



UNIVERSITY  
OF APPLIED SCIENCES  
UPPER AUSTRIA

MCI<sup>®</sup>  
MANAGEMENT CENTER  
INNSBRUCK

*(co)-Operation SKD*  
*Kooperation zum Kompetenzaufbau*  
*Hochwertige Produkte aus*  
*Algen“ – Screening, Kultivierung,*  
*Downstreaming*

**Heidi Füssl-Le, Bettina Rainer, Sebastian Perkams, Heike Kahr,  
Benjamin Hupfauf, Paul Kuttner, Klaus Krennhuber,  
Christoph Griesbeck, Alexander Jäger**

# Projektziele

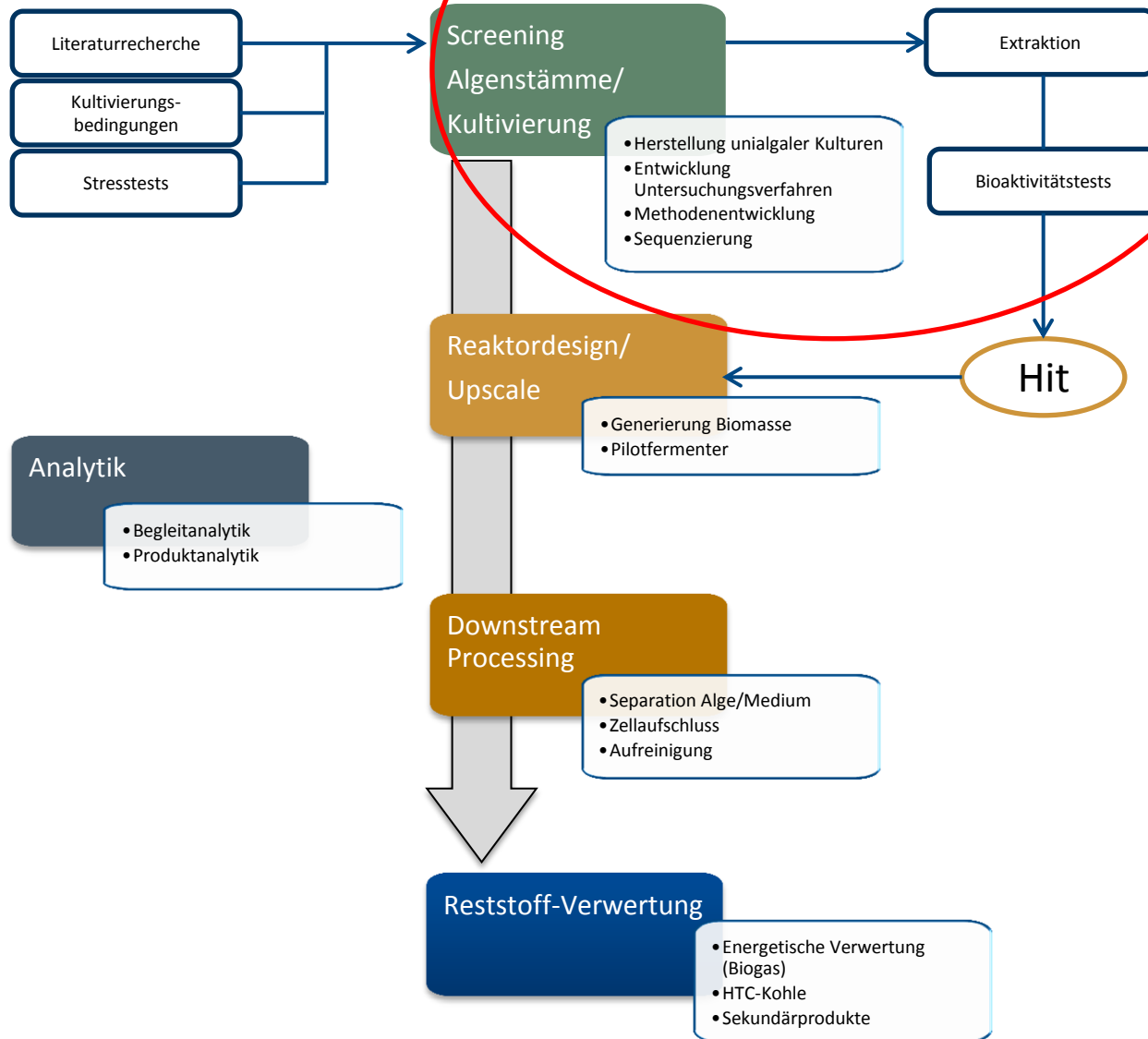
**Ziel des Projektes ist die Etablierung eines ökonomischen Gesamtprozesses zur Produktion von werthaltigen Produkten aus phototrophen Mikroorganismen (Algen, Mikroalgen) und die anschließende energetische Verwertung der Biomasse.**

**Dafür werden bestehende F&E- Strukturen im Bereich der Studiengänge Biotechnologie und Umwelt-, Verfahrens- und Energietechnik (MCI) bzw. Bio- und Umwelt- Verfahrens- und Material und Kunststofftechnik (FH OÖ) aufgebaut, weiterentwickelt und verknüpft, sowie die analytische Expertise des Austrian Drug Screening Institutes (ADSI) in das Konsortium eingebracht werden.**

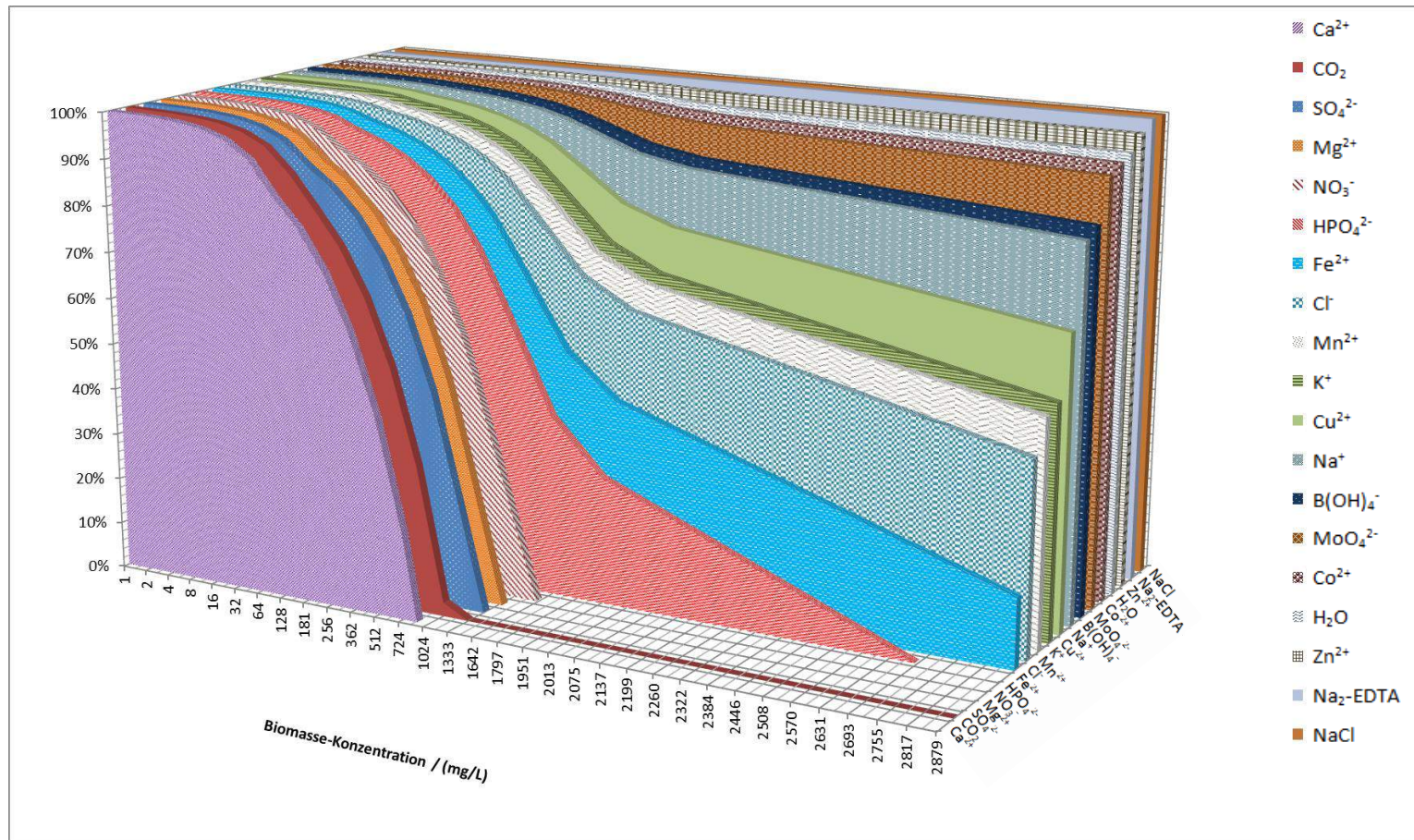
**Die Entwicklung der einzelnen Prozessschritte und der Kompetenzaufbau für die Betrachtung des Gesamtprozesses stehen im Vordergrund, um für potentielle Firmenpartner aus den Bereichen der Pharma-, Kosmetik- und Lebensmittelindustrie zielgerichtete Dienstleistungen anbieten zu können.**

# Arbeitspakete

**Screening & Kultivierung**  
**Reaktorentwicklung & Upscale**  
**Downstream Processing**  
**Analytik**  
**Molekularbiologie**

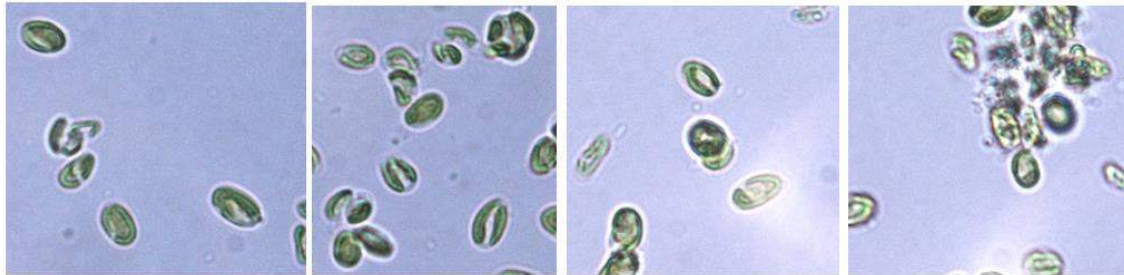


# Untersuchungen Nährstoffbedarf verschiedenster Mikroalgen

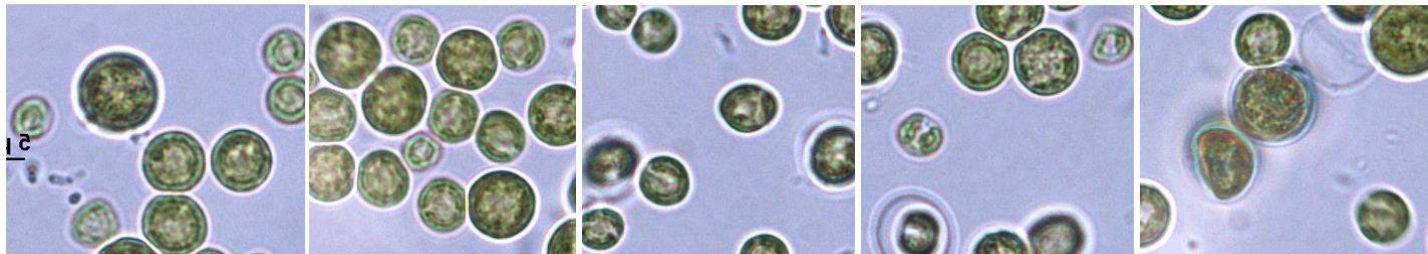


# pH-Werte und Erhalt der Zellstruktur

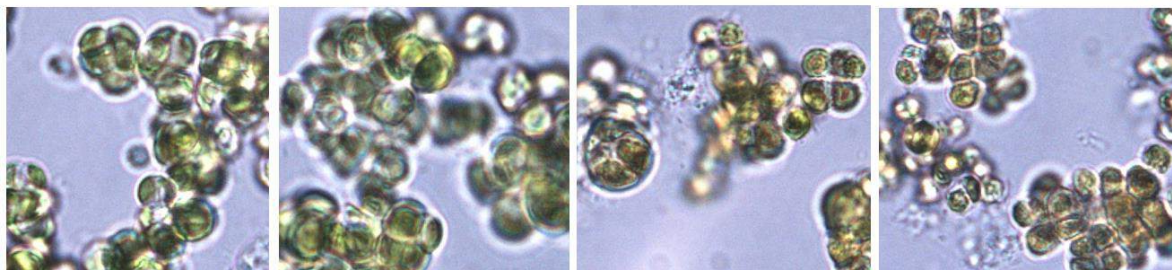
- T3: pH 7,5 ..... 4 ..... 3 ..... 2



- V46: pH 8,6 ..... 6 ..... 4 ..... 3 ..... 2



- V224: pH 6 ..... 4 ..... 2,5 ..... 2



Kultivierung von Mikroalgen



Extraktion mit verschiedenen  
Extraktionsmitteln (polar – apolar)



Screening

- Produkte → DC
- Bioaktivität → Assays



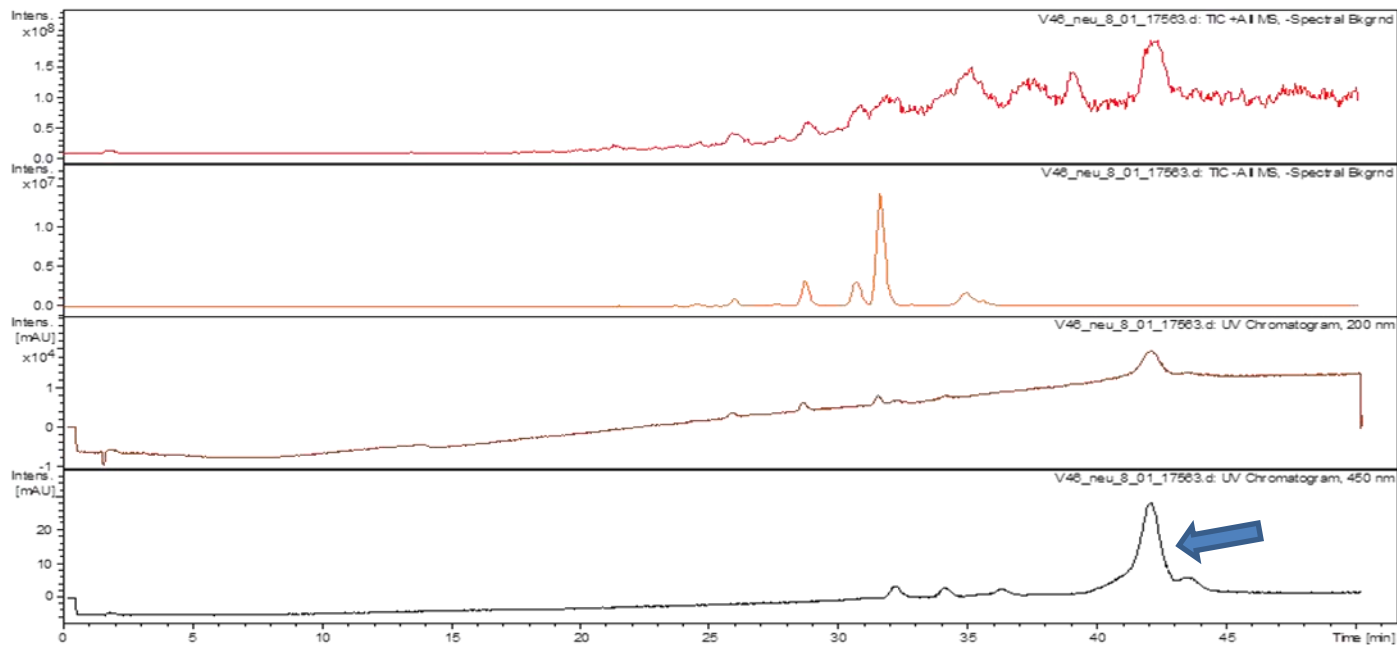
Isolierung, Charakterisierung,  
Strukturaufklärung

## Bspl. Canthaxanthin

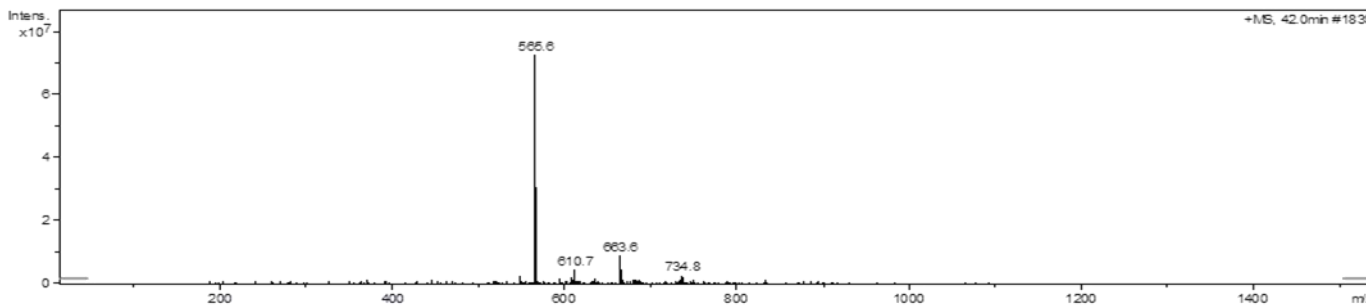
- Sekundäre Pflanzenstoffe, Farbstoff der Pflanze
- Eingesetzt vorwiegend in der Lebensmittelindustrie als roter Farbstoff  
→synthetisch hergestellt
- UV absorbierend
- Zusatz in Selbstbräunungscremen



**(MCI 31)**



**R<sub>t</sub>**      41,7 min  
**λ<sub>max</sub>** = 470 nm  
**M+H**      565 g/mol

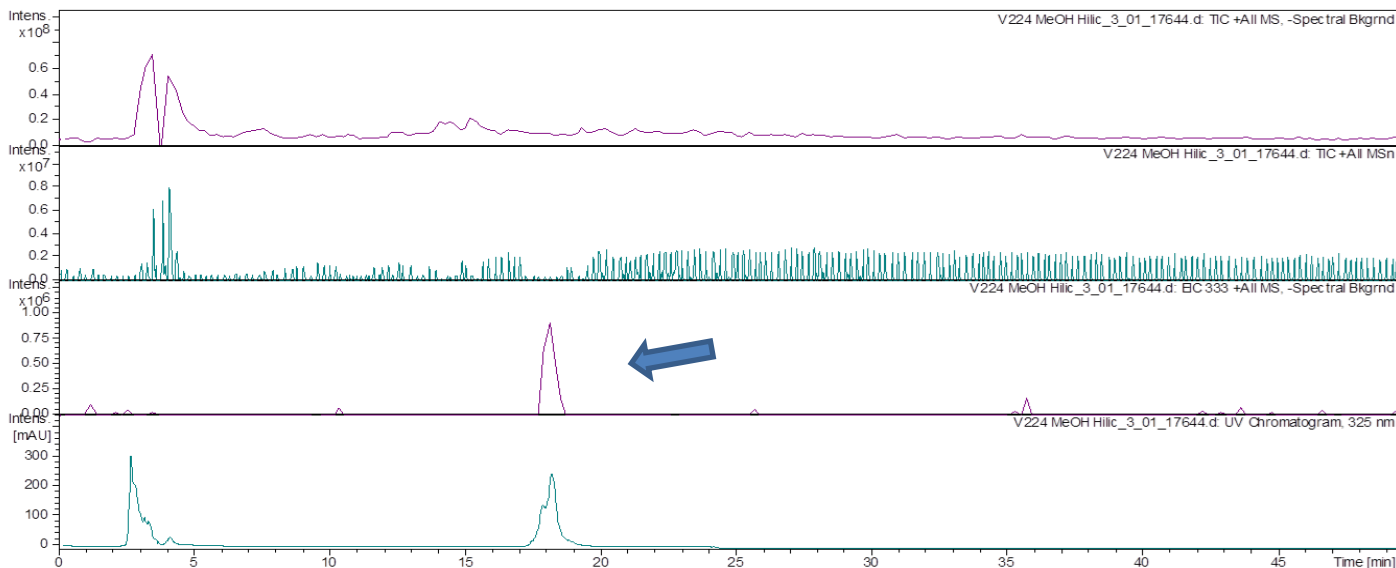


Daten aus BA Stefan Stuppner

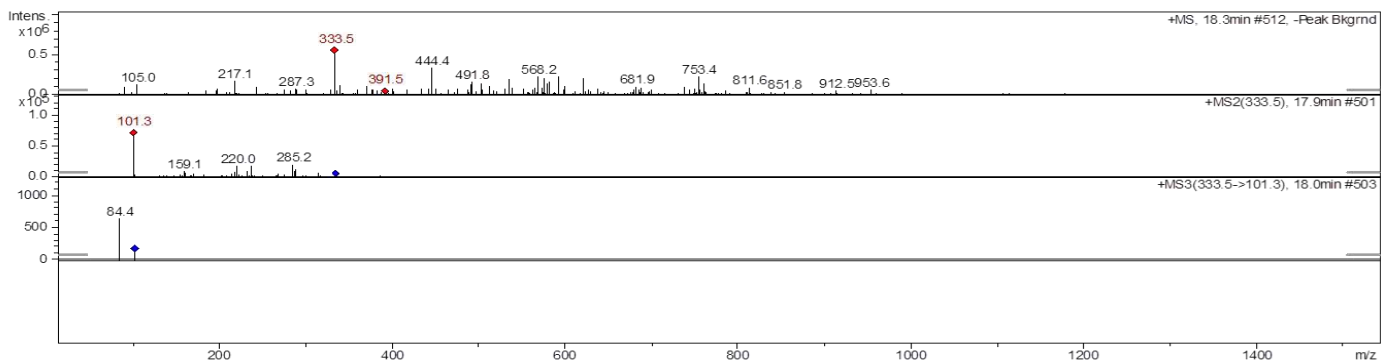
## Bspl. Mycosporin like amino acids (MAAs)

- Wasserlösliche, niedermolekulare Sekundärmetabolite (>400Da)
- Struktur:  
Cyclohexenon oder Cyclohexenimin  
mit variierenden Seitenketten
- Funktion:
  - UV absorbierend (310-340nm)
  - Antioxidativ / Radikalfänger (ROS)

## (MCI 28)

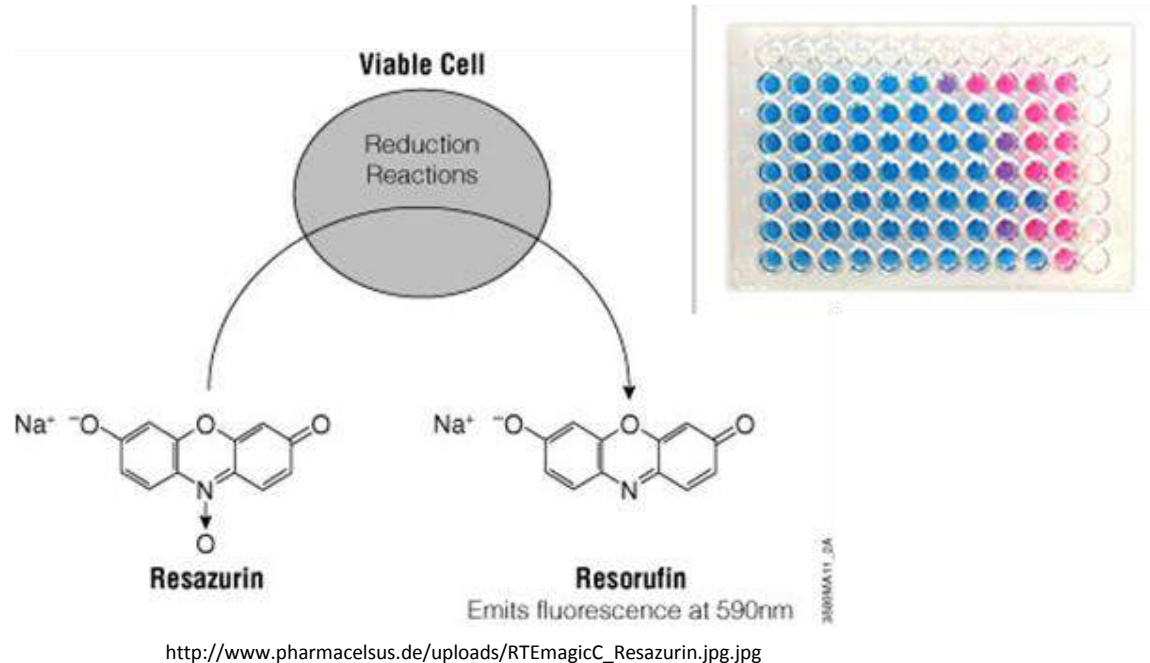


**R<sub>t</sub>** 18,3 min  
**λ<sub>max</sub>** 325 nm  
**M** 333,5 g/mol



Daten aus BA Stefan Stuppner

### Resazurintest

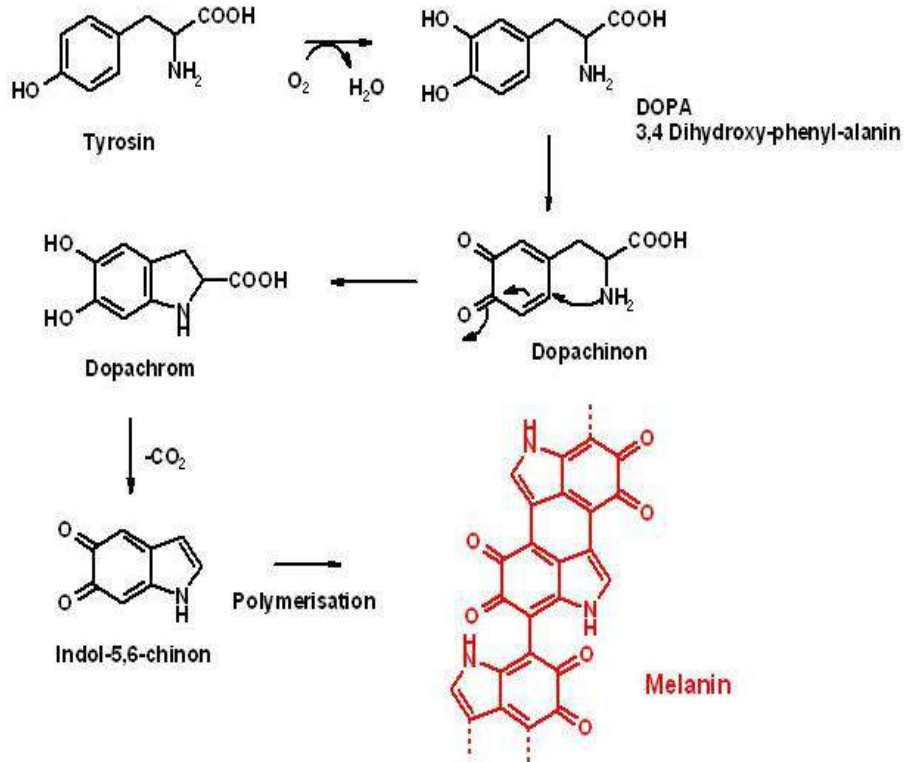


- Am MCI mit Testorganismen *Bac.subtilis*, *E-coli*
- positive Ergebnissen → weitere Analyse an der Hygiene (Med UNI Innsbruck)  
z.B. Risikogruppe 2, Multiresistente Stämme

# BIOAKTIVITÄTSTESTS

## Tyrosinasehemmer

### Melaninsynthese



[http://images.slideplayer.org/2/854238/slides/slide\\_50.jpg](http://images.slideplayer.org/2/854238/slides/slide_50.jpg)

**Einsatz von Tyrosinasehemmer hauptsächlich in der Kosmetikindustrie als Hautaufhellende Wirkstoffe**



Von 12 getesteten Stämmen hemmen 9 die Tyrosinaseaktivität

# ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

- Optimierung der Kultivierungsbedingungen zur Steigerung der Biomasseproduktion und Produktausbeute
- 2 Stämme als potentielle Produzenten von „High value products“
- Entwicklung eines Protokolls zur Herstellung von fraktionierten Extrakten mittels Ultraschallextraktion
- Von 10 getesteten Stämmen
  - 3 mit antibiotischer Wirkung ??
  - 3 mit hoher antioxidativer Wirkung (DPPH - Ergebnisse nicht gezeigt)
  - 9 Tyrosinase Inhibitoren (12 getestete Stämme)
  - Mehrere Stämme mit Proteaseaktivität
  - Mehrere Stämme mit Lipaseaktivität

# AUSBLICK

- Strukturaufklärung (NMR Analyse)
- Optimierung/ Etablierung des Extraktionsprotokolles zur Steigerung der MAA Ausbeute
- Methodenentwicklung zur Quantifizierung von MAAs
- Weitere Bioaktivitätsassays
  - Antioxidative Wirkung → Botanik Innsbruck
  - Anti-inflammatorische Wirkung → Zellkultur
- Neue Stämme ab November 2015
- Kultivierung
  - Cokultivierung
  - Steigerung der Biomasseproduktion
  - Stresstest → Erhöhung der Produktausbeute

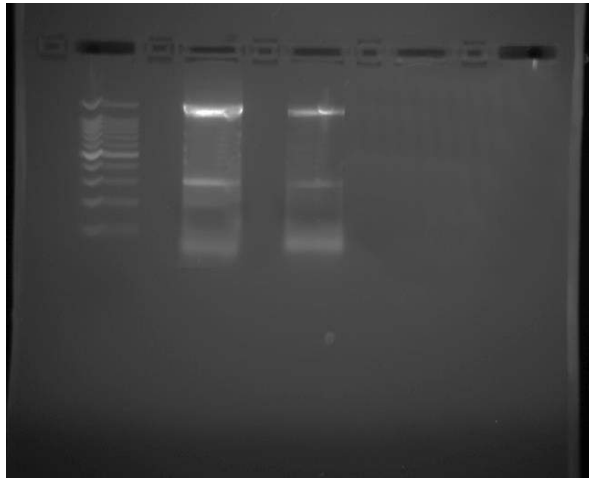


# Molekularbiologie

- Etablierung molekularbiologischer taxonomischer Bestimmung  
rRNA Sequenzierung und/oder AFLP  
(Qualitätssicherung der einzigartigen hochalpine  
Bodenalgensammlung)
- Metabolische Charakterisierung durch Proteomanalyse unter  
physiologischen Stressbedingungen (Sekundärmetaboliten-  
Induktion)

## Molekularbiologie

Methoden sind etabliert: DNA- Isolierung und PCR (ITS Sequenz oder rbcI Gen) funktioniert



Marker Benchtop DNA Ladder  
100 bp

Probe V199|1 (rbcI Gen)

Probe V199|2 (rbcI Gen)

Klonierung: Weiß-Blau Selektion und sequenziert

V46-Algenstamm (ITS-Region): *Bracteacoccus cinnabarinus* (99% Identifikation)

V219, IB273, V199: mittels *rbcL*-Gen identifiziert

V219-Algenstamm: *Coccomyxa subellipsoidea* (91% Identifikation)

IB273-Algenstamm: *Mychonastes zofingiensis* (91% Identifikation)

V199-Algenstamm: *Bracteacoccus polaris* (95-98% Identifikation)

# Transformation von Cyanobakterien

„Peak Oil“

CO<sub>2</sub> Reduktion

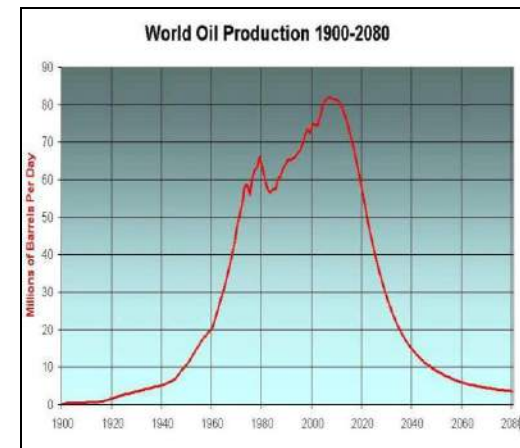
Reduktion von Erdölimport

Ökonomisches und ökologisches Potential - Green jobs

Wissenschaftliche Interesse

Bioethanol als Treibstoff und Brennstoff

•



<http://www.aclimateforchange.org/photo/world-oil-production-19002080>, 2009

# Warum Cyanobakterien ?

- Schneller Aufbau von Biomasse
- Robust
- Natürliche Transformierbarkeit
- Direkte Nutzung der Sonnenenergie zur Produktbildung
- Keine ethischen Bedenken („Teller/Tank“ Diskussion)
- **ABER: keine Ethanolfermentation in cyanobakteriellen Wildtypen**

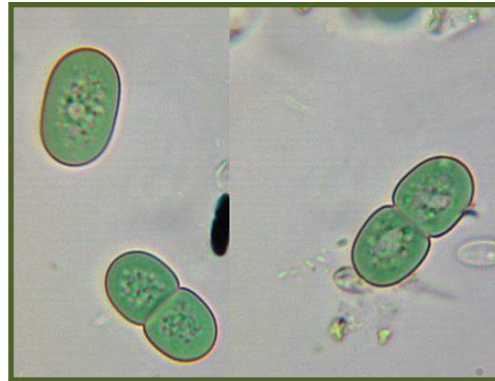
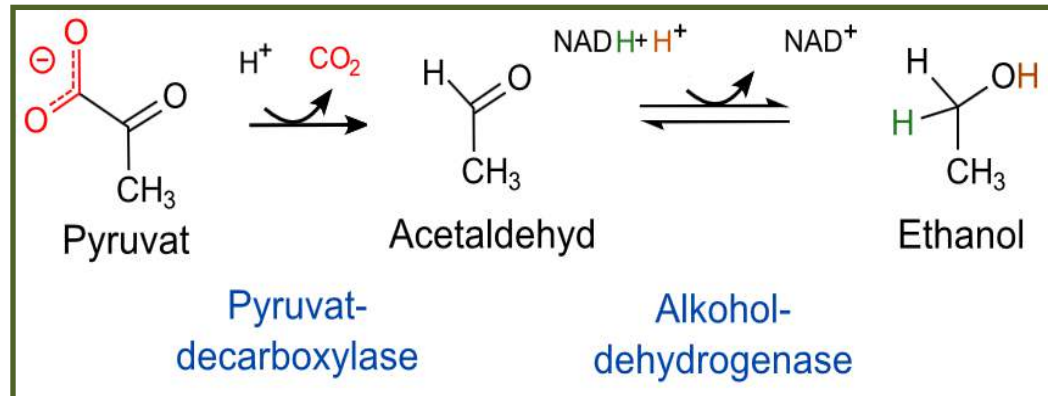


Abb.: *Synechococcus elongatus* PCC7942

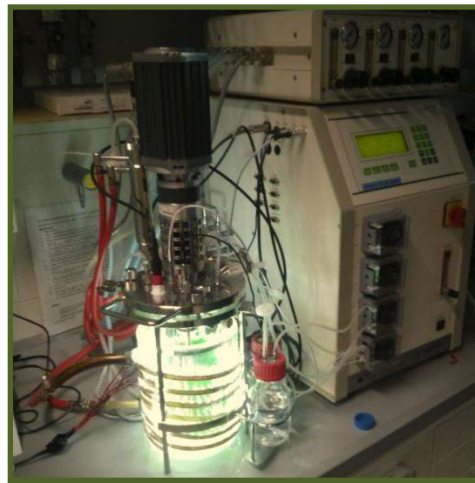
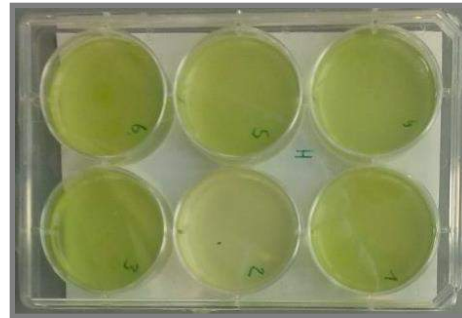
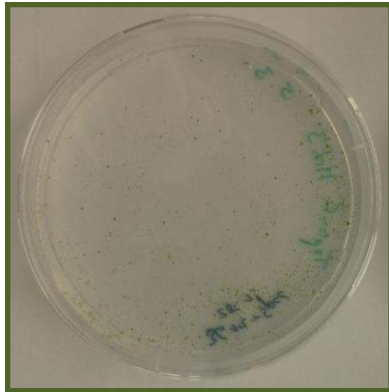
(Quelle: <http://mic.sgmjournals.org/content/151/8/2503/F1.expansion>)

# Grundlagen der Ethanolfermentation

Pyruvatdecarboxylase und Alkoholdehydrogenase:  
Vom Pyruvat zum Ethanol



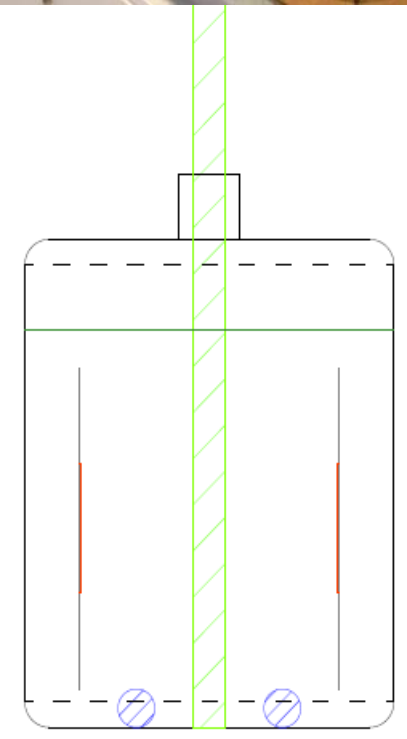
# Transformation, Kultivierung und Scale-up



## AP3 Reaktorentwicklung & Upscale

- Test diverser Reaktortypen
- Auswahl eines Reaktortyps zur Weiterentwicklung





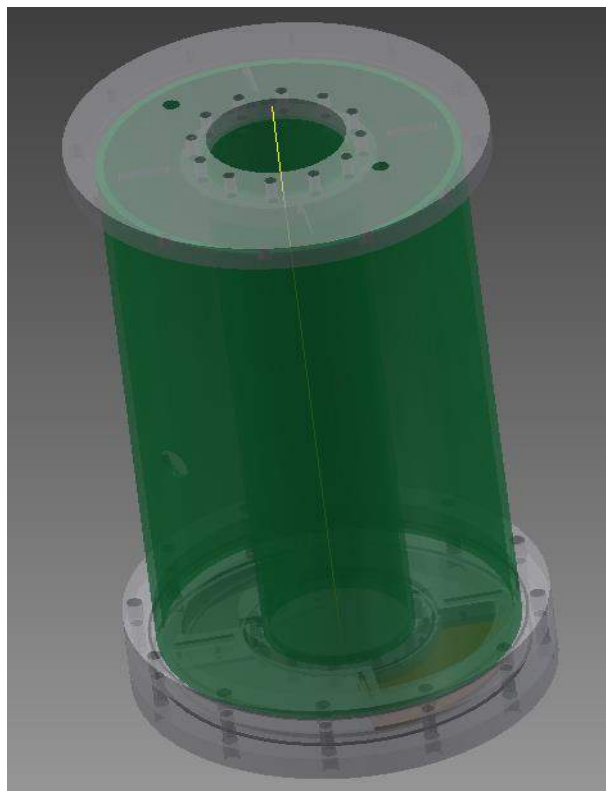
## Fermentationsergebnisse 2L Reaktor

### Optimierung der Kultivierung von *Tychonema bourellyi*

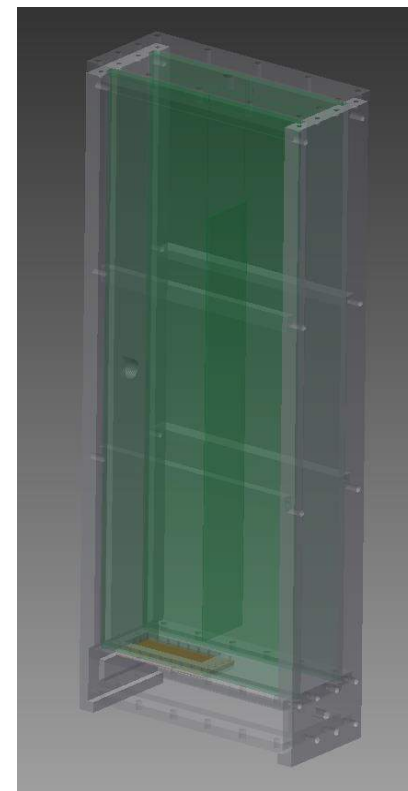
- Kälteliebendes Cyanobakterium mit abiotischer Wirkung
- Optimierung durch Variation von Temperatur, Medium, Startzellzahl, Lichtintensität und Durchmischung (Luftzufuhr) in 100 ml Erlenmeyerkolben nach drei wöchiger Anpassungsphase an die jeweiligen Bedingungen
- Übertragung der Ergebnisse auf 2 l Reaktoren und Fed-batch erfolgreich

## Reaktorbaufornen

Säulenreaktor



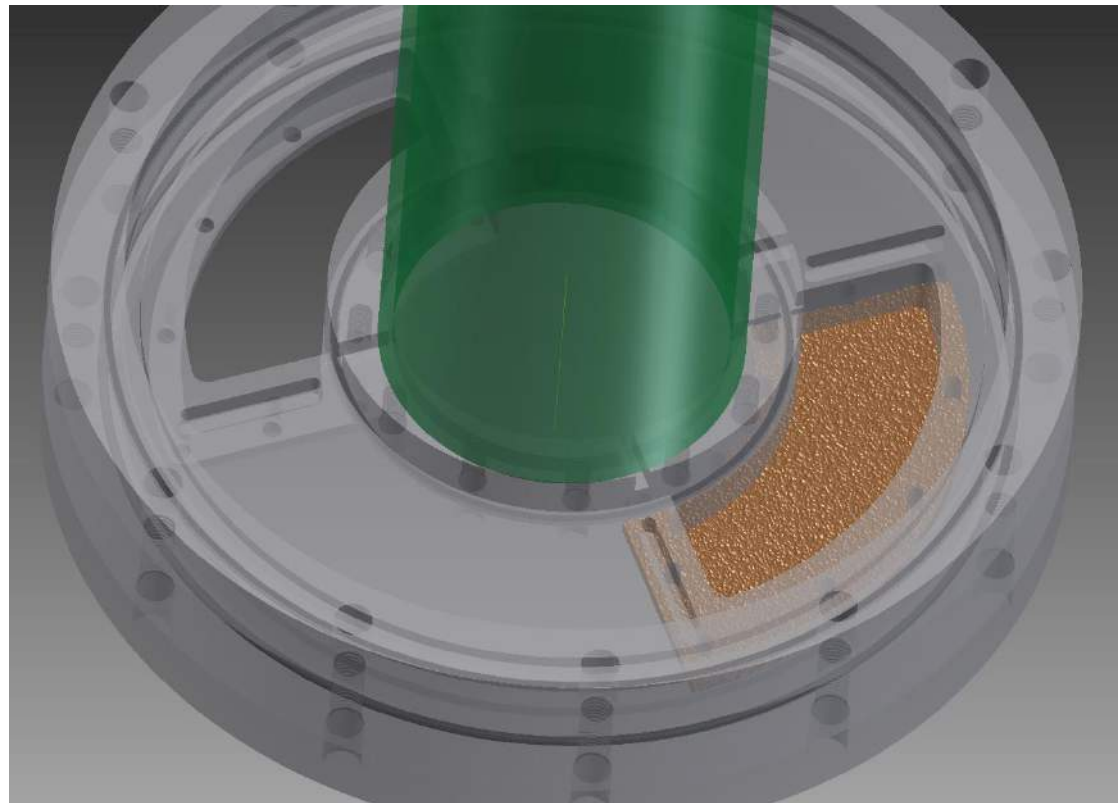
Flatplate



Alle Reaktorbauteile aus PC, Dichtungen aus Silikon, Autoklavierbar

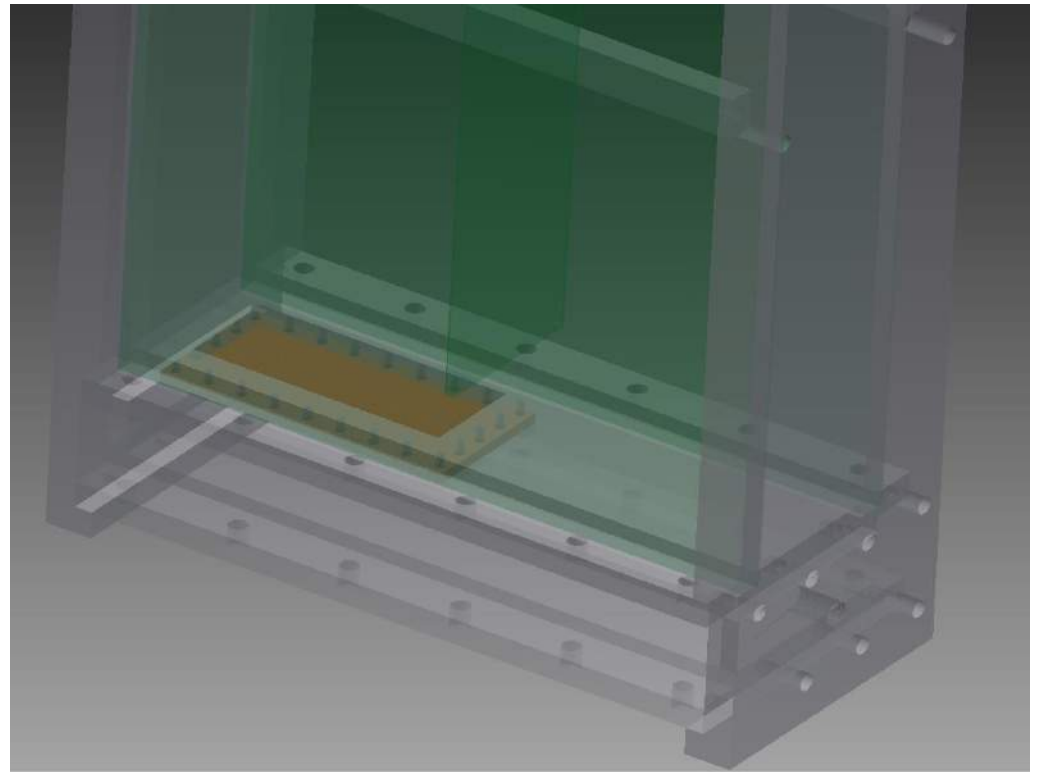
## Details Säulenreaktor

Volumen ca. 5 L  
Schichtdicke 5 cm  
Belüftung modular  
Uplift  
Downlift  
Kann auch von Innen  
Beleuchtet werden



## Details Flateplate

Volumen ca. 5 L  
Schichtdicke 5 cm  
Belüftung modular  
Uplift  
Downlift



# Beleuchtung



## – LED Beleuchtung (SANLight)

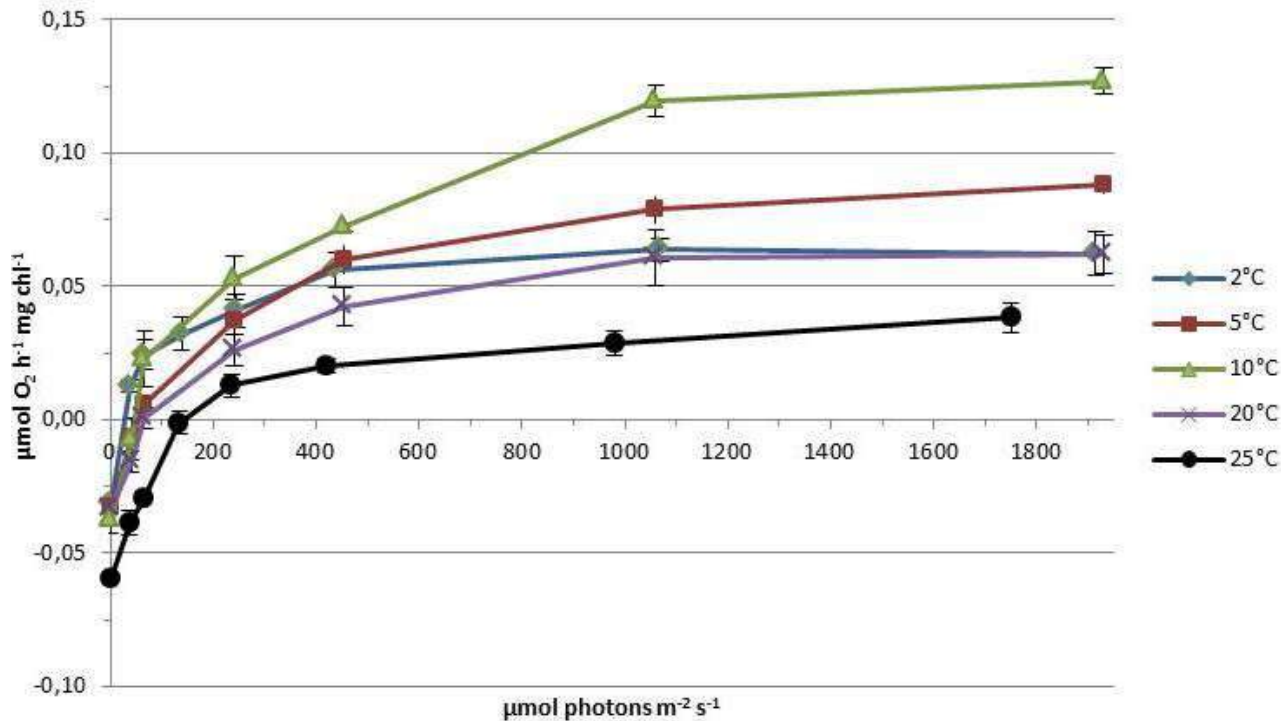
- Photonenflussdichte im Abstand von 8 cm

Position	I	II	III	IV
Photonenflussdichte in $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$	450	930	1400	2000

- Spektrale Verteilung im Abstand von 8 cm

Wellenlänge in nm	300-400	400-500	500-600	600-700	700-800
Verteilung in %	0.10	22.98	41.25	36.01	2.37

# Psychrophilic algae as candidates for outdoor bioreactors in cold countries



Temperature and light dependent oxygen turnover of *Chlamydomonas cf. nivalis* causing red snow in the Alps. At darkness (y-axis: 0  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) cell respiration was measured. At low light conditions (below 50  $\mu\text{mol}$ ) best performance was at 2°C, followed by 5°C. However under high light, best results were achieved at 10°C. At 25°C, respiration was significantly increased and photosynthetic performance was the poorest.

# Conclusio

- Kultivierungstechniken etabliert
- Stammsammlung etabliert inkl. Psychrophile
- Medien analysiert und optimiert
- Value added products identifiziert und analysiert
- Genmanipulation von Cyanos etabliert
- Psychrophile Stämme im Portfolio
- Reaktortypen entwickelt und optimiert

**Open for scientific & industrial cooperations**

**[A.jaeger@fh-wels.at](mailto:A.jaeger@fh-wels.at)**

**<http://co-operation-skd.at/>**