der Mikroalgen aus komplexen Polysacchariden und anderen Polymeren bestehen
  - Herstellungskosten der Enzyme für großtechnischen Einsatz noch zu hoch, Recycling der Enzyme wenig effektiv

Isolierung von Zielprodukten I

- Vergleich von Extraktionsverfahren für Lipide (aus Kim et al., 2013)



Isolierung von Zielprodukten II - Mikrowellen

BMD
LIFE SCIENCES AGENTUR SACHSEN-ANHALT

- Extraktion von Lipiden aus Scenedesmus
  - Erhitzung des Wasser-Algen-Gemisches auf 80 bzw. 95 °C in einem kontinuierlichen Mikrowellensystem für 30 min
  - 77 % des gesamten Öls extrahiert

- Nannochloropsis – direkte Transesterifikation
  - Getrocknete Biomasse suspendiert in Chloroform-Methanol
  - Zusatz eines SrO-Katalysators
  - Behandlung mit Mikrowellen oder Ultraschall
  - Deutlich höhere Ausbeute im Mikrowellenofen

Isolierung von Zielprodukten III

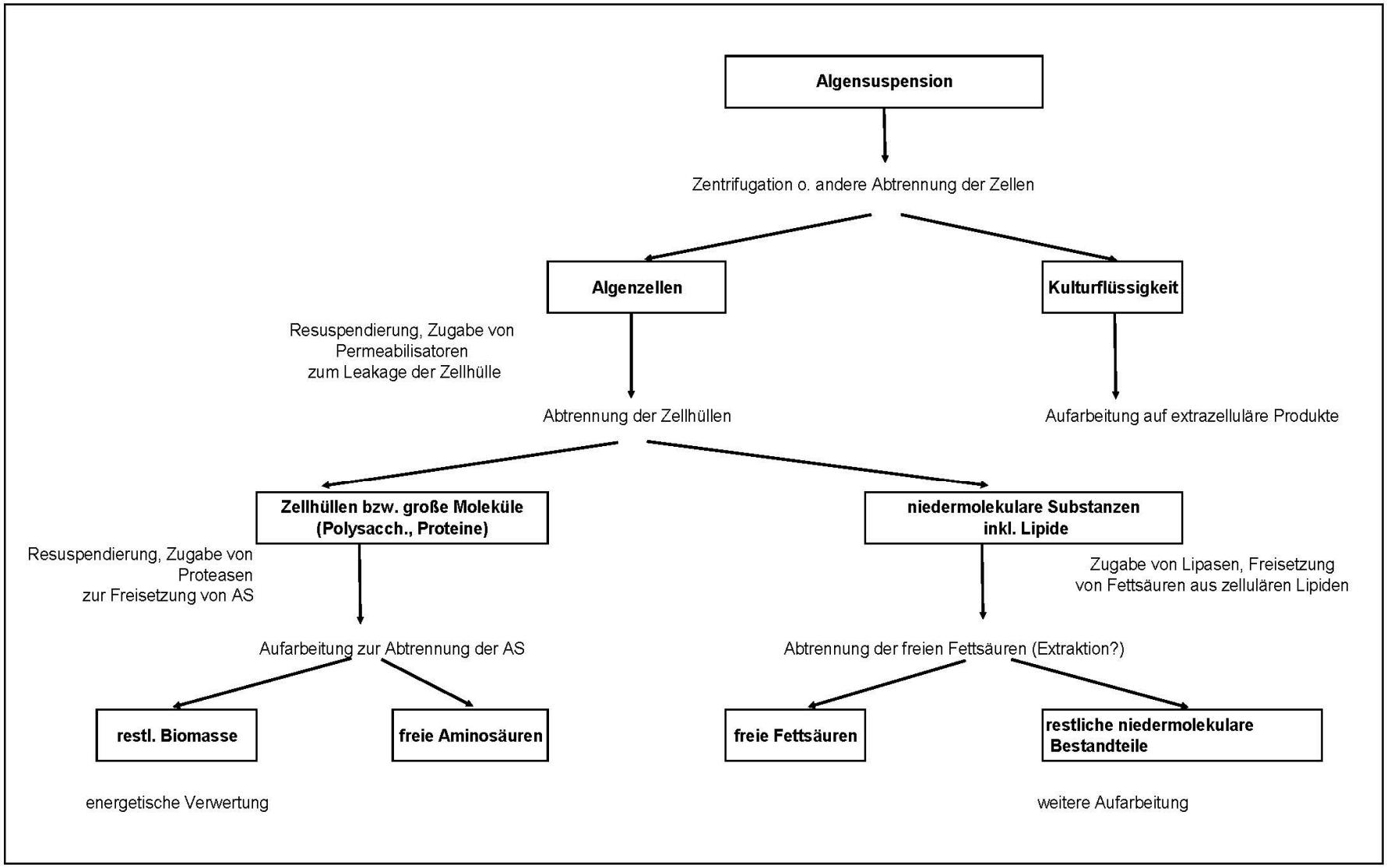
BMD
LIFE SCIENCES AGENTUR SACHSEN-ANHALT

- Milking: direkte Gewinnung der Zielsubstanz aus den lebenden Zellen ohne Ernte und Abtötung der Zellen
  - Zwei-Phasen-Reaktor: Kultivierung der Mikroalgen in wässriger Phase, darüber organische Phase
  - Extraktion der extrazellulären Substanzen in die organische Phase

- Fraktionierung im Zwei-Phasen-System (US-Patent)
  - Zur Permeabilitäts-Konditionierung Suspendierung der Biomasse in wasser-basiertem polarem Lsm. Durchmischung mit mind. einem nichtpolaren Lsm.
  - Nach Phasentrennung Anreicherung der Biomasse in der polaren Phase und Lösung der nichtpolaren Substanzen in der nichtpolaren Phase
  - Keine Aussage zur Vitalität der Zellen nach der Fraktionierung

Isolierung von Zielprodukten IV

- Elektrofiltration (entwickelt von Prof. Posten und Mitarbeitern)
  - Kombination von Membranfiltration und Elektropherese zur Isolierung von Biopolymeren
  - Anlegen eines elektrischen Feldes an eine normale Filterkammer parallel zur Filtrationsrichtung
  - geladene Biopolymere wandern zu der Elektrode, die der Membran gegenüberliegt
  - Dicke des Filterkuchens auf der Filtrationsmembran wird verringert
  - Geringe Scherkraft , deshalb schonendes Verfahren


Algensuspension
Zentrifugation o. andere Abtrennung der Zellen
Algenzellen
Kulturflüssigkeit
Resuspendierung, Zugabe von Permeabilisatoren zum Leakage der Zellhülle
Abtrennung der Zellhüllen
Aufarbeitung auf extrazelluläre Produkte
Zellhüllen bzw. große Moleküle (Polysacch., Proteine)
niedermolekulare Substanzen inkl. Lipide
Resuspendierung, Zugabe von Proteasen zur Freisetzung von AS
Zugabe von Lipasen, Freisetzung von Fettsäuren aus zellulären Lipiden
Aufarbeitung zur Abtrennung der AS
Abtrennung der freien Fettsäuren (Extraktion?)
restl. Biomasse
freie Aminosäuren
freie Fettsäuren
restliche niedermolekulare Bestandteile
energetische Verwertung
weitere Aufarbeitung

Danksagung

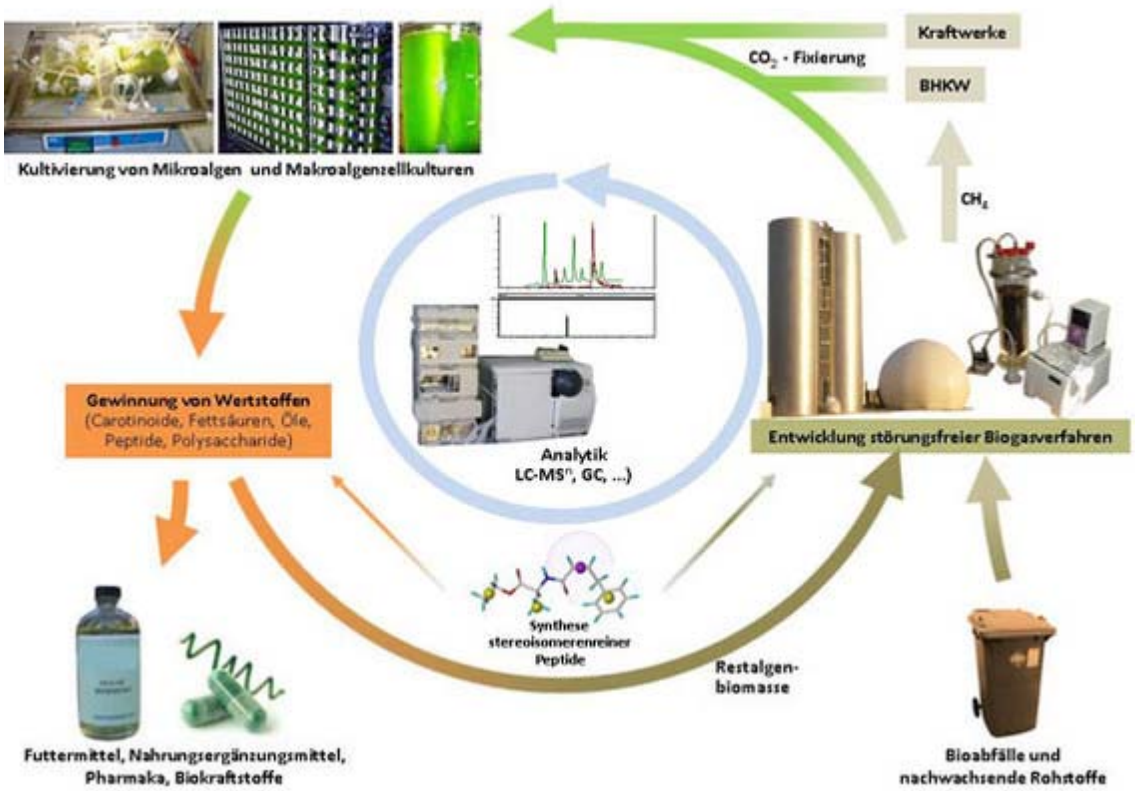
BMD
LIFE SCIENCES AGENTUR SACHSEN-ANHALT

- Mitglieder der Projektgruppe „Algenbiotechnologie in Mitteldeutschland“
  - Frau Prof. Griehl, Herr Dr. Ecke, HS-Anhalt
  - Herr Dr. Cotta, Gicon GmbH
  - Frau Dr. Grewe, Salata GmbH
  - Herr Prof. Wilhelm, Universität Leipzig
  - Herr Prof. Posten, KIT Karlsruhe
- Herr Wiechmann, medways e.V.

- Herr Dr. Freitag, Frau Ballin, Genius GmbH

Innovationslabor Algenbiotechnologie an der HS Anhalt

BMD
LIFE SCIENCES AGENTUR SACHSEN-ANHALT



Dr. Werner Stuber, BMD GmbH – Life Sciences Agentur Sachsen-Anhalt

Biofilmreaktor an der Universität Leipzig,
Prof. Wilhelm