

CO-ACTION OF PHOTOSYNTHETIC NADPH REDUCTION AND GLYCOLYTIC PATHWAYS FOR PHOTOBIOTRANSFORMATIONS VIA CYANOBACTERIA

Giovanni Davide Barone^{1,2}, Robert Kourist¹

¹ Biocatalysis and Protein Engineering Group, Kourist Team - Institute of Molecular Biotechnology, Graz University of Technology, Petersgasse 12, 8010 Graz, Austria

² Group Bioengineering and Synthetic Microbiology, i3S - Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Rua Alfredo Allen 208, 4200-135 Porto, Portugal
giovanni.barone@tugraz.at

1 Identification of **key-parameters** for cultivation of *Synechocystis* sp. PCC 6803

2 Optimization of **key factors** for photobiotransformations

3 Investigation of photobiotransformations, via YqjM^[1,2] ene reductase, focusing on the **co-action of glycolytic routes with light-dependent pathways** to increase productivities

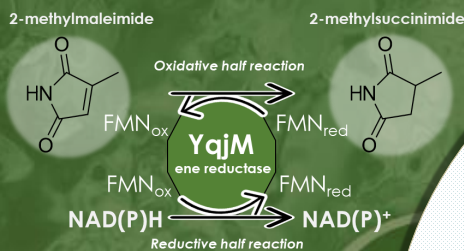
AIMS

Main key factors for photobiotransformations:

- Proper correlation of **light intensity and cells density**.
- Inorganic nutrients** availability and limitation (e.g. carbon and nitrogen)
- Sugars** availability and limitation (e.g. glucose).
- Substrate/product toxicity**

High-Throughput Medium Photobioreactor^[2,3] and **CellIDEG** devices^[4] have been utilized in this study.

BIOTRANSFORMATION BY WHOLE-CELL CYANOBACTERIA IN PRESENCE OF LIGHT



1

HOW FAST CAN WE GET?

SPACE-TIME-YIELD [g L⁻¹ h⁻¹]

HOW HIGH CAN WE GET?

CELL PRODUCTIVITY [g g_{CDW}⁻¹]

2

METHODOLOGY AND APPROACH

RESULTS AND PROGRESS

3

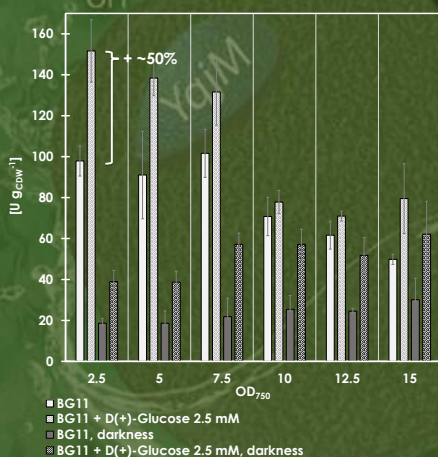


Figure 2. Specific activity under light or in darkness (+/- glucose).

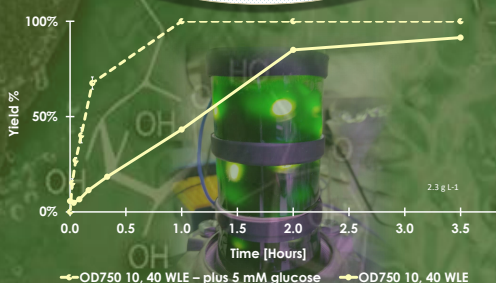


Figure 3. Reactions in bubble column reactor (+/- glucose).

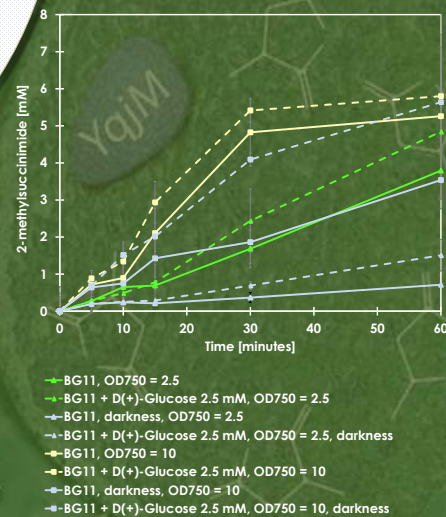


Figure 4. Product formation under light or in darkness (+/- glucose).

Substrate: 2-methylmaleimide. Product: 2-methylsuccinimide. Temperature: 30 °C. Red-blue light intensity: 200 – 250 μmol photons m⁻² s⁻¹.

Strain: *Synechocystis* PCC 6803, expressing YqjM oxidoreductase under the control of P_{cpCB}. Reaction volumes: 1 mL (Fig. 2, 4), and 200 mL (Fig. 3, OD₇₅₀ 10).

References

- Pesic M. *et al.*, 2017, 'Characterization of the Old Yellow Enzyme Homolog from *Bacillus subtilis* (YqjM)', *ChemistrySelect*, 2, 3866 – 3871
- Königer K. *et al.*, 2018, 'Recombinant Cyanobacteria for the Asymmetric Reduction of C=C Bonds Fueled by the Biocatalytic Oxidation of Water.', *Chemie (Internat. ed. in English)* 55, 5582–5585
- Böhmer S. *et al.*, 2017, 'Enzymatic Oxyfunctionalization Driven by Photosynthetic Water-Splitting in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803', *Catalysts* 7(8), 240
- Guljamov A. *et al.*, 2017, 'High-Density Cultivation of Terrestrial Nostoc Strains Leads to Reprogramming of Secondary Metabolome'. *Appl Environ Microbiol* 83:e01510-17
- Chen X. *et al.*, 2016, 'The Entner–Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants.', *PNAS*

Acknowledgement:

PhotoBioCat received funding from the European Union's Horizon 2020 MSCA ITN-EJD program under grant agreement No 764920.

TU Graz – Institute of Molecular Biotechnology 8010 Graz, Rechbauerstraße 12, Austria, Phone: +43 316 873 0. E-Mail: info@tugraz.at

Make microalgal cultures axenic again – a fast and simple workflow utilizing fluorescence-activated cell sorting

Philipp Doppler, Ricarda Kriechbaum and Oliver Spadiut *

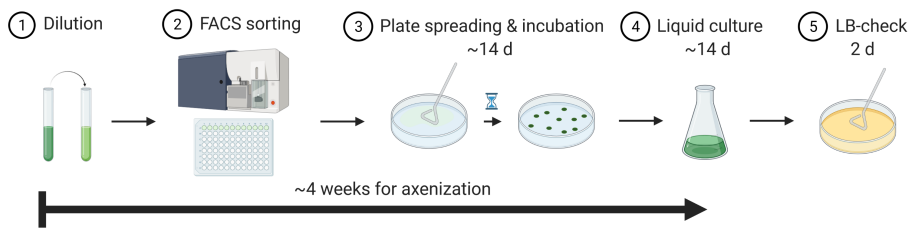
Research Division Biochemical Engineering, Institute of Chemical, Environmental and Bioscience Engineering, Technische Universität Wien, Gumpendorfer Strasse 1a, 1060 Vienna, Austria; philipp.doppler@tuwien.ac.at (P.D.); ricarda.kriechbaum@tuwien.ac.at (R.K.).

* Correspondence: oliver.spadiut@tuwien.ac.at (O.S.), +43 1 58801 166 473

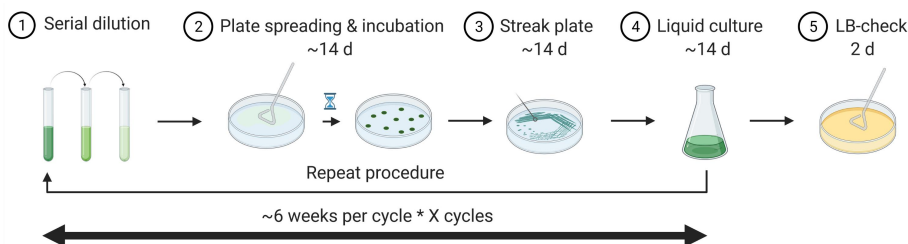
Motivation

- ✓ Axenization of microalgal cultures is extremely laborious and time-consuming.
- ✓ High-performance FACS devices are available to every group (e.g. BOKU Core Facilities).
- ✓ A rapid, alternative workflow to obtain axenicity by a combination of FACS and plate spreading.
- ✓ Cyanobacteria and green algae strains were successfully made axenic.
- ✓ Method transferability to another FACS device was demonstrated.
- ✓ Great time-savings with less hands-on lab work compared to conventional isolation techniques.

Axenization - Workflow

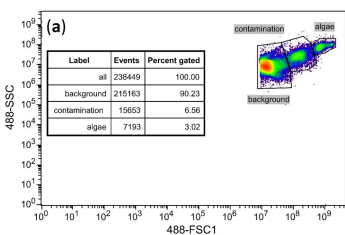


State-of-the-Art Approach

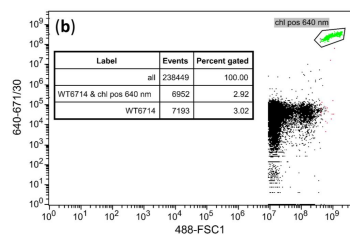


Method Development

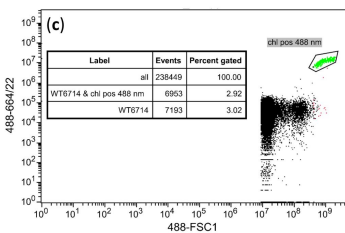
Gate definition according to cell size



Gating of chlorophyll positive cells (640 nm)



Gating of chlorophyll positive cells (488 nm)



Gating of maximum chlorophyll content

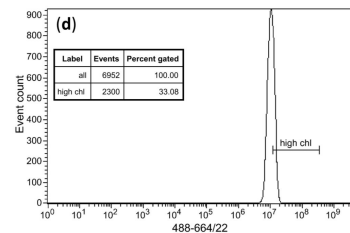
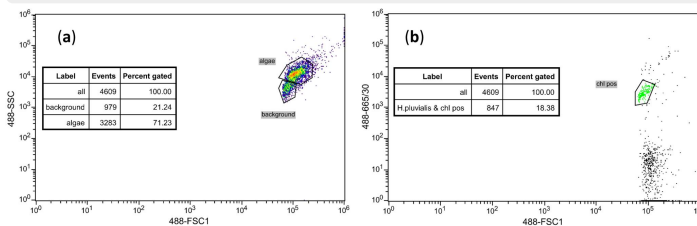


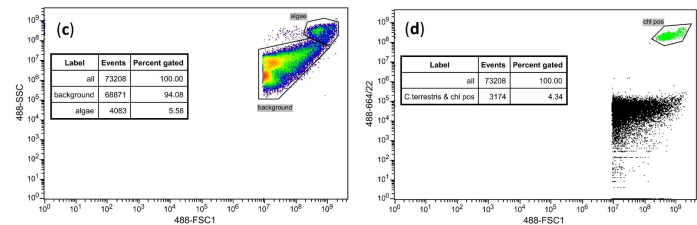
Fig: Definition of gates for sorting. (a) Density plot of side scatter (488-SSC) versus forward scatter (488-FSC1), color code: red-high to purple-low; (b) dot plot 640 nm excitation 671/30 nm filter (640-671/30) versus 488-FSC1, green: "algae" and "chl pos 640 nm", red: "algae" not "chl pos 640 nm"; (c) dot plot 488 nm excitation 664/22 nm filter (488-664/22) versus 488-FSC1, green: "algae" and "chl pos 488 nm", red: "algae" not "chl pos 488 nm"; and (d) histogram of fluorescence intensity of 488-664/22.

Method Transfer

Haematococcus pluvialis



Coelastrella terrestris



Chloromonas sp. (snow algae)

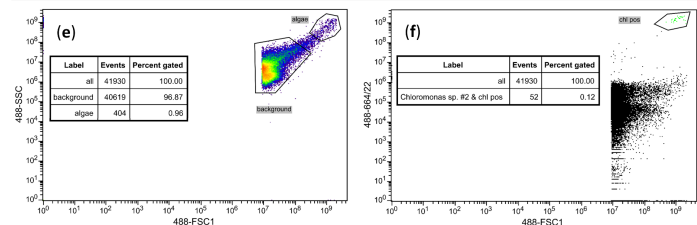


Fig: Sorting of green algal cells. (a,b) *H. pluvialis*; (c,d) *C. terrestris*; (e,f) *Chloromonas* sp. (a,c,e) Density plot of side scatter (488-SSC) versus forward scatter (488-FSC1), color code: red-high to purple-low; (b,d,f) dot plot of 488 nm laser with 664/22 nm filter (488-664/22) plotted versus 488-FSC1, green: "algae" and "chl pos 488 nm".

Reference

P. Doppler, R. Kriechbaum, B. Singer, O. Spadiut, Make microalgal cultures axenic again – a fast and simple workflow utilizing fluorescence-activated cell sorting, *J. Microbiol. Methods.* (2021). <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106256>

Development of novel silica hydrogels with improved structure properties to support growth of entrapped marine diatoms



Fladung, L.¹, Homburg, S. V.¹, Kruse, O.², Patel, A.¹

¹ Bielefeld University of Applied Sciences, Fermentation and Formulation of Biologicals and Chemicals, Interaktion 1, 33619 Bielefeld, Germany

² Bielefeld University, Algae Biotechnology and Bioenergy, Universitätsstraße 25, 33501 Bielefeld, Germany

Introduction In marine microalgae research slow cell growth, costly downstream processing and low benefits have so far hindered the implementation of production processes¹. Studies have shown that immobilisation in hydrogels can enhance algal growth rates and allow continuous production as well as simple separation of extracellular compounds². In marine systems, silica hydrogels are advantageous over the conventional immobilisation matrix calcium alginate due to their improved physicochemical stability in presence of chelating agents and cations^{3,4}. The encapsulation of mixotrophic fresh water microalgae in silica hydrogels has already been reported, while there is no study on the encapsulation of photoautotrophic saltwater diatoms in silica hydrogels yet⁵.

Aims Our aim is to transfer silica hydrogel encapsulation techniques from fresh water microalgae to saltwater diatoms and develop novel silica hydrogels with improved diffusion properties and a more flexible gel structure to achieve higher growth rates and prevent cell leakage.

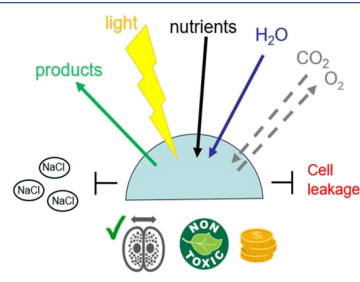


Figure 1: Requirements for biocompatible silica hydrogels

Materials and methods Hydrogels were prepared from various functional silica precursors. The microalgae were grown at 100 μmol/s/m² in f/2 medium. Cell growth was determined by OD₆₀₀ measurements in the photometer. The CO₂ diffusion speed was determined using a pH indicator-based method.

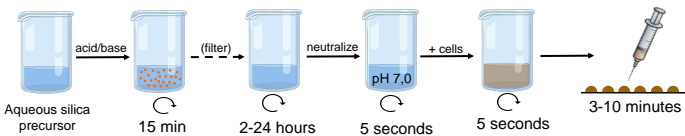


Figure 2: Synthesis of silica hydrogels

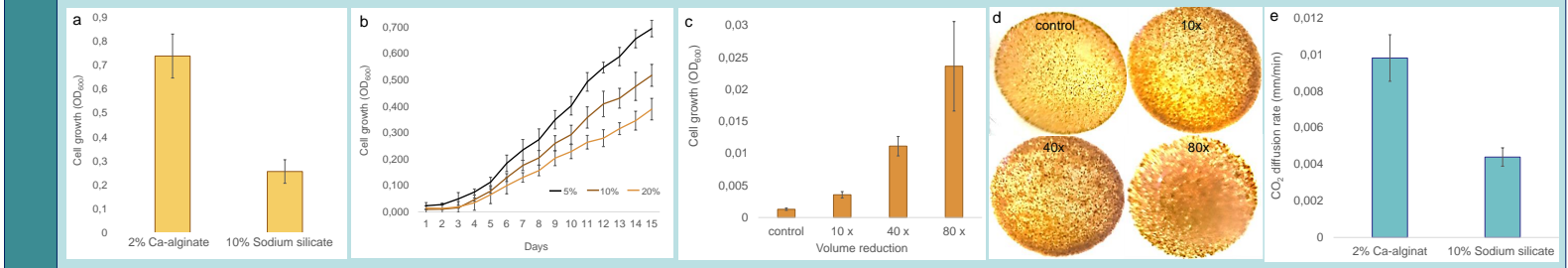


Figure 3: Cell growth in hydrogels (a), Cell growth within 5%, 10% and 20% sodium silicate (b) and 10x, 40x and 80x reduced capsule volume (c), growth gradients in different capsule volumes (d), CO₂ diffusion rates in hydrogels (e)

Results and discussion Our results show that diatom growth is reduced by 60% in 10% silica hydrogels as compared to 2% Ca-alginate (fig. 3a). A decrease of the silica concentration from 20% to 10% and 5% increased the growth by approximately 30% and 80% respectively (fig. 3b). Reduction of the particle volume by the factors 10, 40 and 80 increased cell growth approximately 3-, 10- and 20-fold (fig. 3c) and a growth gradient toward the core of the capsule (fig. 3d) hinted towards a possible CO₂ diffusion limitation. CO₂ diffusion rate measurements via pH indicator-based dye front analysis (fig. 4 bottom) revealed a correlation between the gas diffusion limitation and the growth reduction (fig 3e). Functionalization of sodium silicate (SS) and tetramethyl orthosilicate (TMOS) hydrogels by introducing long blocked sidechains (GPTMS), positively (APTES) or negatively charged (CEST) functional groups or both (CEST/APTES) resulted in an up to 2.4 fold increase in the CO₂ diffusion rate compared to the controls which is comparable to 2% calcium alginate (fig. 4 top, line). Photoautotrophic cell growth within the functionalized hydrogels permanently exposed to 5% CO₂ mostly followed the CO₂ diffusion trend with CEST and CEST/APTES charge functionalized hydrogels performing best with up to 2.2x stronger cell growth compared to the controls (fig. 4 top, bars).

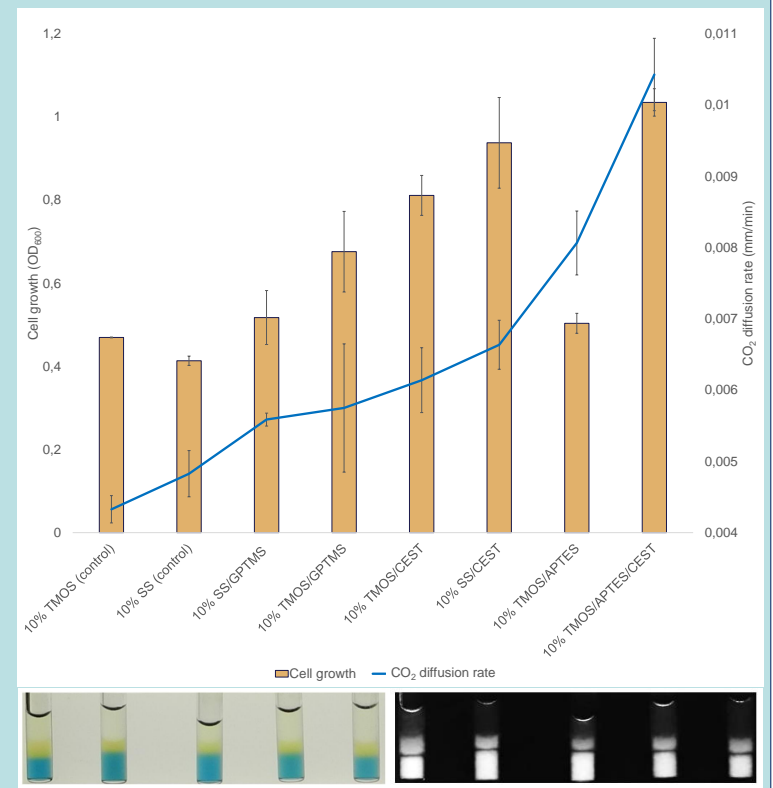


Figure 4: CO₂ diffusion rate of functionalized silica hydrogels (blue line for visualization) and cell growth (brown bars) within the gels (top), CO₂ diffusion rate measurement via pH indicator-based dye front analysis (bottom)

Conclusion We successfully transferred the silica hydrogel method from fresh water microalgae to marine diatoms. We found a CO₂ diffusion limitation to hamper the photoautotrophic microalgae growth in sodium silicate hydrogels. Charge functionalization of sodium silicate and TMOS based silica hydrogels approximately doubled the CO₂ diffusion rate as well as the photoautotrophic microalgae growth. In depth experiments will shed light into the diatom growth inside the novel silica hydrogels to facilitate the profitable production of extracellular algal products.

References: [1] Venkatesan et al., 2015 [2] Gifun et al., 2018 [3] Vasilieva et al., 2016 [4] Moreno-Garrido, 2008 [5] Homburg et al., 2019

Integration of a floating pilot plant for the cultivation of *Tetradesmus obliquus* in the harbor of Harburg

Leonard Francke, Sarah Löhn, Nils Wieczorek and Kerstin Kuchta

Background

Crucial challenges for the establishment of algae based biorefineries are the high demand of energy and land for the cultivation of microalgae. Thus, novel, sustainable and economically feasible production concepts for microalgae need to be developed, to ensure high production capacities without competing with conventional agriculture.

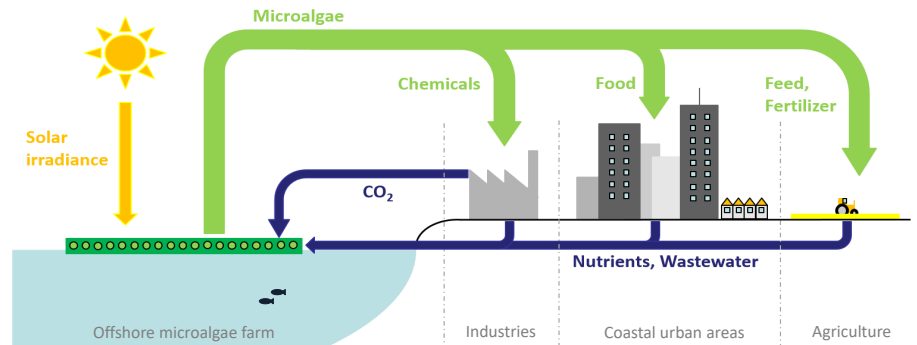


Figure 1: Concept of offshore microalgae cultivation systems integrated into coastal urban and industrial areas.

Objective

At this point, the development of floating photobioreactors, partially immersed in the surface of open waters, is attractive. The aim is to save land and to take advantage of the heat capacity of the surrounding water. This enables an energy saving and sustainable temperature regulation of the microalgae suspension. Waste streams from adjacent industries could be used as nutrients.



Figure 2: Floating pilot plant for microalgae cultivation on a channel in Harburg. Pipes can be immersed continuously into the surface water for temperature regulation.

Pilot plant

The developed floating pilot plant consists of a tubular reactor system with a working volume of 160 liters, mixed by a circulation pump. The transparent, photoactive pipes are arranged horizontally to the water surface and are continuously variable immersible for temperature regulation. The plant is located outdoors on a channel of a harbor in Hamburg and is therefore provided with natural light.

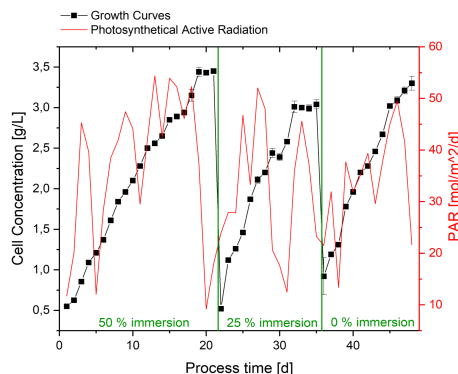


Figure 3: Biomass concentration and photosynthetic active radiation over the cultivation period for the cultivation of *T.obliquus* at different photobioreactor immersion depths during June and July 2021.

Results

Three photoautotrophic cultivation cycles were carried out with the local microalga *Tetradesmus obliquus* in repeated batch at different immersion depths. Achieved cell densities were between 3.04 and 3.45 g·L⁻¹ whereas volumetric productivities rose up to 0.24 g·L⁻¹·d⁻¹ at high solar irradiances. An immersion of 50 % resulted in lower reactor temperatures in comparison to the ambient temperature during the day and showed a noticeable cooling effect.

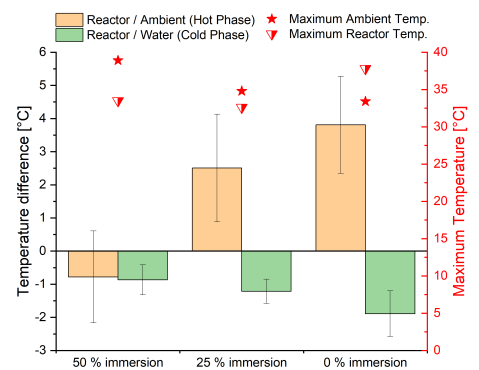


Figure 4: Average temperature differences between reactor and ambient temperature during hot phase (1pm-6pm) and between reactor and water temperature during cold phase (12pm-7am) and maximum reactor and ambient temperatures in each cycle.

Conclusion

During a first cultivation period it was shown, that the pilot scale cultivation of microalgae in a closed floating system is feasible and a promising alternative to land based systems. Furthermore, an immersion of the photobioreactor leads to a mild passive tempering of the suspension, that allows to prevent temperature peaks, that might be disadvantageous for the culture.

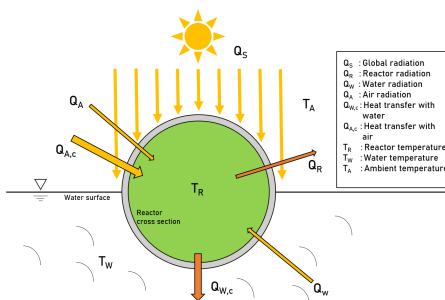


Figure 5: Simplified reactor cross section immersed to 50 % in the water, indicating main heat flows.

Outlook

To enhance the heat transfer and the productivity, a mathematical model will be applied to design an automation system for cooling during the day and heating during the night. Optimum locations in a global context will be identified in the course. Furthermore, investigations in the appropriate downstream processing of the produced biomass will be initiated.

Contact:

M.Sc. Leonard Francke
Hamburg University of Technology
Institute of Environmental Technology and Energy Economics
Blohstrasse 15
D-21079 Hamburg

T +49 (0) 40 42878 4796
F +49 (0) 40 42878 2375
www.tuhh.de/ive
leonard.francke@tuhh.de

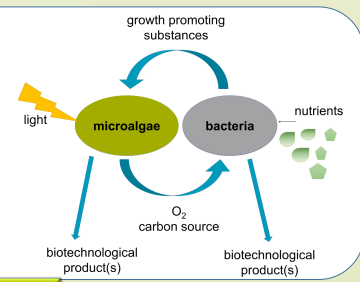


Robust microalgal production processes by co-cultivation with immobilized plant growth promoting bacteria

Joshi J.¹, Homburg, S. V.¹, Kruse, O.², Patel, A.¹
¹ Bielefeld University of Applied Sciences, Fermentation and Formulation of Biologicals and Chemicals, Interaktion 1, 33619 Bielefeld, Germany
² Bielefeld University, Algae Biotechnology and Bioenergy, Universitätsstr. 25, 33501 Bielefeld, Germany

Introduction

The cultivation of microalgae for lipid production is still uneconomical due to low growth rates, expensive medium, challenging downstream processing, small added value and high risk of contamination (1). Recent studies indicate that microalgal processes gain more profit options by co-cultivation with bacteria. Entrapment of microalgae in mechanically stable and microbe resistant material supporting photosynthetic activity and application as biocatalysts has already been reported by Homburg et al (2). This doctoral research will pave the way for novel eco-inspired co-fermentation processes that exploit the chemical crosstalk between algae and bacteria (figure 1).



Aims

- Our aims were to
- find a process window where both microorganisms are viable and grow
 - investigate different immobilization materials for the bacterium in the co-culture
 - investigate the effects of these different materials on the immobilized bacterium and microalgae in the co-culture

Materials and methods

The co-cultivation of the alga and bacterium was performed in the complex growth medium with 20g/L carbon source added for the bacterium. The bacterium was immobilized using different materials by the encapsulation method. Growth was measured by determining cell count, OD and biomass. Chlorophyll content and total pigment content was also measured for the microalgae.

Results and discussion

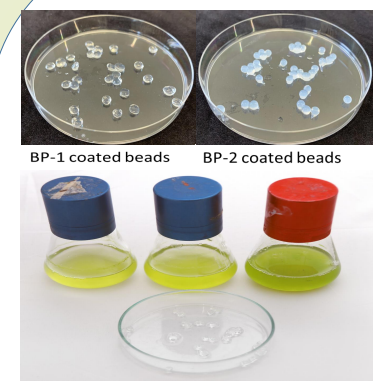


Fig 1. Biopolymer beads for encapsulation of bacterium

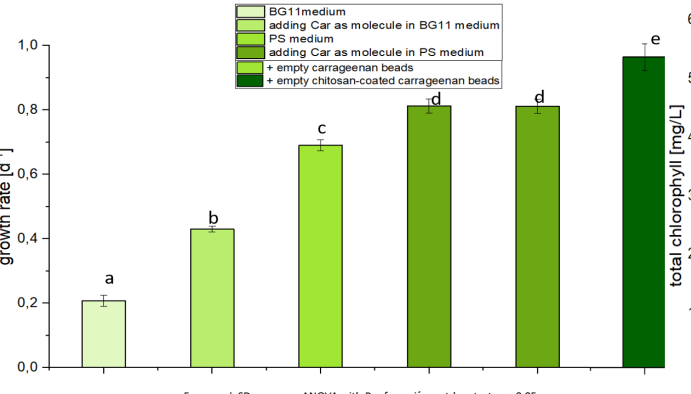


Fig 2. Effect of biopolymers on algal growth rate

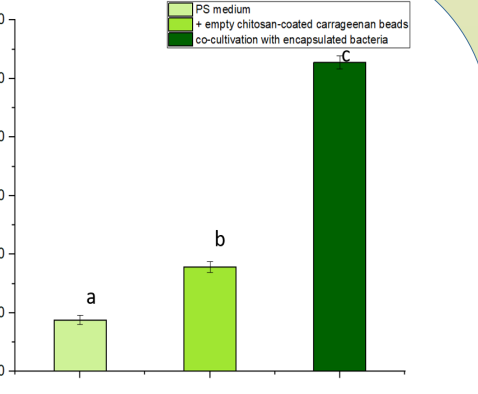


Fig 3. Effect of co-cultivation on total chlorophyll

Carrageenan improves the growth rate of the microalgae and Chitosan-coated carrageenan beads increase microalgal growth rate by 5 fold as compared to axenic algae in BG-11 medium (Fig 2). Co-cultivation with bacteria encapsulated in chitosan-coated carrageenan beads increases the total chlorophyll content in microalgae by 5 fold (Fig 3) and also increases the chlorophyll content (mg/cells) from 15×10^{-6} to 26×10^{-6} compared to the axenic algae in PS medium. Co-cultivation with bacteria encapsulated in chitosan-coated carrageenan beads enhances microalgal biomass by 11 fold and lipid production 3 fold compared to the axenic algae in PS medium (Fig 6).

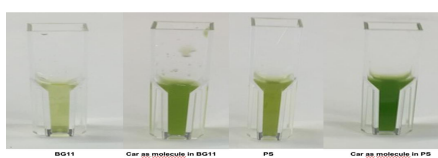


Fig 4. Effect of biopolymers on microalgal pigment



Fig 5. Effect of co-cultivation on microalgal biomass

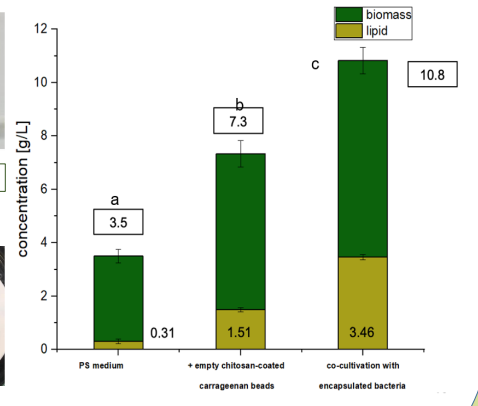


Fig 6. Effect of co-cultivation microalgal biomass and lipids

Conclusion

Based upon the analysis of cell concentration, growth rate, stability of capsules, carrageenan-chitosan beads are a promising candidate for immobilization of bacterium. Immobilization of bacterium in carrageenan-chitosan beads also increases microalgal growth, pigments and lipids in co-cultivation of microalga and bacterium.

REFERENCES
1. Sarra Magdoui, Khushwinder Brar, and Jean-François Blais (2016). Co-culture for lipid production: Advances and challenges. Biomass and Bioenergy. 92. 20-30.
2. Sarah Vanessa Homburg, Olaf Kruse, Anant V. Patel (2018). Development of novel silica hydrogels for entrapment and growth of sensitive microalgae. Chemie Ingenieur Technik. 90. 1210-1210.



SCALE-UP DER IN SITU-EXTRAKTION VON BOTRYOCOCCUS BRAUNII IN DEN SEMI-TECHNISCHEN MAßSTAB



CHRISTIAN KLEINERT UND CAROLA GRIEHL

HOCHSCHULE ANHALT, KOMPETENZZENTRUM ALGENBIOTECHNOLOGIE (CAB), BERNBURGER STR. 55, 06366 KÖTHEN, DEUTSCHLAND

D·A·CH ALGEN SUMMIT
11. bis 12. Okt. 2021, Wien, Österreich

HINTERGRUND

Mikroalgen werden aufgrund hoher Produktionskosten bislang nur begrenzt kommerziell genutzt. Die Prozessschritte der Ernte, des Zellaufschlusses und der Extraktion zur Gewinnung intrazellulärer Produkte aus Mikroalgen machen dabei zwischen 50 und 80 % der Gesamtkosten aus. Eine Möglichkeit zur Reduzierung dieser Kosten bietet das Verfahren der *in situ*-Extraktion (Milking) von Mikroalgen. Bei diesem Verfahren wird das von den Zellen sekretierte Produkt direkt während der Kultivierung extrahiert und die kostenintensiven Prozessschritte der Ernte und des Zellaufschlusses eingespart. Die Zellen sollen bei diesem Verfahren vital bleiben, um für weitere Extraktionen neues Produkt zu bilden. Eine geeignete Mikroalge ist die Grünalge *Botryococcus braunii*, welche langkettige Kohlenwasserstoffe (C18 bis C37) in einer Matrix um die Zellen herum einlagert.

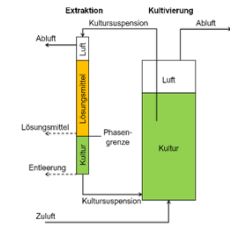


Abb. 1. Schematischer Aufbau der *in situ*-Extraktion

ZIELSTELLUNG UND ERGEBNISSE

1. Identifizierung geeigneter *B. braunii* Stämme für das Verfahren der *in situ*-Extraktion

- Untersuchung extraktionsrelevanter Parameter (Wachstum, Gehalt extrazellulärer Kohlenwasserstoffe, Lösungsmitteltoleranz)
- Erstellung einer Rangliste



Abb. 2. *In situ*-Extraktion im Labormaßstab.

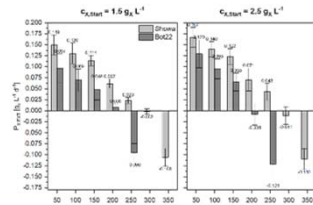


Abb. 3. Biomasseproduktivität der Stämme Showa und Bot22 bei unterschiedlichen Extraktionszeiten.

Tab. 1. Rangliste der untersuchten *B. braunii* Stämme

Stamm	$P_{X,max}$	$C_{X,max}$	P_L	$C_{L,max}$	P_{EKW}	$E_{KW,max} \cdot E_{KW,EXT}$	SC	U_N	U_P	Σ	
CCAP 807/2	2	5	3	3	5	3	2	8	1	3	35
SAG 807-1	2	7	5	5	2	1	2	9	3	3	39
ACOI 1257	2	7	1	3	3	2	1	3	2	3	27
UTEX 2441	3	9	4	5	2	1	3	9	3	3	42
ACOI 58	1	4	3	2	2	2	2	6	3	4	29
SCCAP 1489	2	6	3	4	2	1	2	7	3	4	34
SAG 30.81	3	9	1	3	2	1	5	9	4	4	41
UTEX 572	2	6	1	3	2	1	2	1	2	2	22
SCCAP 1761	2	4	5	3	2	2	10	4	4	3	39
Showa	5	10	5	10	10	4	7	10	5	5	71
Bot22	5	10	2	8	10	5	6	10	4	4	64
CCALA 779	1	4	5	2	1	1	2	2	3	4	25

2. *In situ*-Extraktion ausgewählter *B. braunii* Stämme in 3 L Blasensäulenreaktoren

- Optimierung Extraktionszeit der Stämme Showa und Bot22
- Etablierung eines Extraktionskoeffizienten aus effektiver Extraktionszeit und Phasengrenzfläche zum Scale-up



Abb. 4. *In situ*-Extraktion im semi-technischen Maßstab (6 L FPA).

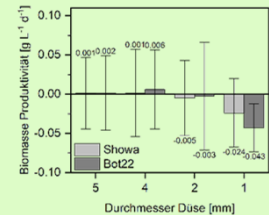


Abb. 5. Biomasseproduktivität bei Düsendurchmessern von 5, 4, 2 und 1 mm.

3. Übertragung der Kultivierung und *in situ*-Extraktion auf 6 L Flat-Panel-Airlift (FPA) Reaktoren

- Kultivierung von Showa und Bot22 in FPA-Reaktoren
- Ermittlung des optimalen Partikeldurchmessers
- 45 Tage Extraktion (opt. Extraktionszeit/Partikeldurchmesser)

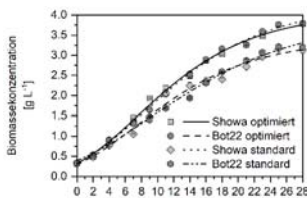


Abb. 6. Wachstumskurve unter standard und optimierten Kultivierungsbedingungen.

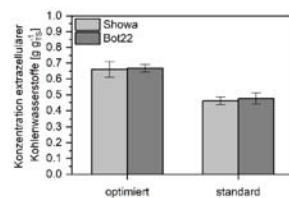


Abb. 7. Konzentration extrazellulärer Kohlenwasserstoffe bei standard und optimierter Kultivierung

4. Untersuchung zur Beeinflussung der Kohlenwasserstoffsekretion unter Optimierung der Kultivierungsbedingungen

- Temperatur, Hell/Dunkel-Zyklus, Nährstoffe (BG11-Medium)
- Showa: 28 °C, H/D = 24/00, Nährstoffe = 0,25 N, 2 P, 1 Mg, 0 Ca
- Bot22: 32 °C, H/D = 24/00, Nährstoffe = 0,5 N, 2 P, 0,5 Mg, 0 Ca

5. *In situ*-Extraktion unter Zusammenführung aller Optimierungsschritte über 80 Tage im semi-technischen Maßstab

- *In situ*-Extraktion des Stammes Showa über 80 Tage
- Steigerung der Kohlenwasserstoffausbeute von 10,5 mg $g_X^{-1} d^{-1}$ (3 L Blasensäule) um 50 % auf 15,7 mg $g_X^{-1} d^{-1}$ (6 L FPA opt.)

Tab. 2. Vergleich der *in situ*-Extraktion über der durchgeführten Optimierungsschritte.

Extraktion Optimierung	3.0 L Blasensäule (30 Tage)	6.0 L FPA-Reaktor (45 Tage)	6.0 L FPA-Reaktor (80 Tage)
$C_{X,start}$ [$g_X L^{-1}$]	1.482 ± 0.012	2.437 ± 0,001	2.533 ± 0.091
ϕ_X [$g_X L^{-1}$]	1.619 ± 0.238	2.568 ± 0,165	2.636 ± 0.145
P_X [$g_X L^{-1} d^{-1}$]	0.005 ± 0.103	-0.003 ± 0.110	0.002 ± 0.112
ϕ_{EKW} [$g_{EKW} g_X^{-1}$]	0.538 ± 0.098	0.468 ± 0,041	0.496 ± 0.055
$P_{KW,EXT}$ [$mg_{KW} L^{-1} d^{-1}$]	16.989 ± 3.241	34.230 ± 5.180	41.380 ± 6.283
$P_{KW,EXT}$ [$mg_{KW} g_X^{-1} d^{-1}$]	10.534 ± 1.544	13.360 ± 1,980	15.721 ± 2.190
$Y_{KW,EXT}$ [$g_{KW} L^{-1}$]	1.359 ± 0.259*	2,738 ± 0,414*	3.311 ± 0.503
$Y_{KW,EXT}$ [% g_X]	83.94*	106,61	125.60

AUSBLICK:

- Überführung der *in situ*-Extraktion von 6 L FPA-Reaktoren in den technischen Maßstab auf 28 L FPA-Reaktoren

LITERATUR:

- Kleinert, C., Griehl, C., Griehl, C. Verfahren und Vorrichtung zur Abtrennung extrazellulärer Lipide aus Mikroalgen, Deutsches Patent- und Markenamt (DE102014005372A1)
- Griehl, C., Kleinert, C., Griehl, C. & Bieler, S. Design of a continuous milking bioreactor for non-destructive hydrocarbon extraction from *Botryococcus braunii*. J. Appl. Phycol. 27 (2015)
- Kleinert, C., Griehl, C. Identification of suitable *Botryococcus braunii* strains for non-destructive *in situ* hydrocarbon extraction. J. Appl Phycol 33, 785–798 (2021).



Christian Kleinert
Hochschule Anhalt
CAB

Mail: christian.kleinert@hs-anhalt.de
Phone: +49 3496 67 2559



Prof. Dr. Carola Griehl
Hochschule Anhalt
CAB

Mail: carola.griehl@hs-anhalt.de
Phone: +49 3496 67 2526

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



In Situ Quantification of Polyhydroxybutyrate in Photobioreactor Cultivations of *Synechocystis* sp. using an Ultrasound-Enhanced ATF-FTIR Spectroscopy Probe

Motivation

- PHB = sustainable alternative to petroleum-based plastics
- ATF-FTIR Probe with ultrasound particle trap as tool to quantify PHB and Glycogen *in situ*
- Non-destructive & real-time process analytics in photobioreactor cultivations

PHB from *Synechocystis* sp. – Why?

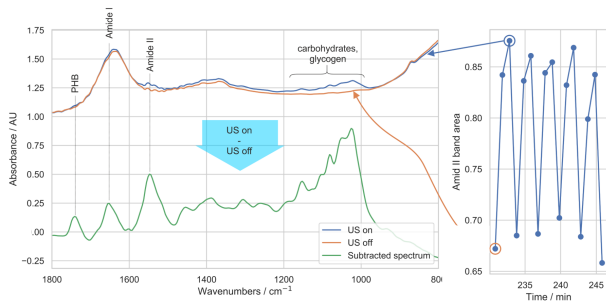
Synechocystis sp.

- CO₂ fixation
- PHB as carbon/energy storage
- Fast autotrophic growth

Polyhydroxybutyrate – PHB

- Belongs to polyhydroxyalkanoates
- Biocompatible, biodegradable
- Thermoplastic properties

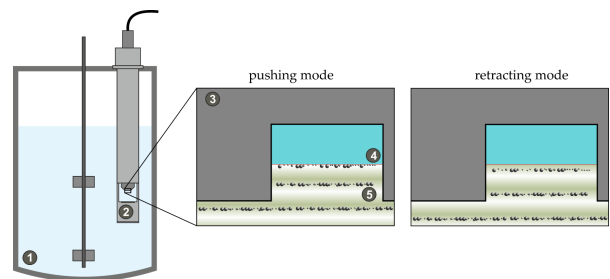
2. Ultrasound-Enhanced ATR-FTIR Spectra



Left: Subtraction of pushing state (blue) from retracting state (orange) spectra yields the pure spectra of *Synechocystis* sp. (green)

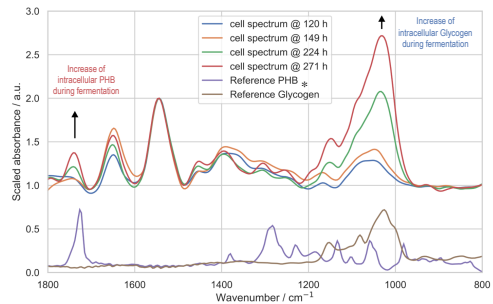
Right: Differences in Spectra in pushing and retracting state

1. Experimental Setup for the *In Situ* Quantification of PHB



- (1) Glass bioreactor with stirrer and CO₂ aeration
- (2) The soniccath add on in combination with the ReactIR 45 m diamond ATR probe
- (3) Detail of ATR probe tip (pushing and retracting mode)
- (4) & (5) US standing wave field catches cells in the pressure nodal points

3. In-line spectra of cells during fermentation



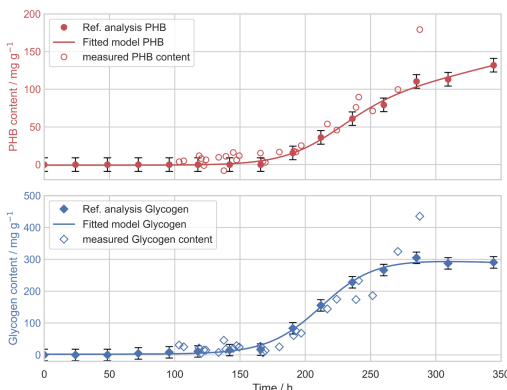
*Reference spectra of dry PHB and Glycogen powder, showing position of respective bands

- In-line spectra of cells at different time points
- PHB and glycogen content is increasing steadily during fermentation

4. *In situ* Quantification of PHB and Glycogen

- For characterization of PHB evolvement offline samples were taken and analyzed
- Offline references were used to perform a univariate calibration to fit a model to the fermentation

Analyte	Method	Adj. R ² [-]	LOQ [mgg ⁻¹]
PHB	Band integration (1705 – 1774 cm ⁻¹), baseline corrected	0.91	18.3
Glycogen	Band height at 1025 cm ⁻¹ , baseline corrected	0.90	71.2



Take Home Message

- PHB production after nitrogen limitation
- US trap was successfully utilized to enhance ATR-FTIR spectra quality
- *In-situ* quantification is less toxic and time intensive compared to state of the art offline quantification

→ Great potential as a real-time process analytical technology – PAT monitoring tool for PHB production

The AquaHealth Project

Bioactive molecules from microalgae for aquacultures

Sarah Löhn, Leonard Francke, Nils Wiczorek, Kerstin Kuchta

Background

- » Pathogenic microorganisms are a major threat for aquacultures.
- » Several microalgae species show a bioactive effect against bacteria, viruses or fungi.
- » Most microalgae do not grow axenic but are surrounded by different microorganisms.

Objective

The AquaHealth project aims to explore new bioactive compounds from microalgae and their specific microbiome as a precautionary treatment to prevent aquacultures from diseases. Within the project, the TUHH is dedicated to the scale up of cultivation and downstream processing of selected microalgae strains.

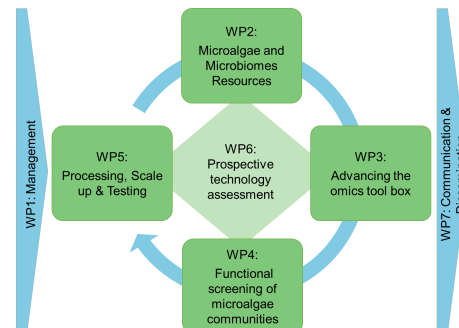


Figure 1: Structure of the AquaHealth project

Scale up

The cultivation of selected microalgae strains is scaled up to pilot scale (figure 2). For the first strain, different systems were applied in summer 2021 and the productivity as well as energy, nutrient and water consumption compared. Changes in the cellular and microbiome composition will be analysed and evaluated.

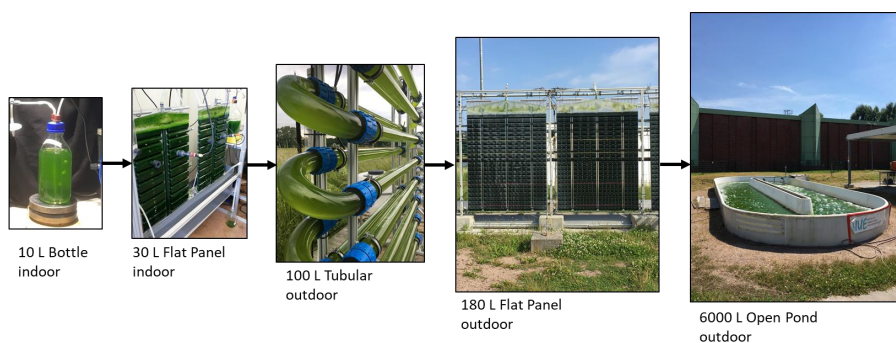


Figure 2: Scale up of cultivation applying different reactor systems at the Innovation Center in Hamburg-Reitbrook

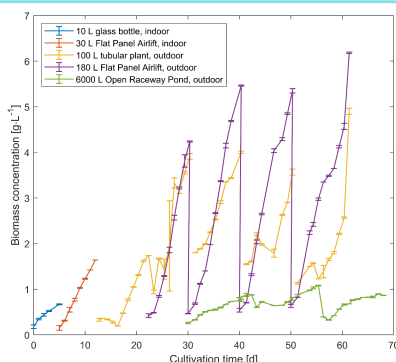


Figure 3: Biomass concentration over cultivation time during the scale up. The scale up took place subsequently in different systems starting in a 10 L bottle and ending in the 6000 L Open Raceway Pond.

Scale up - Results

The cultivation of the first microalgae strain showed mean productivities of 0.26, 0.46, and 0.04 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for the tubular reactor, flat panel airlift reactor (FPA), and open raceway pond (ORP), respectively. The highest biomass concentration was reached in the FPA with 6.18 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, followed by the tubular plant with 4.90 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the ORP with 1.08 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Downstream Processing

The choice of technologies in the single downstream processing steps depend on the microalgae strain and the desired product. Different methods for cell disruption and drying were tested at the TUHH and will be evaluated in terms of economics and impacts on the biomass composition, bioactivity, and product appearance.

Outlook

- » Comparison between multiple strains
- » Analysis of cellular composition
- » Evaluation of microbiome and bioactivity changes during the scale up and processing by the project partners
- » Product specification
- » Growth performance testing of microalgae biomass on rainbow trouts

Further information

The AquaHealth project started in May 2020 and is funded by the ERA-Net BlueBio Cofund on the Blue Bioeconomy, whose goal is to identify new bio-based products, improve existing ways of bringing bio-based products to the market and find new methods to increase value from blue bioeconomy.

Partners



The AquaHealth Project

Bioactive molecules from microalgae for aquacultures

Sarah Löhn, Leonard Francke, Nils Wiczorek, Kerstin Kuchta

Background

- » Pathogenic microorganisms are a major threat for aquacultures.
- » Several microalgae species show a bioactive effect against bacteria, viruses or fungi.
- » Most microalgae do not grow axenic but are surrounded by different microorganisms.

Objective

The AquaHealth project aims to explore new bioactive compounds from microalgae and their specific microbiome as a precautionary treatment to prevent aquacultures from diseases. Within the project, the TUHH is dedicated to the scale up of cultivation and downstream processing of selected microalgae strains.

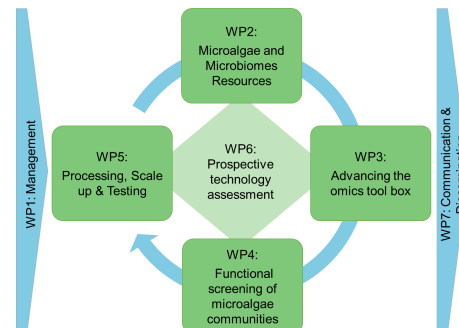


Figure 1: Structure of the AquaHealth project

Scale up

The cultivation of selected microalgae strains is scaled up to pilot scale (figure 2). For the first strain, different systems were applied in summer 2021 and the productivity as well as energy, nutrient and water consumption compared. Changes in the cellular and microbiome composition will be analysed and evaluated.

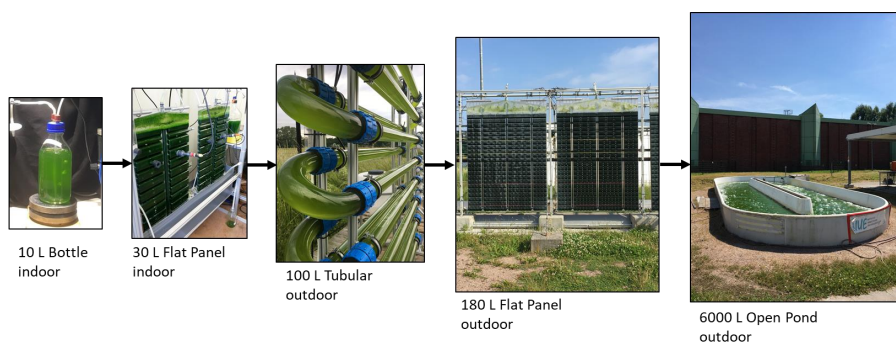


Figure 2: Scale up of cultivation applying different reactor systems at the Innovation Center in Hamburg-Reitbrook

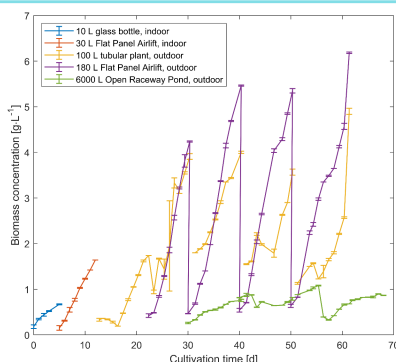


Figure 3: Biomass concentration over cultivation time during the scale up. The scale up took place subsequently in different systems starting in a 10 L bottle and ending in the 6000 L Open Raceway Pond.

Scale up - Results

The cultivation of the first microalgae strain showed mean productivities of 0.26, 0.46, and 0.04 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for the tubular reactor, flat panel airlift reactor (FPA), and open raceway pond (ORP), respectively. The highest biomass concentration was reached in the FPA with 6.18 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, followed by the tubular plant with 4.90 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the ORP with 1.08 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Downstream Processing

The choice of technologies in the single downstream processing steps depend on the microalgae strain and the desired product. Different methods for cell disruption and drying were tested at the TUHH and will be evaluated in terms of economics and impacts on the biomass composition, bioactivity, and product appearance.

Outlook

- » Comparison between multiple strains
- » Analysis of cellular composition
- » Evaluation of microbiome and bioactivity changes during the scale up and processing by the project partners
- » Product specification
- » Growth performance testing of microalgae biomass on rainbow trouts

Further information

The AquaHealth project started in May 2020 and is funded by the ERA-Net BlueBio Cofund on the Blue Bioeconomy, whose goal is to identify new bio-based products, improve existing ways of bringing bio-based products to the market and find new methods to increase value from blue bioeconomy.

Partners



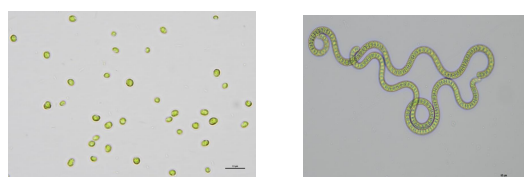
Kolos MAKAY¹, Carola GRIEHL², Claudia GREWE¹,

¹Work and Research group of Bioprocess Engineering, Anhalt University of Applied Sciences Köthen, Germany

²Work and Research Group of Biochemistry and Competence Centre Algal Biotechnology, Anhalt University of Applied Sciences, Köthen, Germany

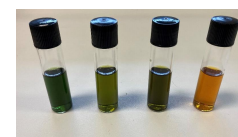
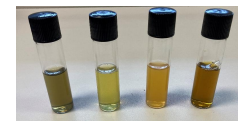
Introduction

Microalgae-based extracts are not just incorporated in formulations, moisturizing, emulsifying and carrying agents but recently phytochemical extracts give the subject in the screening process for new antioxidants, antidiabetics and other pharmacological active molecules.^{1,2} In this study, hydrophilic and lipophilic extracts were produced from four microalgae species of commercial interest namely *Arthrospira platensis*, *Nannochloropsis granulata*, *Phaeodactylum tricornutum* and *Tetrademus wisconsinensis*.



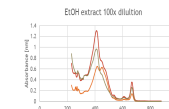
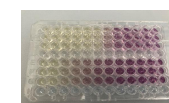
Hydrophilic extraction

Lipophilic extraction



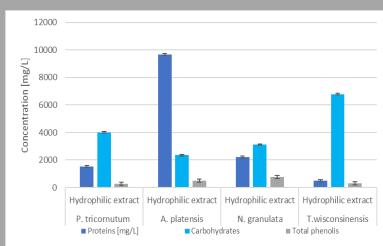
Methodology

The corresponding extracts were characterized biochemically. The protein, carbohydrate, total phenolics, carotenoids, flavonoids content was determined and the antioxidant and antidiabetic activities were also assessed via *in vitro* spectrophotometric-based pharmacological assays.



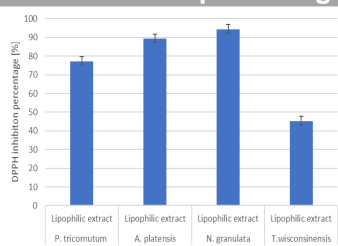
Results and Discussion

Biochemical composition

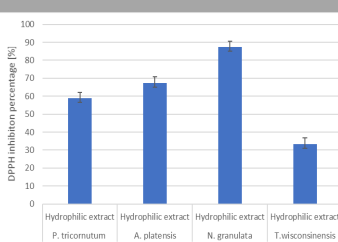


- The hydrophilic *A. platensis* extract had the highest protein concentration, while the *T. wisconsinensis* hydrophilic extract was highly concentrated in carbohydrates.
- The total phenolic concentration of the produced extract varied less, although the *N. granulata* based hydrophilic extract was the most concentrated.

DPPH inhibition percentage

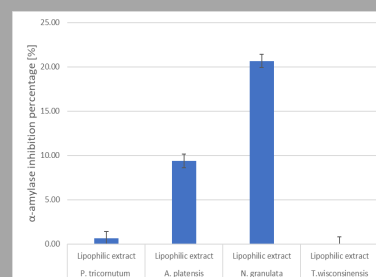


All of the extracts exhibited high antioxidant capacity.



- Neutralization the effects of ROS, thus help in preventing diseases.
- Application as additives in food processing to prevent food spoilage.
- Antioxidants have been religiously used as co-treatment of patients in hepatocellular carcinoma.
- Cosmeceutical applications, especially in skin protection and ageing.

α -amylase inhibition percentage



The lipophilic extracts from *N. granulata* and *A. platensis* clearly exerted inhibition on α -amylase which suggesting their potential use in a variety of food and non-food applications.

- Strategy for the treatment of disorders in carbohydrate uptake, such as diabetes and obesity, as well as, dental caries and periodontal diseases.
- α -amylase inhibitors can also restrict pest that relies on the starch of crops, therefore could be considered as alternative agrochemicals.

References

- Lauritano C, Andersen JH, Hansen E, et al. Bioactivity Screening of Microalgae for Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anticancer, Anti-Diabetes, and Antibacterial Activities. *Front Mar Sci*. 2016;03(MAY):68.
- Yarkent Ç, Gürlek C, Oncel SS. Potential of microalgal compounds in trending natural cosmetics: A review. *Sustain Chem Pharm*. 2020;17(September).



Kolos Makay, M.Sc.
PhD Student and Research Associate
Tel: +49 151 59034079
Email: kolos.makay@hs-anhalt.de



Prof. Dr. Carola Griehl
Head of Competence Center Algal Biotechnology
Tel: +49 (0)3496 67 2526
Email: carola.griehl@hs-anhalt.de



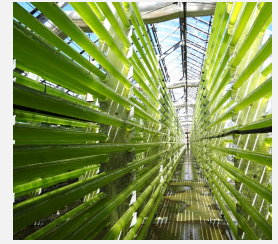
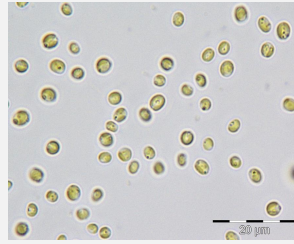
Prof. Dr. Claudia Grewe
Professor of Bioprocess Engineering
Tel: +49 151 24015473
Email: claudia.grewe@hs-anhalt.de

Volumetric biomass productivity of *Nannochloropsis granulata* in different lab-scale photobioreactors

K. Makay, C. Grewe

Work and Research group of Bioprocess Engineering, Anhalt University of Applied Sciences, Köthen, Germany

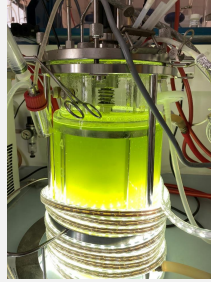
The commercial interest in the genus *Nannochloropsis*, or so called marine *Chlorella*, has risen since they accumulate high lipid contents per cell, high EPA contents and show comparatively high biomass productivities. This Eustigmatophyceae has a rather small cell size of 2, ..., 5µm; cells are free-floating and easy to ingest by zooplankton and fish larvae, representing a major reason for its extensive use in aquaculture. As other microalgae, *Nannochloropsis* spp. contain variable contents of proteins (24, ..., 52%), lipids (16, ..., 50%), EPA (3, ..., 5%), and carotenoids (0.4, ..., 0.6%)¹. In this study *Nannochloropsis granulata* was cultivated in different type of photobioreactors (PBRs) (e.g. Bubble columns, Stirred Tank Reactors (STRs), Tubular PBR) and the obtained volumetric biomass productivities were compared. The performance of the different PBRs were analysed on the basis of classical bioprocess engineering parameters that could shed an additional light on further investigations of photoautotrophic up-stream processes.



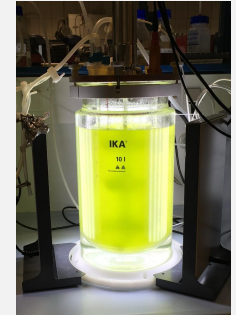
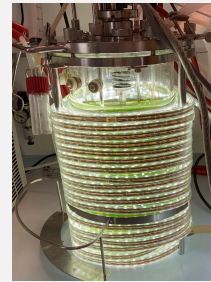
Light microscope picture of *N. granulata* (1000x magnification, left) production of *Nannochloropsis granulata* in tubular PBRs (right).



2 L STR with LED-sleeves



5 L STR with LED-coil



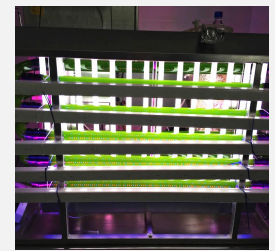
10 L STR with LED-panels



1.7 L Bubble columns with LED-tubes

Parameter	Unit	Bubble column		STR			Tubular PBR
Bioreactor volume	L	1.7	4.5	2	5	10	30
Photosyn. active volume	L	1.7	4	1.7	4	10	17.3
Inner diameter	m	0.08	0.1	0.098	0.155	0.20	0.05
H/D ratio	[-]	5.00	5.21	2.24	1.81	1.52	-
S/V Ratio	m ⁻¹	66.0	25.25	88.8	45.25	24.88	51.6
β-value (vvm)	L L ⁻¹ min ⁻¹	0.30	0.45	0.1	1	0.1	0.002* ¹
k _{1a} CO ₂	h ⁻¹	1.9	-	7.4	-	-	0.02
k _{1a} O ₂	h ⁻¹	-	-	112	-	-	-
Tipp Speed/ Flow velocity	m s ⁻¹	-	-	0.48	2.3	0.47	0.72
Reynolds number	[-]	-	-	3.8·10 ⁵	-	-	3.2·10 ⁴
Mixing time	s	9.0	-	6.8	-	-	65.4
Photon Flux Density (PFD)	µE m ² s ⁻¹	131	156	1150	780	612	338

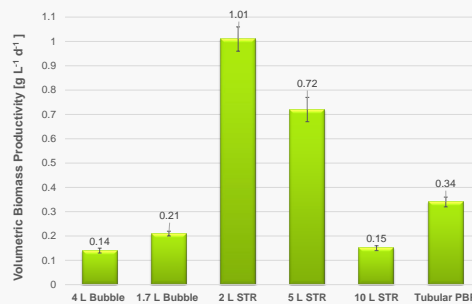
*¹ In the Tubular PBR pure CO₂ was injected upon a pH increased above the set value while in all the reactor types CO₂ was injected with constant 2% (v/v).



30 L Tubular PBR with LED-tubes

- Geometric data shows variability in the H/D ratio which is crucial for scalability.
- S/V ratio is of special importance for algae cultivation, as the main power input happens through the photosynthetically active surface. It ranges up to 100 m⁻¹ for tubular PBRs but goes down for STRs at scale-up.
- k_{1a} for CO₂ is not frequently reported, while the k_{1a} for O₂ is low compared to the typical reported range of heterotrophic fermentations.
- The plug flow profile of Tubular PBRs leads to increased mixing times (17 to 100 m long tubes), but the high Reynolds numbers and turbulence leads to sufficient light availability for the cells.

- The highest volumetric biomass productivities were obtained in the 2 and 5 L STRs under the given conditions*².
- The approx. 5 times higher volumetric biomass productivity, compared to bubble column of similar photosyn. active volume, is the resultant of the 8 times higher PFD and 25% higher S/V ratio. The interrelationship of these 2 parameters led to higher photon availability of the algae cells in the suspension, thus facilitated growth.
- This interrelationship also explains the 7 fold drop in the volumetric biomass productivity of the 10 L STR.



*² The experiments were conducted with light adapted cultures under light limited conditions in fed-batch operation mode.

- Further investigations on pump frequencies and the resulting flow velocities are required, as a clear dependency of the volumetric biomass productivity was observed in tubular PBRs.
- Next to the different bioreactor design attributes, the results also showed that light and productivity can be correlated and appears to have a high effect on the volumetric biomass productivity.
- The conducted experiments also revealed, based on the obtained biomass productivity results, the applicability of the different types of bioreactors for different purposes (e.g. inoculum production, screening).
- Although STRs are not frequently used for algae cultivation, these experiments confirm their suitability and advantage for lab-scale biomass production and photoautotrophic cultivation characterization.

References

- Weise T, Grewe C, Pfaff M. Experimental and Model-Based Analysis to Optimize Microalgal Biomass Productivity in a Pilot-Scale Tubular Photobioreactor. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(May):1-18.



Kolos Makay, M.Sc.
PhD Student and Research Associate
Tel: + 49 151 59034079
Email: kolos.makay@hs-anhalt.de



Prof. Dr. Claudia Grewe
Professor of Bioprocess Engineering
Tel: + 49 151 24015473
Email: claudia.grewe@hs-anhalt.de

Kultivierung des PHB-produzierenden Cyanobakteriums *Synechococcus leopoliensis* - Nutzung von Abwasser und Hochskalierung

Marina Mariotto, Sophia Egloff, Simone Vögeli-Kummert, Dominik Refardt

Abstract

Das PHB-produzierende Cyanobakterium *Synechococcus leopoliensis* (SAG 1402-1) wurde in verschiedenen abwasserbasierten Medien kultiviert. Es wurden aufbereitetes flüssiges Gärgut und Wasser aus einer Aquakultur-Kreislaufanlage (steril und nicht steril) verwendet. Die Medien wurden jeweils auf die gleiche Konzentration wesentlicher Nährstoffe wie im Kontrollmedium (Z-Medium) eingestellt. Nach zwei Wochen Kultivierung wurden die höchsten Biomassekonzentrationen und der höchste PHB-Anteil in sterilisiertem Aquakulturwasser (1 g l⁻¹ Trockenmasse, 0.5% PHB) und Z-Medium (1.3 g l⁻¹ TM, 0.3% PHB) erreicht. Anschliessend wurde *S. leopoliensis* in Z-Medium auf einem offenen Dünnschichtreaktor (Abbildung 1) kultiviert. Dabei wurde nach zwei Wochen eine Trockensubstanz von 2.1 g l⁻¹ erreicht, wobei die Wachstumsrate maximal 0.4 g l⁻¹ d⁻¹ betrug. Eine anschliessende PHB-Akkumulation im offenen System war wegen einer Kontamination mit Fressfeinden nicht erfolgreich. *Synechococcus leopoliensis* kann erfolgreich in verschiedenen Abwässern kultiviert werden und auch eine Kultivierung im grösseren Massstab in einem offenen System ist möglich. Im nächsten Schritt wird nun Abwasser auf dem offenen Dünnschichtreaktor eingesetzt.

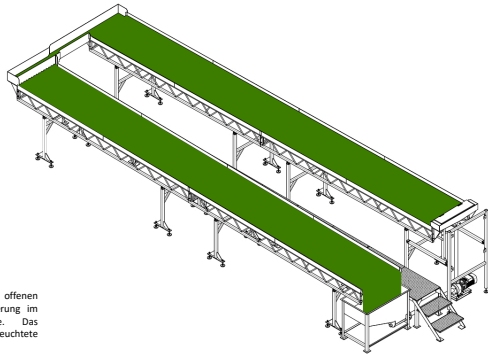


Abbildung 1: Schematische Darstellung des offenen Dünnschichtreaktors, wie er für die Kultivierung im grösseren Massstab verwendet wurde. Das Kultivierungsvolumen beträgt 200 L und die beleuchtete Fläche beträgt 18 m².

Einleitung

Aus der Biomasse und ausgesuchten Stoffwechselprodukten von Mikroalgen und Cyanobakterien lassen sich wertvolle Produkte herstellen, die in verschiedensten Industrien eingesetzt werden können.¹ So können beispielsweise Biopolymere zu Bioplastik verarbeitet werden und erdölbasierte Kunststoffe ersetzen. Ein vielversprechendes Biopolymer, das mit Cyanobakterien produziert werden kann, ist Polyhydroxybuttersäure (PHB). PHB verfügt über ähnliche Eigenschaften wie Polypropylen (PP), ist aber im Gegensatz zu PP biologisch abbaubar.² PHB wird von gewissen Cyanobakterien synthetisiert und als Energie- und Kohlenstoffspeicher eingesetzt.³ Für eine kommerzielle Nutzung der PHB-produzierenden Cyanobakterien müssen Kultivierungen im grösseren Massstab realisiert werden und dabei möglichst kosteneffizient sein. Noch ist die Hochskalierung der Kultivierung, insbesondere in offenen Systemen, nicht stabil und der Dünger- und Energiebedarf trägt massgeblich zu hohen Kosten bei.⁴

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Kultivierung von PHB-produzierenden Cyanobakterien einerseits durch das Verwenden von Abwässern weniger düngerintensiv zu gestalten und andererseits erste Experimente im grösseren Massstab in einem offenen System durchzuführen.

Material und Methoden

Nutzung von Abwasser

Der Cyanobakterien-Stamm *Synechococcus leopoliensis* (SAG 1402-1) wurde in einem Volumen von 50 ml in drei unterschiedlichen abwasserenthaltenden Medien kultiviert. Es wurden Wasser aus einer Aquakultur-Kreislaufanlage (steril und nicht steril) und aufbereitetes flüssiges Gärgut⁵ verwendet und mit einem Standardmedium (Z-Medium) verglichen. Die Konzentration an verfügbarem Stickstoff wurde bei allen Medien gleich eingestellt wie in der Kontrolle (Z-Medium). Die Experimente dauerten jeweils drei Wochen: zwei Wochen Wachstumsphase und eine Woche PHB-Akkumulation durch Stickstoffentzug. Das Wachstum wurde über die optische Dichte (750 nm) und das Trockengewicht (TM) gemessen. Der PHB-Gehalt wurde mittels HPLC gemessen.⁶

Hochskalierung

Synechococcus leopoliensis wurde in einem offenen Dünnschichtreaktor (200 L, 18 m²) mit Z-Medium während zwei Wochen kultiviert. Anschliessend wurde durch Stickstoffentzug eine einwöchige PHB-Akkumulationsphase eingeleitet. Das Wachstum wurde mit optischer Dichte (750 nm) und Trockengewicht gemessen. Der PHB-Gehalt wurde mittels HPLC gemessen.

Resultate

Nutzung von Abwasser

In beiden Abwässern konnte *S. leopoliensis* erfolgreich kultiviert werden (Abbildung 2). Nach der zwei-wöchigen Wachstumsphase wurden im sterilisierten Aquakulturabwasser mit 1 g l⁻¹ und im Z-Medium mit 1.3 g l⁻¹ die höchsten Trockenmassen gemessen. Die Kultivierung mit flüssigem Gärgut erreichte 0.4 g l⁻¹. Die Kultivierung in nicht-sterilisiertem Aquakulturwasser war nicht erfolgreich, da fremde Grünalgen (*Scenedesmus sp.*) die Kultur dominierten. Der PHB-Gehalt in der Trockenmasse war in Z-Medium mit 0.3 % und sterilem Aquakulturabwasser mit 0.5 % am höchsten.

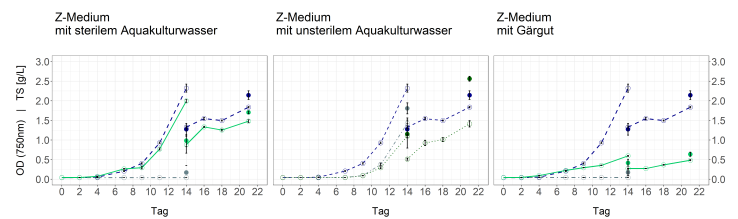


Abbildung 2: Wachstum von *S. leopoliensis* (grün, ausgezogen) in (von links nach rechts) sterilisiertem und nicht-sterilisiertem Aquakulturwasser und flüssigem Gärgut. Zum Vergleich sind Negativkontrollen (kein Inokulum; grau) und Positivkontrollen (Z-Medium; blau gestrichelt) dargestellt. Die Kultivierung in nicht-sterilisiertem Aquakulturwasser (Mitte) war nicht erfolgreich, da *Scenedesmus sp.* die Kultur dominierte (dunkelgrün, gepunktet). Dargestellt sind Mittelwerte (3 Replikate) mit Standardabweichung.

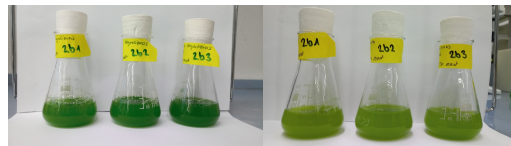


Abbildung 3: *S. leopoliensis* in Z-Medium mit sterilisiertem Aquakulturwasser nach der Wachstumsphase (links) und nach der PHB-Akkumulation (rechts).

Hochskalierung

Die Kultivierung von *S. leopoliensis* in Z-Medium ist im grösseren Massstab in einem offenen Dünnschichtreaktor möglich (Abbildung 4). Nach zwölf Tagen wurden 2.1 g l⁻¹ TM erreicht. Die Wachstumsrate während der produktivsten Zeit betrug 0.4 g l⁻¹ d⁻¹ (Abbildung 5). Die PHB-Akkumulation im offenen Reaktor war wegen einer Kontamination mit Fressfeinden (Flagellaten und Ciliaten) nicht erfolgreich.



Abbildung 4: Kultivierung von *Synechococcus leopoliensis* im offenen Dünnschichtreaktor.

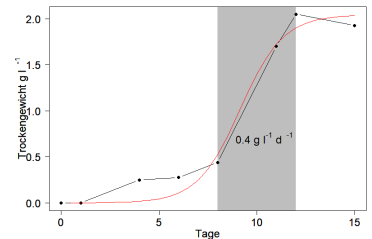


Abbildung 5: Zunahme des Trockengewichtes über die Zeit (schwarz). Die rote Kurve ist eine gefittete logistische Wachstumsfunktion dar. Die produktivste Periode wurde nach einer Woche erreicht (graus Rechteck).

Diskussion und Schlussfolgerung

Synechococcus leopoliensis (SAG 1402-1) kann in den getesteten Abwässern im Labormassstab kultiviert werden und eine PHB-Produktion findet statt. Die Kultivierung in sterilisiertem Aquakulturwasser erreichte ein Produktivität die mit mineralischem Medium vergleichbar ist, während die Nutzung von flüssigem Gärgut tiefere Werte erreichte. Letzteres könnte darin begründet sein, dass der Stickstoff im Gärgut primär als Ammonium vorliegt.⁷ Eine Hochskalierung in einem offenen Kultivierungssystem ist möglich. Noch offen ist, ob auch die anschliessende PHB-Akkumulation möglich ist.

Die hauptsächliche Herausforderung bei der Nutzung von Abwasser und der offenen Kultivierung ist das Vorhandensein von Fressfeinden und anderen Mikroalgen. Beides führt zu einem Einbruch der *S. leopoliensis* Kultur.

Zurzeit werden weitere Kultivierungen von *S. leopoliensis*, bei gleichzeitiger Verwendung von Aquakulturwasser und flüssigem Gärgut, auf dem offenen Dünnschichtreaktor durchgeführt.

Referenzen:
 1 Liang, M.-H., Wang, L., Wang, Q., Zhu, J., & Jiang, J.-G. (2019). High-value bioproducts from microalgae: Strategies and progress. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(15), 2423-2441. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1455030>
 2 Davies, E. A. (1988). Polyhydroxybutyrate: An intriguing biopolymer. *Bioresource Reports*, 8(6), 537-547. <https://doi.org/10.1002/brf.0117352>
 3 Obraca, S., Sedbeck, P., Kroganek, V., Monev, F., Hrabarova, K., Samek, O., Kuzna, D., Benesova, P., & Marova, I. (2016). Accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing. *PLoS ONE*, 11(6), e0157778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157778>
 4 Arim, D. M., Garcia, J., & Uggetti, E. (2020). Production of polymers by cyanobacteria grown in wastewater: Current status, challenges and future perspectives. *New Biotechnology*, 55, 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.09.001>
 5 Swiss Farmer Power Iwail. (2021). Recyclingdünger | SwissFarmerPower: Die EnergieZukunftAnlage in Iwail. <https://www.sfpw.ch/energie/recyclingduenger/>
 6 Caspary, R., Du, W., Olivari, G., Pollo, A., Hellingwerf, K. J., Marzocchella, A., & Branco dos Santos, F. (2017). Genetic engineering of *Synechocystis* sp. PCC6803 for poly-β-hydroxybutyrate overproduction. *Algal Research*, 25, 117-127. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.013>
 7 Zhang, Y., Li, T., Yu, X., Bales, P. D., Dang, T., & Chen, S. (2013). High-density fed-batch culture of a thermotolerant microalgae *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. *Applied Energy*, 108, 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.02.059>

Redox Enzymes from Algae as Innovative Tools in the Bio-Industry

Maria Mucke¹, Timo Jensen², Dominik Bents², Steffen Hennig², Matthias Peipp³, Stefan Veltel¹

¹Hochschule Bremen, Bremen/Germany, ²Coastal Research & Management GbR, Kiel/Germany, ³Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel/Germany

Introduction

Redox enzymes serve as innovative tools in bio-industry. They catalyse electron transfer and thereby the oxidation of various substrates, which creates a wide spectrum of applications. The horseradish peroxidase (HRP), for instance, is extensively used as a marker enzyme in diagnostics. However, due to its high degree of post-translational modifications and thus insufficient recombinant production, HRP is still extracted from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots.

Using a proteo-transcriptomic approach, we strive to identify and characterize novel redox enzymes from nine different marine macroalgal species (*Saccharina latissima*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus*, *Chorda filum*, *Bryopsis plumosa*, *Furcellaria lumbricalis*, *Ahnfeltia plicata*, *Phyllophora crispa*, *Ceramium virgatum*) suitable for recombinant production. Different expression systems (*E. coli*, *P. pastoris*, mammalian cell lines) will be tested to produce competitive redox enzymes as well as antibody-enzyme constructs. Furthermore, a marine sequence database and protein repository will be established as an innovative tool for bio-industry.

Project plan

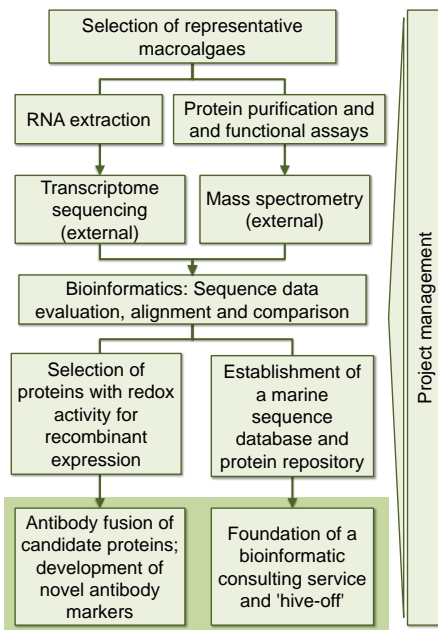


Fig. 1: Project plan and work packages of "REA".

Methods

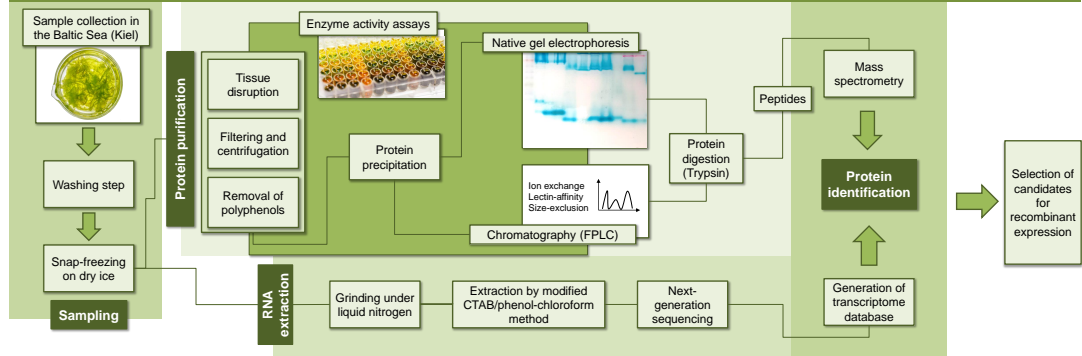


Fig. 2: Methods. The algal samples were collected in the Baltic Sea, washed and frozen on dry ice. For protein purification, samples were disrupted and prepared for protein fractionation by native gel electrophoresis and fast protein liquid chromatography (FPLC). After in-gel digestion, generated peptides were analyzed by mass spectrometry and identified by the generated transcriptome database, which was obtained by RNA-extraction and sequencing.

Results

I. Protein Purification & activity assays

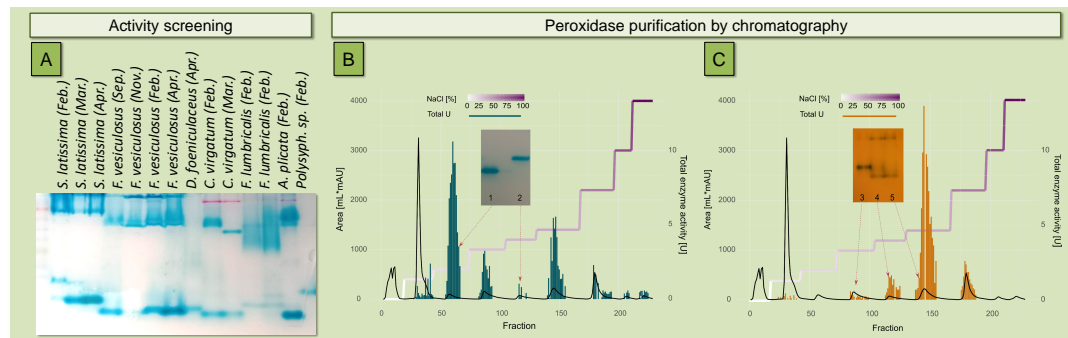


Fig. 3: Analysis of peroxidase activity assays. 10% Native PAGE of different algal samples (different species or different harvest time). Haem-peroxidases were visualized by Tetramethylbenzidine (A). Anion-exchange chromatogram of *Saccharina latissima* with stepwise elution of NaCl (100 % NaCl = 1M NaCl) and Haem-Peroxidase activity (B) as well as Haloperoxidase activity in fractions (C); 1 Unit = nmol/min. Native gel electrophoresis of concentrated active fractions revealed different electrophoretic bands after treatment with TMB (1, 2) and Thymolblue (3, 4, 5).

II. Transcriptomics

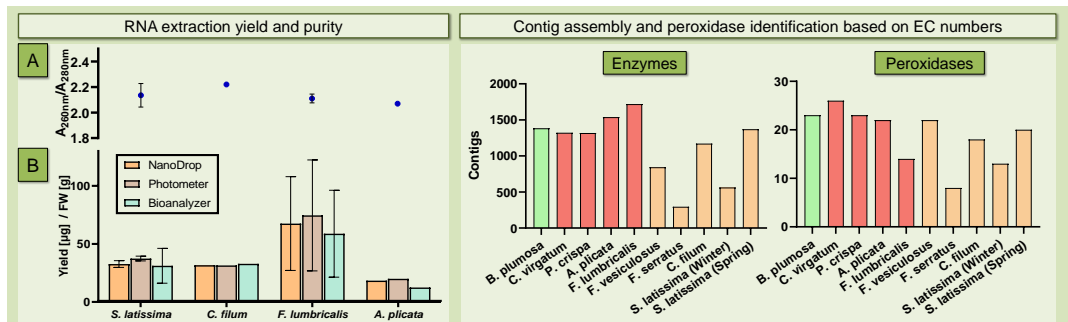


Fig. 4: RNA purity (A) and yield (B) obtained by a modified CTAB/Phenol-chloroform method. Absorbance ratios measured on a NanoDrop spectrophotometer indicate high purity of extracted RNA. *S. latissima* and *F. lumbricalis* were extracted as biological triplicates collected between December and May in the Baltic Sea.

Fig. 5: Number of assembled contigs showing homology to known enzyme classes and peroxidases. Contigs were de novo-assembled after quality and adapter trimming, read pair alignment and deduplication by Qiagen CLC assembly Cell software (v5.2.1). Contigs were considered as enzymes if they showed a positivity rate of at least 80% when BLASTed against UniProt-enzymes entries. Hits with EC numbers 1.11.1.* were counted as peroxidase.

Acknowledgements

Funding
This project is supported by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF).

Further Acknowledgements

Dr. Levent Piker Dr. Robert Taube Verena Sandow
Dr. Yu-Chen Wu Dr. Sven Petersen

Contact

Prof. Dr. Stefan Veltel
Hochschule Bremen
Neustadtswall 27
28199 Bremen
stefan.veltel@hs-bremen.de

Conclusions & future outlook

We established a workflow for the selection of novel algal peroxidases using a combined approach of protein purification from algal tissues with the generation of a large-scale transcriptome database. This protocol allows for the recombinant expression of biotechnologically relevant algal peroxidases in industrial scales.

- Improvement of protein yield in algae with high polysaccharide content
- Expression with and without antibody fusion
- Enzyme assay development with additional peroxidase substrates for higher sensitivity (fluorescence, luminescence)
- Construction of an algae enzyme database for bio-industry

Scale-up einer heterotrophen Algenfermentation als kosteneffiziente Produktionsplattform für den Lebensmittelmarkt

Lydia Rachbauer¹, Martin Lesniak¹, Corinna Jäger², Lisa Bindhofer², Markus Sadler³, Markus Neureiter³, Peter Pucher², Bernhard Drosig¹

BIOCONVERSION & BIOGAS SYSTEMS

Introduction

Die industrielle **Nutzung von Algenbiomasse** ist ein sehr **vielversprechendes und innovatives Gebiet**. Größter Nachteil sind dabei die **hohen Produktionskosten der Algenkultivierung**. Die heterotrophe Algenfermentation unter kontrollierten Bedingungen basiert auf organischen Kohlenstoffquellen als Alternative zur photoautotrophen Kultivierung. Dies erlaubt eine beträchtliche Biomasse-Ausbeutesteigerung und bildet mit der Extraktion hochpreisiger Produkte die Basis einer wettbewerbsfähigen Algenbiotechnologie. Die Produktpalette umfasst ungesättigte Fettsäuren (z.B.: Omega-3), sowie Proteine und Sekundärmetabolite, welche als Lebensmittelzusatzstoffe einen signifikanten Marktwert aufweisen.

Highlights

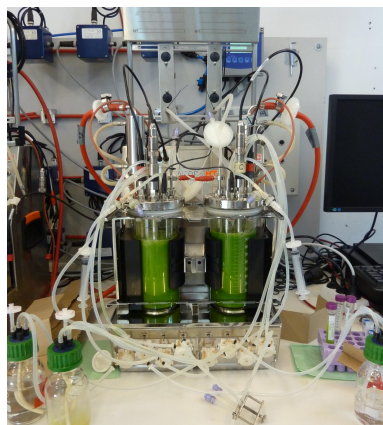
Biomasse-Ausbeutesteigerung bei heterotropher Kultivierung

- Ausbeute von 0.75 g/g
- Biomassekonzentration von 32.6 g/L
- Vollständige Glukoseumsetzung nach 69h

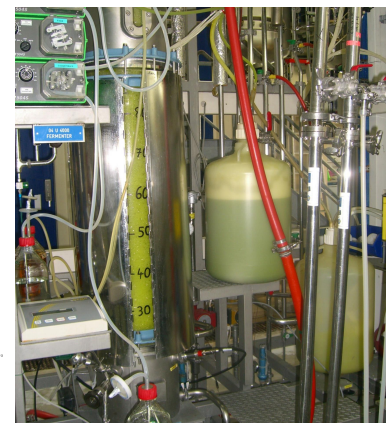
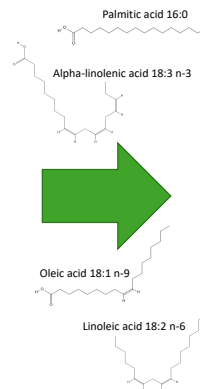
Erfolgreiche Umlegung optimierter Fermentationsparameter in 60L Maßstab bei vergleichbaren Ausbeuten

Proof-of-principle:

- Signifikante Omega-3-Produktion durch lebensmittelechte heterotrophe *Chlorella*-Stämme
- **Extraktionsmethode beeinflusst Fettsäuregehalt und -spektrum.**



Bench-top Fermentation (Parameteroptimierung)



60L Fermentation im Technikumsmaßstab

Selektion → Optimierung → Scale-up

Neben einer **umfassenden Selektion** von bekannten, **für den Lebensmittelbereich zugelassenen Algenstämmen**, wurde vor allem der Einfluss der Kultivierungsmethode und -parameter, sowohl auf die **Biomasseausbeute** als auch auf den **Fettsäuregehalt**, eingehend betrachtet. *Chlorella vulgaris* wurde als Referenzstamm zur Parameteroptimierung und das Scale-up herangezogen. Eine maximale Biomasseausbeute von 32.6 g/L bei vollständiger Glukoseumsetzung wurde nach 69 h mit einer Ausbeute von 0.75 g/g erzielt.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Fermentation auf Technikums-Maßstab umgelegt.

Zur **Fettsäurequantifizierung** wurden zwei Methoden verglichen: Extraktion mit Chloroform:Methanol in Kombination mit GC-MS, und Dichlormethan:Methanol mit GC-FID. Während sich der **Gesamt-Fettsäuregehalt** bezogen auf das Trockengewicht **bei C. vulgaris** kaum unterschied (**12.2-14.8%**), zeigte die **Extraktionsmethode** beim Vergleichsstamm *Schizochytrium mangrove* einen **deutlichen Einfluss**. Chloroform erzielte mit 42.3% das 2.5-fache der Dichlormethan-Extraktion. Es konnte somit gezeigt werden, dass die heterotrophe Algenkultivierung einen vielversprechenden Ansatz für den industriellen Scale-up zur Produktion kosteneffizienter Produkte darstellt.

BEST – Bioenergy and Sustainable Technologies GmbH

Head Office Graz
 Inffeldgasse 21b
 A 8010 Graz

T +43 5 02378-9201
 office@best-research.eu
 www.best-research.eu

¹ BEST - Bioenergy and Sustainable Technologies GmbH, Tulln/AT
² BDI - BioLife Science GmbH, Raaba-Grambach/AT

³ Universität für Bodenkultur, Wien; Department IFA-Tulln, Tulln/AT

ERHÖHUNG VON PRODUKTAUSBEUTEN IN CYANOBAKTERIEN DURCH KOLOKALISIERUNG VON REKOMBINANTEN ENZYMEN

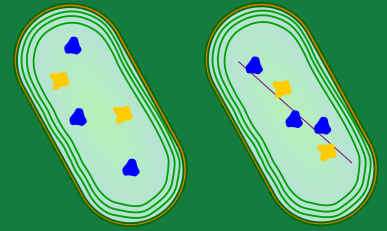
Alexandra M. Schirmacher¹, L. Hodgson², P. Verkade², Julie A.Z. Zedler¹

¹ Synthetische Biologie Photosynthetischer Organismen, Matthias-Schleiden-Institut, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland

² School of Biochemistry, University of Bristol, Großbritannien

DAS CYANOBAKTERIUM *SYNECHOCOCCUS ELONGATUS* UTEX 2973 KANN SYNTHETISCHE FILAMENTE INNERHALB DER ZELLE BILDEN.

DIESE FILAMENTE KÖNNEN ALS GERÜST FÜR HETEROLOGE ENZYME VERWENDET WERDEN UND HABEN DADURCH DAS POTENTIAL, DEREN AKTIVITÄT ZU ERHÖHEN.



klassisch vs. kolokalisiert

MOTIVATION

Zum Schutz der Umwelt ist die Wirtschaft auf die Umstellung auf nachhaltige Produktionsmethoden angewiesen. Cyanobakterien (Blaualgen) sind für die Herstellung von hochwertigen Chemikalien, Pharmazeutika und anderen Produkten eine vielversprechende Lösung, da sie Kohlenstoffdioxid aus der Luft fixieren und direkt in diese Produkte umwandeln können. Sie benötigen dafür keine weiteren Kohlenstoffquellen und konkurrieren nicht mit der Nahrungsmittelproduktion um fruchtbare Böden.

Produktausbeuten sind oftmals jedoch zu gering um mit herkömmlichen Herstellungsverfahren konkurrieren zu können. Deshalb möchten wir, mit Hilfe der synthetischen Biologie, Cyanobakterien zu effizienteren Produktionsplattformen machen. Um dies zu erreichen, sollen die Enzyme eines heterologen Biosyntheseweges in der Zelle räumlich organisiert und mit Hilfe eines Proteingerüsts kolokalisiert werden. Es wird erwartet, dass dies durch erhöhte lokale Substratkonzentrationen die katalytische Effizienz der Enzyme und damit die Produktausbeuten erhöht.

EXPERIMENTELLER ANSATZ

Das schnell wachsende Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 (Generationszeit ~ 2 h; Yu et al. 2015) wurde mit replikativen Plasmiden transformiert, die die Expression eines filamentformenden Proteins und *mCitrine* in der Zelle ermöglichen (Abb.1). Es wurde bereits gezeigt, dass in Zellen von *E. coli* Filamente mit diesem Protein gebildet werden können (Lee et al. 2018, Parsons et al. 2010). Wir haben in einem ersten Schritt untersucht, ob dies auch in UTEX 2973 der Fall ist und in einem weiteren, ob die Filamente als Gerüst für andere Proteine genutzt werden können. Dazu wurde als „Proof of Concept“ *mCitrine* mit einem Enkapsulationspeptid (EP) fusioniert, das eine Interaktion mit den Filamenten vermitteln soll. Insgesamt wurden 6 Transformanten mit den Konstrukten in Abb. 1 hergestellt. Konstrukt e dient der alleinigen Expression des Filamentproteins; Konstrukt a der Ko-Expression von Filament- und Cargoprotein. Die anderen Konstrukte dienen als Kontrollen. Die Phänotypen wurden hinsichtlich Wachstum, Fluoreszenz und Filamentbildung charakterisiert. Des Weiteren wurden die Zellproteine isoliert und auf eine Interaktion zwischen Filament und Cargo hin untersucht.

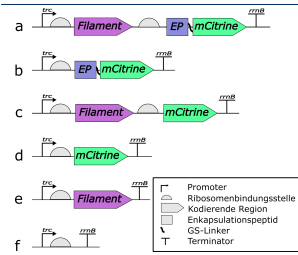


Abbildung 1 Genetische Konstrukte für die Ko-Expression von Filament- und mCitrine.

BILDUNG VON FILAMENTEN

Die alleinige Expression des Gens für das Filamentprotein (Konstrukt 1e) führte zu der Bildung von Nanofilamenten innerhalb der Zelle (Abb. 2b). Diese Filamente stellen wahrscheinlich ein Bündel mehrerer kleinerer Filamente dar, die sich in der Zelle zusammenlagern. Jedes Filament besteht aus vielen Kopien des Filamentproteins, die durch elektrostatische Wechselwirkungen assemblieren.

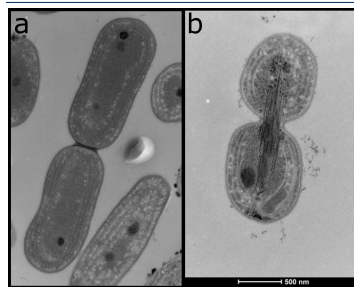


Abbildung 2 Elektronenmikroskopische Aufnahme von (a) UTEX 2973 Negativkontrolle und (b) filamentbildenden Transformanten.

WACHSTUM UND FLUORESCENZ

Die Stämme, die mit denen in Abb. 1 gezeigten Konstrukten transformiert worden waren, zeigten ähnliche Wachstumsraten untereinander; die Bildung der Filamente beeinträchtigte das Wachstum der Zellen nur geringfügig (Abb. 3a).

Die gleichzeitige Bildung von *mCitrine* führte zu einer stabilen Fluoreszenz über mehrere Tage. Die alleinige Expression von *EP-mCitrine* zeigte eine besonders hohe Fluoreszenz, was durch eine mögliche Selbstinteraktion des EP verursacht sein könnte. Die Fluoreszenz des Stammes, der gleichzeitig auch das Filament bildet, war weniger stark und eher vergleichbar zu den Stämmen mit *mCitrine* ohne EP. Der Unterschied in der Fluoreszenz zwischen *EP-mCitrine* mit und ohne Filament deutet bereits auf eine gegenseitige Einflussnahme der Proteine hin.

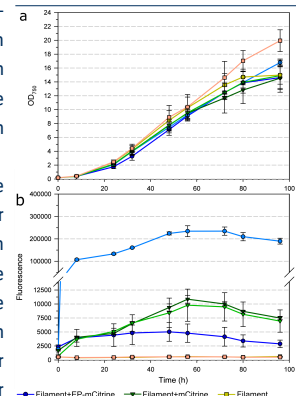


Abbildung 3 Wachstum (a) und Fluoreszenz (b) von UTEX 2973 während Expression von Genen für das Filamentprotein und mCitrine mit oder ohne EP kodieren.

NUTZUNG DER FILAMENTE ALS GERÜST

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktionen zwischen Filament- und Cargoprotein wurden die Proteinfractionen der Stämme mit Filamentprotein und *mCitrine* mit EP und ohne EP (Konstrukte 1a und 1c) auf einem Saccharose-Gradienten dichteabhängig aufgetrennt. Die entstandenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abb. 4). Das Filamentprotein migrierte bei beiden Stämmen in höhere Saccharose-Konzentrationen (Abb. 4e, f). Das *mCitrine* dagegen war bei dem Stamm ohne EP sehr stark in der 10% Saccharose-Schicht vertreten, aber nicht in hohen Saccharose-Konzentrationen. Das mit dem EP fusionierte *mCitrine* dagegen wurde auch in der 60% Saccharose-Schicht nachgewiesen. Da nur größere Proteinkomplexe in die höheren Konzentrationen migrieren können, kann hier von einer erfolgreichen Interaktion zwischen Filament- und Cargoprotein ausgegangen werden.

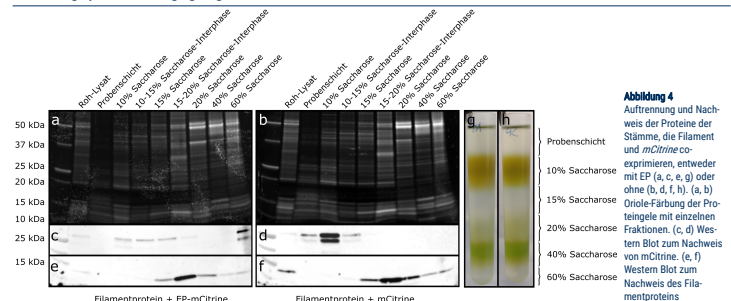


Abbildung 4 Auftrennung und Nachweis der Proteine der Stämme, die Filament und mCitrine co-exprimieren, entweder mit EP (a, c, e, g) oder ohne (b, d, f, h). (a, b) Ortole-Färbung der Proteingele mit einzelnen Fraktionen, (c, d) Western Blot zum Nachweis von mCitrine, (e, f) Western Blot zum Nachweis des Filamentproteins.

LITERATURANGABEN

Lee, M. J., Mantell, J., Hodgson, L., Alibhai, D., Fletcher, J. M., Brown, I. R., ... Warren, M. J. (2018). Engineered synthetic scaffolds for organizing proteins within the bacterial cytoplasm. *Nature Chemical Biology*, 14(2), 142–147.
Parsons, J. B., Frank, S., Bhella, D., Liang, M., Prentice, M. B., Mulvihill, D. P., & Warren, M. J. (2010). Synthesis of Empty Bacterial Microcompartments, Directed Organelle Protein Incorporation, and Evidence of Filament-Associated Organelle Movement. *Molecular Cell*, 38(2), 305–315.
Yu, J., Liberton, M., Clifton, P. F., Head, R. D., Jacobs, J. M., Smith, R. D., ... Pakrasi, H. B. (2015). *Synechococcus elongatus* UTEX 2973, a fast growing cyanobacterial chassis for biosynthesis using light and CO₂. *Scientific Reports*, 5, 8132.



E-Mail:
Alexandra.Schirmacher@uni-jena.de



FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA

Internal illumination to overcome the cell density limitation in the scale-up of whole-cell photobiocatalysis

Jelena Spasic^{1,2,3*}, Markus Hobisch^{1,4}, Lenny Malihan-Yap¹, Giovanni Barone^{1,2}, Kathrin Castiglione⁵, Paula Tamagnini^{2,3}, Selin Kara⁴, Robert Kourist¹

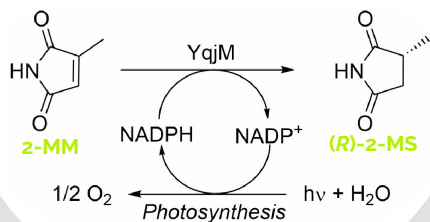
¹Institute of Molecular Biotechnology, Graz University of Technology, NAWI Graz, BioTechMed, Graz, Austria, ²i3S – Instituto de Investigação e Inovação em Saúde Universidade do Porto & IBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular, Porto, Portugal, ³Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal, ⁴Biocatalysis and Bioprocessing Group, Department of Biological and Chemical Engineering, Aarhus University, Aarhus, Denmark, ⁵Institute of Bioprocess Engineering, Department of Chemical and Bioengineering, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

*jelena.spasic@ibmc.up.pt

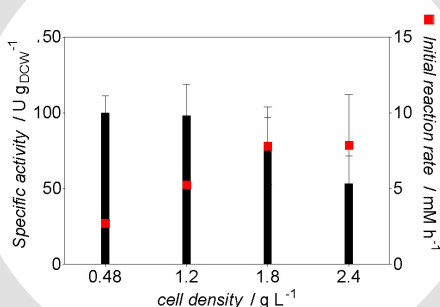
Introduction

Cyanobacteria have the capacity to use photosynthesis to fuel their metabolism, which makes them highly promising production systems for the sustainable production of chemicals. Their dependency on visible light limits the cell-density, which is a challenge for the scale-up. Here we show with the example of a light-dependent biotransformation that internal illumination in a bubble column reactor equipped with wireless light emitters (WLEs) could overcome this limitation.

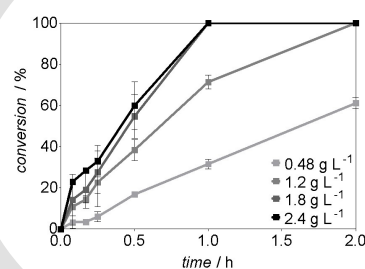
Cells of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 expressing the gene of the ene-reductase YqjM were used for the reduction of 2-methylmaleimide (2-MM) to (R)-2-methylsuccinimide (R)-2-MS with high optical purity (>99 % ee).



The results in 1 mL scale show a decrease of productivity per cell at higher cell density.



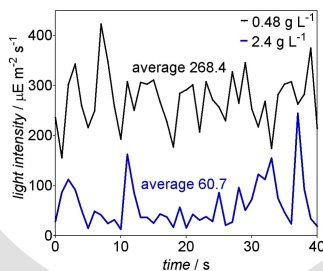
Yet, achieving high reaction rates requires higher cell densities.



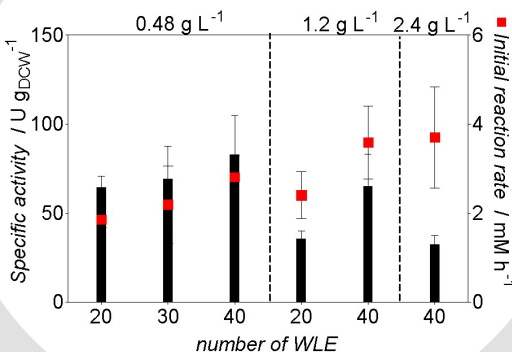
Scale-up of light-driven biotransformations was performed using bubble column reactor (BCR) with internal illumination provided by WLEs.



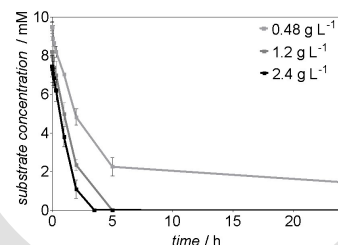
At a cell density of 0.48 g L⁻¹, the light distribution is quite even, but at a cell density of 2.4 g L⁻¹ a considerable light fluctuation is apparent.



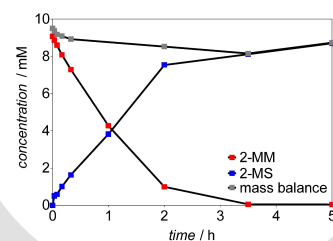
Under optimized conditions, product formation rates up to 3.7 mm h⁻¹ and specific activities of up to 65.5 U g DCW⁻¹ were obtained.



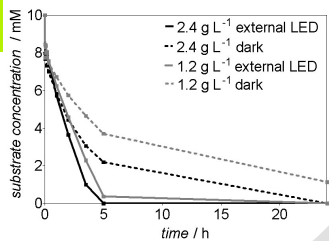
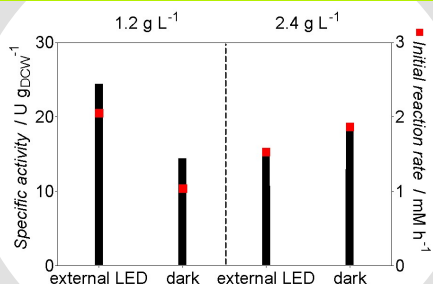
Cell density of 2.4 g L⁻¹ resulted in the shortest reaction time, with a full conversion after 3.5 h, with an initial activity of 32.5 U g DCW⁻¹.



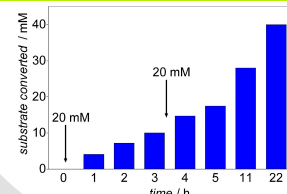
The reaction was run at a cell density of 2.4 g L⁻¹ and 40 WLEs using 10 mM 2-MM, which resulted in 157.4 mg (R)-2-MS (99 % ee).



Compared to external source of light, illumination by floating wireless light emitters allowed a more than two-fold rate increase in specific activity.



Further intensifying the process by addition of 40 mM 2-MM resulted in full conversion in 22 h, producing 650 mg pure (R)-2-MS (73 % yield) with >99 % ee.



Conclusion

The results demonstrate the principle of internal illumination to overcome the intrinsic cell density limitation of cyanobacterial biotransformation, obtaining high reaction rates in a scalable photobioreactor.



Grüner Kaviar – die Meerestraube und ihre Kultur in Vietnam

Lara E. Stuthmann¹, Karin Springer², Andreas Kunzmann¹

1) Leibniz-Zentrum für Marine Tropenforschung (ZMT), Fahrenheitstr. 6, 28359 Bremen, Deutschland; 2) Meeresbotanik, Universität Bremen, Bibliothekstraße 1, 28359 Bremen, Deutschland

Einleitung

Grüner Kaviar (auch *Caulerpa lentillifera*, Meerestraube, Abb. 1) ist eine grüne Makroalge, die wegen ihrer besonderen Struktur, des frischen, leicht salzigen Geschmacks und der Inhaltsstoffe, wie dem hohen Antioxidantiengehalt in asiatischen Ländern geschätzt wird (Abb. 2). Die Kultur findet unter anderem in Teichen an der Vietnamesischen Küste statt. Dort untersucht das ZMT in Kooperation mit dem "Institute of Oceanography Vietnam" in Nha Trang und der Farm „VIJA“ die Ökophysiologie und Biochemie der Meerestraube, um den Ertrag und die Qualität des Produktes zu verbessern. Da die Meerestraube an niedrige Be-

lichtungen angepasst ($\sim 50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ist, werden die Teiche während der Kultur beschattet (Abb. 3). Wenn das Photosystem der Alge einer zu hohen Belichtung ausgesetzt ist, erzeugt das physiologischen Stress und aktiviert Schutzsysteme, wie die Antioxidantienproduktion oder Chloroplastenmigration [1]. Zum Verkauf werden die Algen entweder in Salzlake dehydriert (Abb. 4) oder frisch im In- und Ausland in Plastikverpackungen (PET, Abb. 5) angeboten. Die im folgenden vorgestellten Ergebnisse wurden im laufenden Projekt „SeaGrapes“ generiert und sind publiziert [2], eingereicht [3] oder vorläufige Ergebnisse.



Das Projekt „SeaGrapes“

1

Welche Belichtung erhält einen guten physiologischen Zustand bei Meerestrauben in Plastik PET-Verpackungen?

Material und Methoden

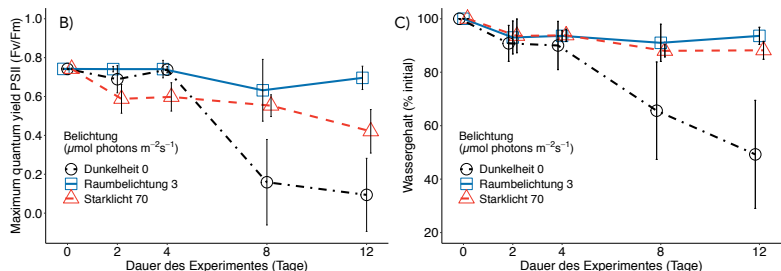
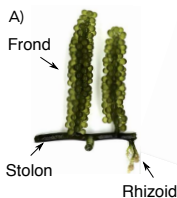
Fronde (A) der Meerestrauben waren bei 0; 3 und 70 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für ≤ 12 Tage mit einem Feuchttuch in PET-Boxen. Wassergehalt (% initial) und physiologischer Zustand (F_v/F_m) wurden gemessen. Ein Wert von $\sim 0,7$ gilt als physiologisch guter Zustand.

Unter Raumbelichtung waren die Fronde auch nach 12 Tagen noch in einem guten Zustand.

Fazit: PET stellt ein gutes Material für Meerestrauben – Verpackungen dar,

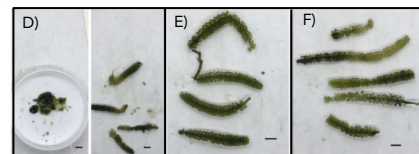
Ergebnisse und Fazit

Im Dunkeln konnten die Algen keine Photosynthese betreiben und verloren ihre Struktur (C, D). Unter Starklicht behielten sie zwar einen hohen Wassergehalt (C), allerdings sank F_v/F_m auf $\sim 0,4$ (B) und die Fronde blühen durch Lichtstress aus.



allerdings sollte eine gedimmte Lichtquelle während der Lagerung vorhanden sein.

Abb. A) Thallus-Teile, B) F_v/F_m und C) Wassergehalt als Mittelwert \pm SD; D) Fronde nach 12 Tagen bei 0, E) 3, und F) 70 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Maßstäbe = 1 cm.



2

Kann Lichtstress die Qualität der Meerestrauben durch einen höheren Antioxidantien Gehalt steigern?

Material und Methoden

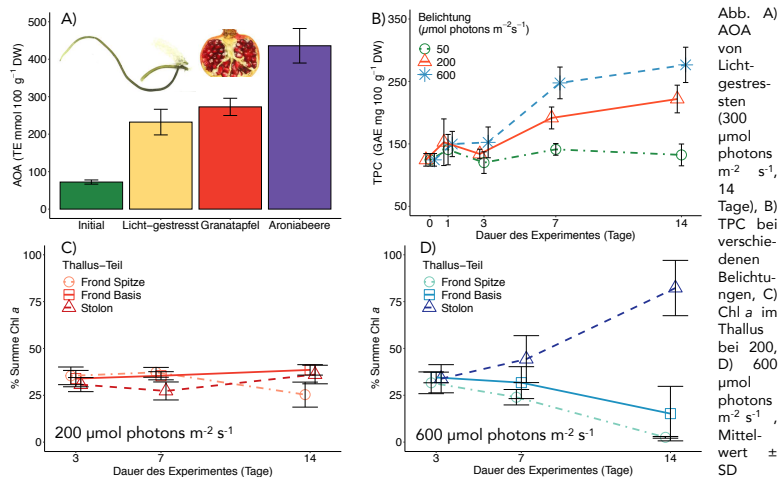
Meerestrauben wurden für ≤ 14 Tage bei Bestrahlungen von 50, 200, 600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in 2 L Bechergläsern gehalten. Antioxidative Aktivität (AOA, ABTS-Assay), Phenolgehalt (TPC, Folin Assay), und Chl a wurden bestimmt. In einem Vor-Versuch wurde AOA von Licht-gestressten (300 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) Meerestrauben mit der von Granatapfel und Aroniabeeren verglichen.

Fronde aus, weil Chloroplasten unter Lichtstress in die Stolone wandern können [4]. Aber da Farbe ein wichtiges Attribut des Produktes ist [5], sollte der Farbverlust so klein als möglich gehalten werden. TPC steigt mit der Belichtung und Dauer (B), während der Chl a Anteil im Frond sinkt (C, D).

Fazit: Eine kurze Belichtungsdauer (~ 7 Tage) bei 600 oder eine längere (~ 14 Tage) bei 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ könnten nach bisherigem Stand genutzt werden, um den TPC zu erhöhen und das Chl a im Frond zu erhalten. Weitere Auswertungen stehen aus.

Ergebnisse und Fazit

Meerestrauben können unter Lichtstress AOA von Granatäpfeln erreichen (A). Allerdings bleichen die



3

Kann eine kontrollierte Zufuhr von Prozesswasser sich positiv auf die Meerestrauben auswirken?

Im Prozesswasser in Aquakultureinrichtungen können bei der Haltung der wichtigen Zuchtgarnele *Litopenaeus vannamei* viele anorganische Nährstoffe anfallen, die von Meerestrauben zum Wachstum genutzt werden können. Es wird untersucht, ob eine kontrollierte Zufuhr des Prozesswassers sich positiv auf das Wachstum und die biochemische Zusammensetzung der Meerestrauben auswirken könnte.

Literatur

- [1] Zubia et al. 2019, doi: 10.1007/s10811-019-01868-9
- [2] Stuthmann et al. 2020, doi: 10.1007/s10811-020-02322-x
- [3] Sommer et al. (submitted)
- [4] Menzel and Elsner-Menzel 1989, Actin-based chloroplast rearrangements in the cortex of the giant coenocytic green alga *Caulerpa*
- [5] Mouritsen et al. 2018, doi: 10.1515/bot-2018-0041



ALGAFEED: concept of on-farm production of protein-rich microalgae for animal feed

Alexandra Baumeyer Brahier¹, Wolfgang Riedl³, Karin Kovar^{1,2}, Fabian Wahl¹

¹ Agroscope, CH-3003 Bern, CH, ² daspool, CH-8820 Wädenswil, CH, ³ Fachhochschule Nord-West Schweiz, CH-4132 Muttenz

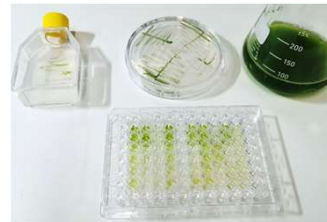
The concept of Algafeed aims to replace imported soya protein with protein from on-farm produced microalgae. The main challenge will be to determine which conditions are essential and beneficial for microalgae growth in façade cultivation in alpine and near alpine farms.

The «Algafeed» concept consists of:

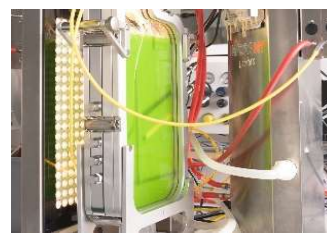
A fully automated tubular photobioreactor system with enhanced performance that will produce quality microalgal biomass on-farm.

This concept is unique, as:

- no arable land is required since these photobioreactor systems are integrated into existing agricultural buildings;
- no transport is needed since production is local, at the place of consumption;
- minimum dewatering is required but no drying, cell disruption, nor extraction since fed as «green water»;
- enhances microalgal culture productivity through technology innovation for optimised gas transfer and LED lighting.



- Microalgae selection
- Medium development for best performance
- Cultivation parameters for enhanced protein production
- In vitro digestion tests



- LED-lighting optimisation
- Medium development based on farm by-products
- Enhancement of protein productivity through cultivation parameters adaptation



- Maximisation of lighting with both sun light and LED lighting
- Gas transfer optimisation
- Inoculation and harvesting investigation
- Preliminary animals acceptance tests

Figure 2: Microalgae cultivation procedures at laboratory scale.

Project workflow planned within Agroscope and FHNW

In laboratory scale several microalgae strains will be selected and cultivated under different parameters such as light and gas distribution, temperature and flow conditions. A pilot photobioreactor will be installed on the buildings of the new Agroscope campus in Posieux, planned for 2024-25, making palatability and studies on animals possible.

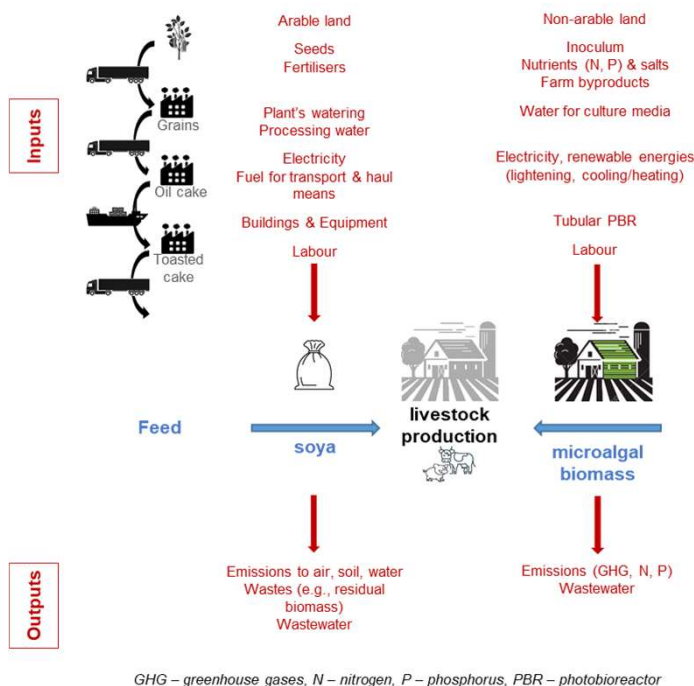
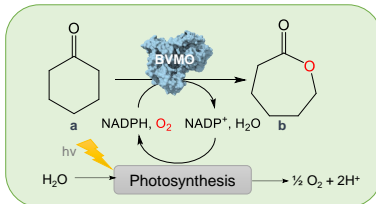


Figure 1: Livestock feeding with microalgal biomass as an alternative protein source to soya.

Timeline

The project started with the design of tubular photobioreactors (up to 170L) in June 2021 and will be continued with microalgae selection in 2022.

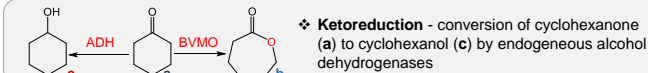
BACKGROUND and MOTIVATION



Advantages:

- ❖ Utilizes oxygen as the oxidant from water splitting
- ❖ Bypasses addition of sacrificial co-substrates as electron donors
- ❖ No addition of expensive redox mediators

Drawback:



- ❖ Ketoreduction - conversion of cyclohexanone (a) to cyclohexanol (c) by endogeneous alcohol dehydrogenases

SCREENING in *E. coli*

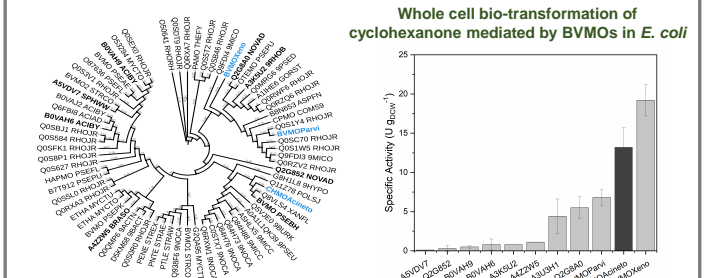


Fig. 1. Phylogram showing representative Type I BVMOs. BVMOs utilized in this study are shown in bold.

Whole cell bio-transformation of cyclohexanone mediated by BVMOs in *E. coli*

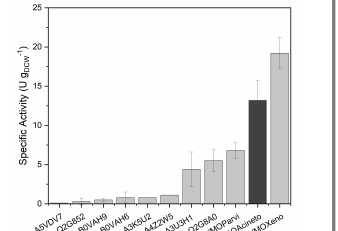
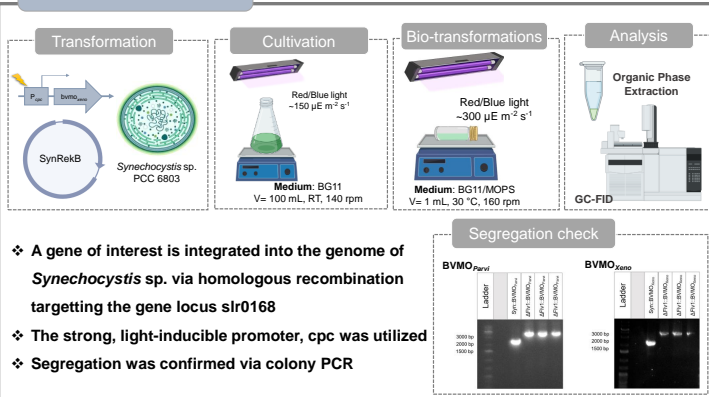


Fig. 2. Specific Activities of various BVMOs in recombinant *E. coli*/BL21 (DE3) producing ϵ -caprolactone

METHODOLOGY



- ❖ A gene of interest is integrated into the genome of *Synechocystis* sp. via homologous recombination targeting the gene locus *slr0168*
- ❖ The strong, light-inducible promoter, *cpc* was utilized
- ❖ Segregation was confirmed via colony PCR

CONVERSION

Whole cell Biotransformation using Syn::P_{cpc} BVMO

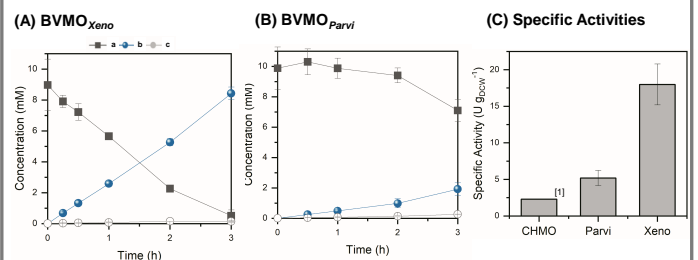


Fig. 3. Whole cell bio-transformation of cyclohexanone mediated by (A) BVMO_{Xeno} and (B) BVMO_{Parvi} (C) Specific activity comparison for BVMOs tested.

^[1] Böhrer, S., et al., *Catalysts* 2017, 7 (240)

IMPROVING ACTIVITY

Re-designing the Photosynthetic Electron Transport Chain (PETC)

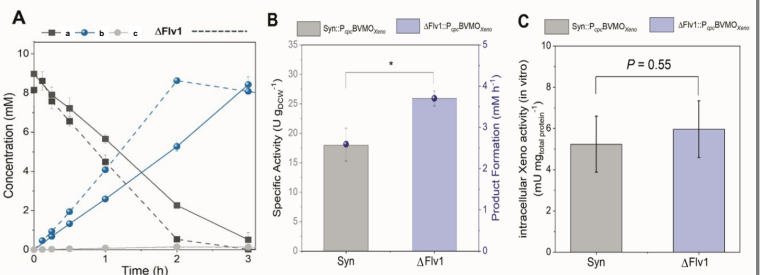
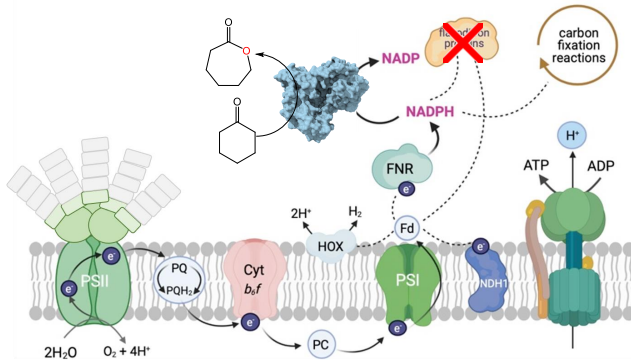


Fig. 4. Whole cell bio-transformation of cyclohexanone mediated by (A) BVMO_{Xeno} and its Δ Flv1 mutant; (B) Specific activities comparison and (C) Intracellular BVMO_{Xeno} activity in the oxidation of cyclohexanone

- ❖ Activity of BVMOs were improved by utilizing a mutant with a disrupted electron valve (Flv1 heterodimer)
- ❖ A 1.4-fold increase in activity was observed while the enzyme concentration remains constant

OVERCOMING KETOREDUCTION

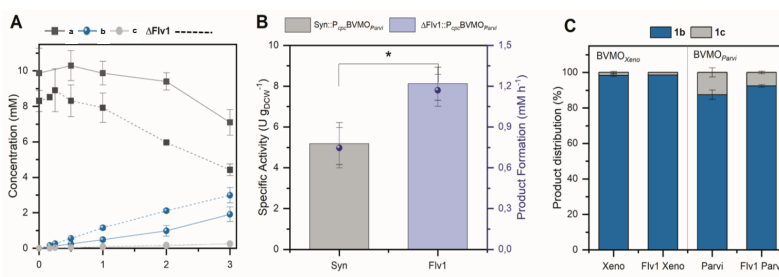


Fig. 5. Whole cell bio-transformation of cyclohexanone mediated by (A) BVMO_{Parvi} and its Δ Flv1 mutant; (B) Specific activities comparison and (C) Product distribution after 3h of reaction

- ❖ A 1.6-fold increase in activity was observed when Δ Flv1::BVMO_{Parvi} mutant
- ❖ Cyclohexanol production was decreased from 12.5% to 7.5%

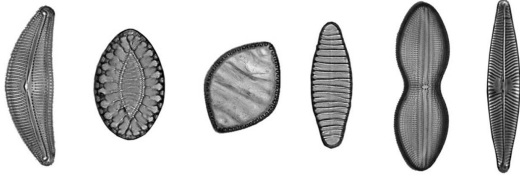
CONCLUSIONS

- ❖ Careful selection of a candidate BVMO helps improve reaction rates and highlight potential of photosynthetic cofactor regeneration for enzymatic oxyfunctionalization
- ❖ Improved specific activities and lower by-product formation were observed by re-designing the PETC

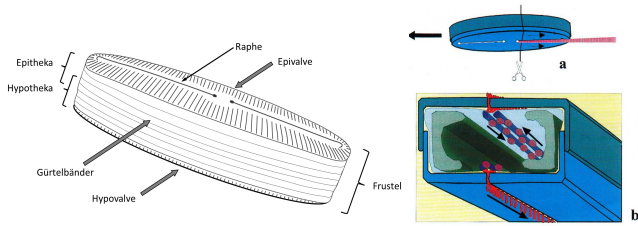
ACKNOWLEDGEMENT

This work has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 764920 (MSCA-EJD PhotoBioCat) and the FET Open grant agreement 899576 (FuturoLEAF).

Einleitung

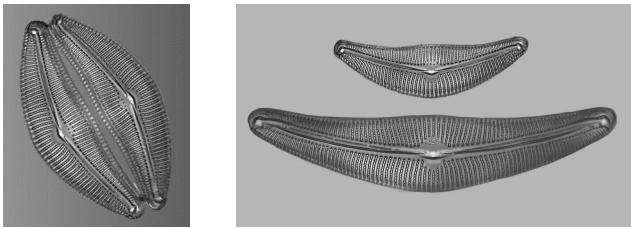


Pennate Kieselalgen sind Algen, die eine harte, schiffchenförmige Schale aus hydratisiertem Siliziumdioxid biomineralisieren¹. Viele Arten können sich mit Hilfe einer Raphe auf einem Substrat mit Geschwindigkeiten von bis zu 20µm/s fortbewegen. Dieser Mechanismus könnte Geräusche erzeugen.



Copyright Wiley-VCH GmbH. Reproduced with permission.

Position der Raphe in der Mitte der Kieselalge und schematische Skizze der Funktionsweise.^{2,3}



Cymbella cistula eine raphide, sichelförmige Kieselalgenart, die sich mit Hilfe der mittig liegenden Raphe fortbewegen kann.²

¹Gebeshuber, I.C., Biomineralization in Marine Organisms, in *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, Springer Berlin Heidelberg, 2015.

²Harbich, T., diatoms.de, 2021. Reproduced with permission.

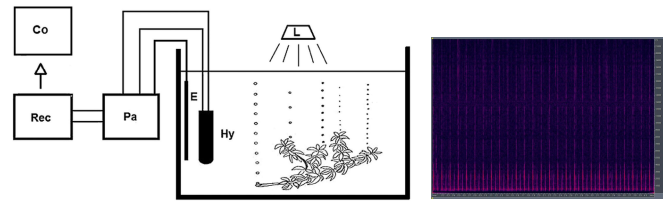
³Menzel, D., Vugrek, O., Muskelproteine in Pflanzenzellen. *Biologie in unserer Zeit*, 27(3): p. 195-203. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1997. Reproduced with permission.

Methoden

Es wurden für erste, grobe akustische Messungen Kieselalgen aus der freien Wildbahn gesammelt, da diese in der Regel aktiver, vitaler und robuster sind, als Algen aus gezüchteten Kieselalgenkulturen.



Raphide Kieselalgen finden sich in der Natur oft als bräunlich-goldener Belag auf Steinen in langsam fließenden Gewässern.



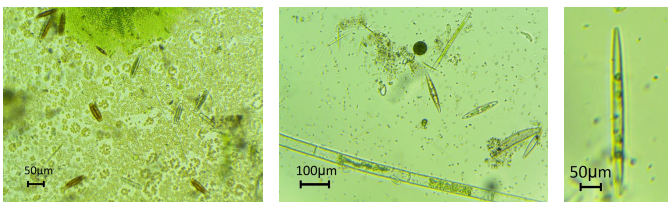
Mit Hydrophonen konnten bereits Erfolge beim Zuhören der Photosynthese von Unterwasserpflanzen erzielt werden.⁴



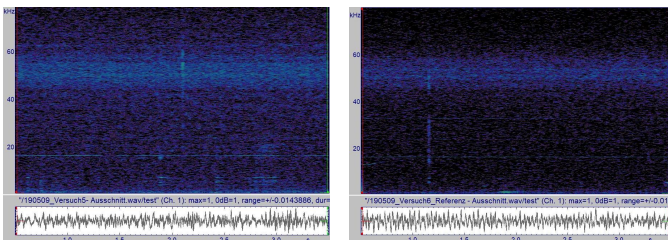
Messungen wurden im Schalltotraum mit Hydrophonen durchgeführt.

⁴Kratochvil, H., Pollirer, M., Acoustic effects during photosynthesis of aquatic plants enable new research opportunities, *Scientific Reports*, 2017. Reproduced with permission.

Ergebnisse

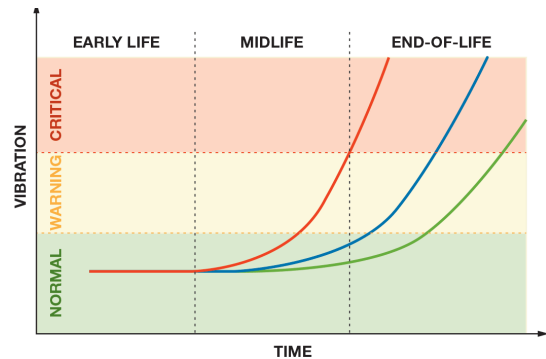


Gesammelte wilde Kieselalgen unter dem Mikroskop



Vergleich der Spektrogramme von der Messung mit Kieselalgen (links) zur Referenzmessung (rechts)

Die Auflösung von sehr leisen Geräuschen könnte in der Qualitätssicherung von Mikro- und Nanomaschinen Anwendung finden.



Beispiele für den Anstieg der Vibration gegen Ende des Lebenszyklus einer Maschine⁵

Mit freundlicher Genehmigung von Analog Devices Corp.

⁵Looney, M., An introduction to mems vibration monitoring, *Analog Dialogue*, 48, 06, 1-3, 2014. Reproduced with permission.

Die Ergebnisse der Forschungsarbeit an diesem Thema wurden 2021 in umfassender Form bei Wiley-Scrivener veröffentlicht: Zischka, F., Kratochvil, H., Noll, A., Gordon, R., Harbich, T., und Gebeshuber, I.C. „*Diatom Triboacoustics*“ in *Diatom Gliding Motility* (eds S. Cohn, K. Manoylov und R. Gordon). Wiley-Scrivener, Beverly, MA, USA, ISBN 978-1-119-52635-3, p. 249-282, 2021.



Florian Zischka, BSc
Institut für Angewandte Physik,
Wiedner Hauptstraße 8-10/E134, 1040 Wien
florian.zischka@tuwien.ac.at



Charakterisierung ausgewählter Mikroalgen und Cyanobakterien als Quelle antioxidativ wirkender Verbindungen

Martin Almendinger¹, Franziska Saalfrank¹, Sascha Rohn^{1,2}, Elke Kurth³, Monika Springer⁴, Daniel Pleissner¹

¹ ILU Institut für Lebensmittel- und Umweltforschung e.V., Bad Belzig, ² Technische Universität Berlin, Berlin
³ IGV GmbH, Nuthetal, ⁴ Beuth Hochschule für Technik, Berlin

Einleitung

Als Anpassung an Umweltstress sind Mikroalgen und Cyanobakterien in der Lage, hochwertige Pigmente und phenolische Verbindungen mit antioxidativer Kapazität zu akkumulieren. Um den aktuellen Wissensstand zu erweitern, wurden Biomassen und Extrakte von 13 Mikroalgen- und Cyanobakterienarten aus den Abteilungen *Chlorophyta*, *Rhodophyta*, *Cyanophyta* und *Diatomeen* (Tabelle 1) analysiert.

Folgende Analysen wurden durchgeführt:

- Gesamt-Polyphenolgehalt (TPC)
 - Methode: Photometrisch (Folin-Ciocalteu)
 - Einheit: mg Gallussäure-Äquivalent (GAE) pro g
- Antioxidative Kapazität = AOC (wasser- und fettlöslicher Substanzen).
 - Methode: Photochem® Antioxidant Analyzer der Analytik Jena AG (photometrische Bestimmung der Radikalabschwächung)

- Einheit: µmol Ascorbinsäure-Äquivalenz (AAE) bzw. µmol Trolox-Äquivalenz (TE) pro g
- Chlorophyll- und Carotinoidgehalt
 - Methode: Photometrische Bestimmung
 - Einheit: mg/g

Darüber hinaus wurde der Einfluss des Zellaufschlusses der robusten Alge *Acutodesmus obliquus* auf die Extrahierbarkeit von antioxidativen Verbindungen untersucht.

Kultivierung und Extraktion

Tabelle 1: Untersuchte Algen und Cyanobakterien, sortiert nach ihren Abteilungen. Verwendete Abkürzungen sind angegeben.

Chlorophyta	
<i>Acutodesmus obliquus</i>	Aco
<i>Scenedesmus obliquus</i>	SCO
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Neo
<i>Pseudococcomyxa simplex</i>	Psey
<i>Schizochlamydeella minutissima</i>	Sch
<i>Scotellioopsis terrestris</i>	Scot
<i>Selenastrum rinoi</i>	Sel
Rhodophyta	
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Cya
<i>Galdieria sulphuraria</i>	Gal
Cyanophyta	
<i>Phormidium ambiquum</i>	Pha
<i>Phormidium sp.</i>	Ph
<i>Wilmottia murrayi</i>	Wiw
Diatomeen	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Pac

Algenstämme wurden kultiviert, geerntet und die geerntete Biomasse gefriergetrocknet. Zusätzlich wurden wässrige Extrakte aus den Biomassen hergestellt (Abbildung 1).



Abb. 1: Algenkultivierung, Algenbiomasse, Algenextrakt (v.l.n.r.)

Ergebnisse

Polyphenolgehalt

Trockene Biomassen wurden zuvor mit Wasser zu einem Slurry gelöst.

Höchstwerte:

- Extrakt: Neo (24 mg GAE/g)
- Biomasse: Cya (8,4 mg GAE/g)

Extrakte zeigten durchweg höhere TPC-Werte als Biomassen (Abbildung 2).

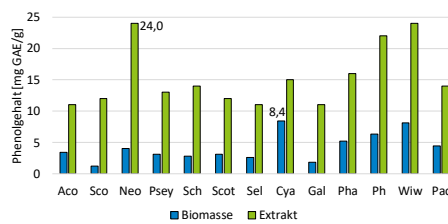


Abb. 2: Gesamtphenolgehalt von Biomasse-Slurries und Extrakten der untersuchten Mikroalgen und Cyanobakterien.

Antioxidative Kapazität

Biomassen wurden zuvor mit Wasser beziehungsweise Methanol resuspendiert.

Höchstwerte:

- Extrakt: Ph (13,9 µmol AAE/g)
- Biomasse in Wasser: Pha (9,6 µmol AAE/g)
- Biomasse in Methanol: Neo (77,9 µmol TE/g)

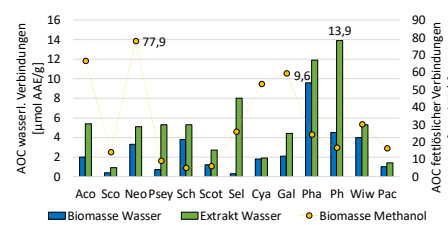


Abb. 3: Antioxidative Kapazität (AOC) wasser- und fettlöslicher Substanzen in Biomasse-Slurries und Extrakten untersuchter Mikroalgen und Cyanobakterien.

Pigmentbestimmung

Extraktion wasserunlöslicher Chlorophylle und Carotinoide in Biomassen mittels Aceton.

Die Chlorophyllwerte waren durchweg höher als die Carotinoidgehalte (Abbildung 4).

Höchstwerte:

- Neo (60 mg/g bzw. 12 mg/g)

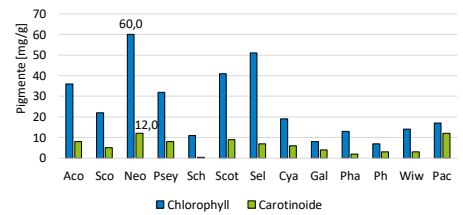


Abb. 4: Gesamtgehalt an Chlorophyll und Carotinoiden in Aceton-extrahierten Biomassen.

Zellaufschluss

Acutodesmus obliquus Biomasse wurde mittels Kugelmühle vermahlen und anschließend wässrig extrahiert.

Mahldauer: 0, 30, 60, 90 min

Analysen: Gehalt an Chlorophyll, Carotinoiden, Phenolen

Extrahierbarkeit des Chlorophylls hat sich nach 90 min Vermahlung fast verdreifacht (Abbildung 5).

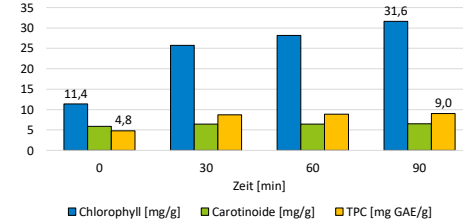


Abb. 5: Gehalt an Pigmenten und Polyphenolen aus *Acutodesmus obliquus* in Abhängigkeit der Vermahlungsdauer.

Zusammenfassung

Heißwasserextraktion eignet sich, um phenolische Substanzen und wasserlösliche Antioxidantien aus Mikroalgen und Cyanobakterien zu gewinnen.

N. oleobundans, *Phormidium sp.* und *W. murrayi* zeigten die höchsten Gehalte an phenolischen Verbindungen.

Die *Phormidium*-Arten zeigten die höchsten AOC-Werte der wasserlöslichen Antioxidantien.

Die höchste antioxidative Kapazität fettlöslicher Substanzen konnte bei in Methanol gelöster Biomasse von *Neochloris oleobundans* nachgewiesen werden.

Chlorophyta hatten den höchsten Chlorophyllgehalt. Bei Algen mit robusten Zellwänden kann eine Vorbehandlung, zum Beispiel eine Vermahlung, für den Zellaufschluss und die Extrahierbarkeit von Wertstoffen sinnvoll sein.

PH-GEREGELTE CO-KULTIVIERUNG VON *MONORAPHIDIUM BRAUNII* UND *BJERKANDERA ADUSTA* ZUR VERWERTUNG VON ABWASSER AUS EINER OLIVENÖLPRODUKTION

⊕ **ASTRID VICTORIA LINDNER, M. SC., APL.-PROF. DR. DANIEL PLEISSNER**
 LEUPHANA UNIVERSITÄT LÜNEBURG, INSTITUT FÜR NACHHALTIGE CHEMIE (RESSOURCENEFFIZIENZ)

MOTIVATION

Phenolische Verbindungen in Abwässern aus der Olivenölproduktion (OMW) stellen aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften ein Umweltrisiko dar. Mit der Einspeisung von unbehandeltem OMW in Böden und Gewässer können Störungen des natürlichen, mikrobiellen Gleichgewichts einhergehen.

Die Kultivierung von Mikroalgen in OMW kann zu einer Entfernung von phenolischen Verbindungen führen, wodurch das Umweltrisiko verringert werden kann. Um die biotechnologische Nutzbarkeit zu erhöhen und synergistische Effekte zu identifizieren, wurde die Mikroalge *Monoraphidium braunii* zusammen mit dem Pilz *Bjerkandera adusta* kultiviert. Hierfür wurden pH-geregelte Experimente durchgeführt, da die Kultivierung des Pilzes zu einem für die Mikroalge ungünstigen pH-Wert führt. Hieraus würde eine stark verminderte Wachstumsrate der Alge resultieren.

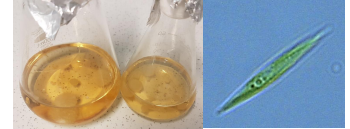
METHODEN

Kultivierung in Dreihals-Kolben

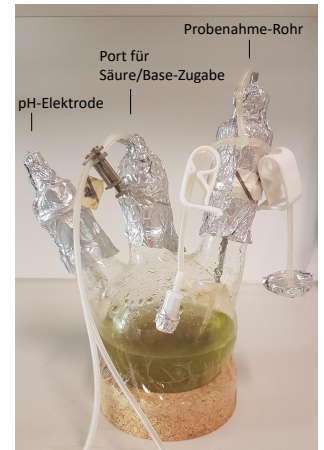
pH-Regelung auf Wert von 8 ± 1 ,
B. adusta Zugabe nach 4 d,
 Fermentiertes OMW Zugabe nach 5 d
 (4% fOMW ~ 0,1 g/L phen. Verb.),
 Beleuchtung (1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$
 Ausgangsbestrahlung, einseitig beleuchtet),
 28 ± 1 °C, 130 rpm,
 AF6 medium + 1 g/L Malzextrakt

Analytik

Tägliche Bestimmung der Zellzahl,
 Bestimmung der phenolischen Verbindungen im Überstand mittels Folin-Ciocalteu Reagenz; Tyrosol Äquivalent

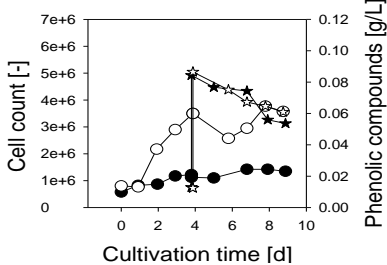


Bjerkandera adusta *Monoraphidium braunii*

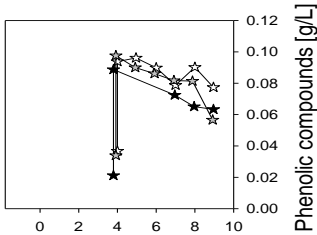


ERGEBNISSE

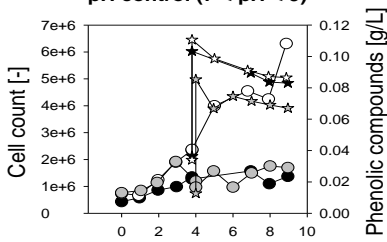
Monoraphidium braunii with 4% fOMW, pH control (7 < pH < 9)



Bjerkandera adusta with 4% fOMW, pH control (7 < pH < 9)



Co-cultivation with 4% fOMW, pH control (7 < pH < 9)



Zeitprofile der Zellzahl (Kreis) und Entfernung der phenolischen Verbindungen (Stern) in Dreihalskolben-Kultivierungen von *M. braunii*, *B. adusta* und Co-Kulturen. Weiße, graue und schwarze Symbole zeigen unabhängige Kultivierungen.

Wachstum *M. braunii* z. T. starke Unterschiede in Mono- und Co-Kultur (leere Kreise = Ausnahmekultur), sonst vergleichbar/replizierbar.

Entfernung phenolische Verbindungen bei Replikaten jedoch konsistent und in allen Kulturen vergleichbar.

3Hals-Kolben	μ_{max} [1/d]	% Removal
<i>M. braunii</i>	$0,42 \pm 0,24$	$33,0 \pm 3,4$
<i>B. adusta</i>	-	$29,4 \pm 10,0$
Co-Kultur	$0,47 \pm 0,15$	$21,7 \pm 1,5$

pH-Regelung in Dreihals-Kolben begünstigt Algen-Wachstum, führt bei Pilz und Alge jedoch zu abgeschwächten Entfernungsraten der phenolischen Verbindungen.

Vergleich mit Kulturen in Erlenmeyer-Kolben (gleiche Vorkulturen) zeigen deutlich höhere Entfernungsraten, welche auf die Aktivität des Pilzes zurückzuführen sind.

Erl.-Kolben	μ_{max} [1/d]	% Removal
<i>M. braunii</i>	$0,55 \pm 0,27$	$35,9 \pm 12,0$
<i>B. adusta</i>	-	$61,1 \pm 11,5$
Co-Kultur	$0,51 \pm 0,19$	$64,5 \pm 3,4$

Möglichkeit zur erleichterten Ernte der Algen-Biomasse unter kontrollierten Bedingungen durch Einschluss in Pilzmyzelien!



FAZIT

Eine Co-Kultivierung von der Mikroalge *Monoraphidium braunii* und dem Pilz *Bjerkandera adusta* ist prinzipiell möglich.

Jedoch müssen bestimmte Faktoren beachtet werden, welche suboptimal für eine der Spezies sein können. So bedeutet ein fest eingestellter pH-Bereich zugunsten der Alge eine ungünstige Ausgangslage für den Pilz hinsichtlich Wachstum und Effektivität der Entfernung phenolischer Verbindungen.

Die Ernte der Algenzellen kann durch den Einschluss in Pilzmyzelien erleichtert werden, was jedoch nur bei einer Kultivierung mit geregelterm pH möglich ist.

Phenolische Verbindungen werden unter kontrollierten Bedingungen bis zu 33% und in Erlenmeyerkolben bis zu über 60 % entfernt.

KONTAKT

Astrid Lindner, M. Sc.
 Leuphana Universität Lüneburg
 Universitätsallee 1, 21335
 Lüneburg/GERMANY
 Fon +49.4131.677-1968
 Astrid.lindner@leuphana.de

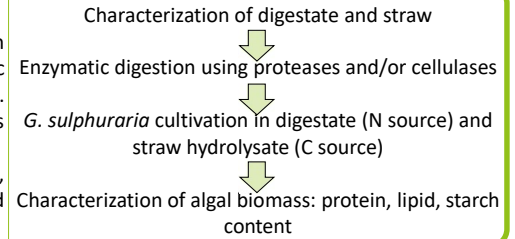
Heterotrophic cultivation of *Galdieria sulphuraria* under non-sterile conditions in digestate and hydrolyzed straw

Daniel Pleissner^{1,2}, Astrid Victoria Lindner², Nicole Händel¹

¹ ILU Institute for Food and Environmental Research, 14806 Bad Belzig, Germany, ² Leuphana University Lüneburg, 21335 Lüneburg, Germany

Introduction

Waste streams from food and agriculture processing appear in considerable amounts globally. To the 1.3 billion tons of food wasted annually come in addition billion tons of agricultural residues of non-edible lignocellulosic biomass (e.g., straw) as well as liquid waste streams (e.g., digestate and wastewater) with a high nutrient load. The aim of this study was an investigation of the cultivation of *Galdieria sulphuraria* in presence of nutrients recovered from digestate obtained after anaerobic digestion of cattle manure as well as straw after hydrolysis. Particular attention has been paid on the non-sterile cultivation of *G. sulphuraria* to provide an approach, which not only allows an efficient use of waste streams but is also simple enough to be implemented decentralized in rural areas.



Results and Discussion

Digestate: Assumption: Complex composition inhibits growth of *G. sulphuraria*. Approach: Cultivations in flasks with different concentrations of hydrolyzed or untreated digestate (Figures 1 and 2), cyanidium medium was used as control.

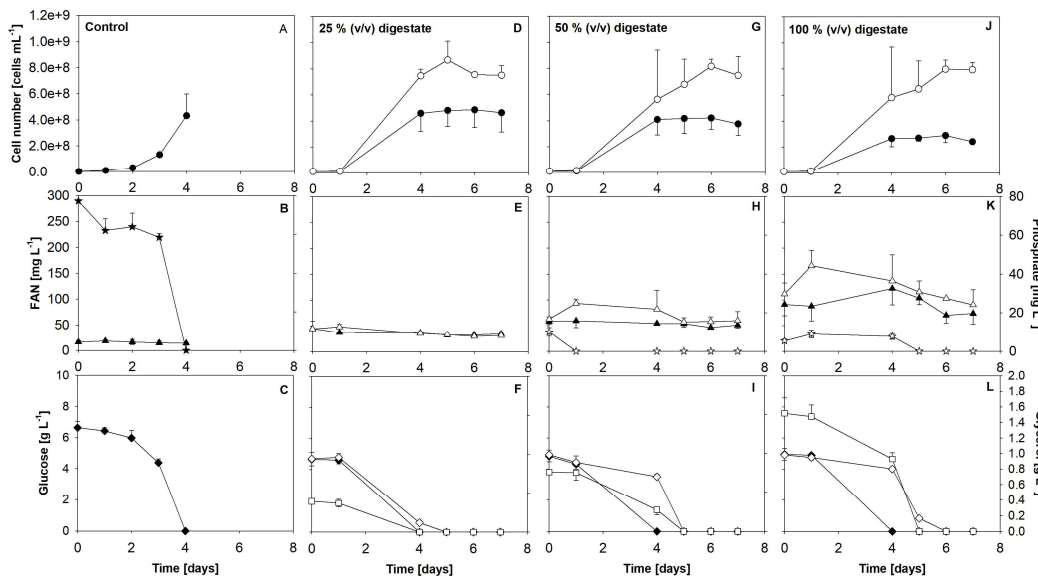


Figure 1: Time profiles of cell number (circle), free amino nitrogen (triangle, FAN), phosphate (star), glucose (diamond) and glycerol (square) concentrations in flask cultures of *G. sulphuraria* grown in triplicate in cyanidium medium as control (A-C), and digestate of different concentrations (25%, D-F, 50%, G-I, and 100%, J-L, v/v). The digestate solutions were either used after treatment with Protease S-02 (open symbol) or untreated (closed symbol).

Straw hydrolysate as alternative carbon source

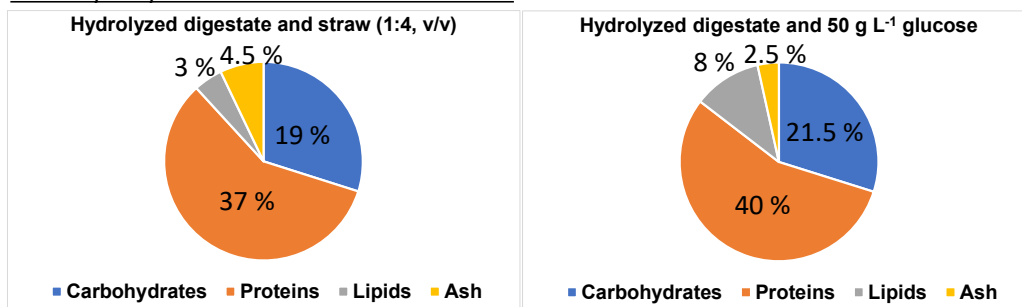


Figure 3: Biomass composition of produced *G. sulphuraria* biomass.

Exponential growth in all cultivations from day 1 to day 4.

Control (Figure 1A-C):

6.5 g L⁻¹ glucose, 80 mg L⁻¹ phosphate almost fully consumed after 4 days; 5×10⁸ cells mL⁻¹, μ = 1.2 day⁻¹.

Untreated digestate (Figure 1D-L, closed symbols):

Glucose and phosphate limitations leads to stationary phase after day 4.

Increasing digestate concentration leads to decreasing max. cell concentration (5×10⁸ to 3×10⁸ cells mL⁻¹).

μ_{25%} = μ_{50%} = 1.0 day⁻¹, μ_{100%} = 0.9 day⁻¹

Treated digestate (Figure 1D-L, open symbols):

Increased growth rates and max. cell concentrations, due to enhanced accessibility of FAN.



Figure 2: Applied substrates: Straw and digestate.

All cultivations resulted in average growth rates of 0.8 day⁻¹.

Hydrolyzed straw is a feasible carbon source for *G. sulphuraria*.

Biomass had a protein content of around 40% (w/w), followed by carbohydrates of around 20% (w/w) and lipids with 3-8% (w/w).

Conclusions

This study revealed the potential of *G. sulphuraria* to utilize agricultural residues and to form biomass with a protein content of around 40% (w/w). Considering the possibilities to implement decentralized processes, *G. sulphuraria* can contribute to add value to straw and digestate in rural areas. This approach makes residue utilization not just more economically attractive, but also presents new opportunities for feedstock production for food, fine chemical, pharma and material sectors.

Further information is available here: Pleissner D, Lindner AV, Händel N. 2021. Heterotrophic cultivation of *Galdieria sulphuraria* under non-sterile conditions in digestate and hydrolyzed straw. *Bioresource Technology*, 337, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125477>.

The authors acknowledge the German Federal Ministry of Education and Research for providing funding within the Era-Net Cofund "FACCE SURPLUS" Program (031B0934B).

CYANOSCREEN – Cyanobakterien und Cyanotoxine in ausgewählten Brandenburger Seen

Nadine Graeber-Berends^{1,3}, Stephanie Schönfelder^{1,2}, Regina Storandt¹, Sascha Rohn^{1,3}, Daniel Pleissner¹

¹ ILU Institut für Lebensmittel- und Umweltforschung e.V., Bad Belzig,

² Universität Potsdam, Physikalische Chemie, Potsdam, ³ Technische Universität Berlin, Berlin

Einleitung

Cyanobakterien kommen in allen Oberflächengewässern vor und setzen selbst geringe Nährstoffangebote effektiv zur Bildung von Biomasse ein. Einige Cyanobakterienarten können Toxine bilden, so dass ein übermäßiges Wachstum von Cyanobakterien mit erheblichen Gesundheitsrisiken für Mensch und Tier verbunden sein kann („Algenblüte“). Obwohl einige Faktoren für das Auftreten von Algenblüten und Cyanobakterien in Oberflächengewässern bekannt sind, ist ihr komplexes Zusammenspiel im Hinblick auf die Bildung von Cyanotoxinen weiterhin unklar. Im Forschungsprojekt CYANOSCREEN wurden Beprobungen an Modell-Oberflächengewässern in verschiedenen Land-

schaftstypen (ackergeprägt, Wald- Naturschutzgebiet und städtischer Verdichtungsraum) mit unterschiedlichem Trophiegrad und Algenbewuchs im Land Brandenburg vorgenommen, um das Verständnis über das Auftreten potentieller Toxinbildner zu vertiefen und möglicherweise eine Schnellanalytik hierfür zu etablieren. Darüber hinaus erfolgte eine Kultivierung von Gewässerproben in verschiedenen Photobioreaktoren (Flat Panel Airlift Photobioreaktor (FPA), Blasensäulen), um die Einflüsse verschiedener Nährstoffkombinationen und gezielter Nährstoffverarmung auf das Cyanobakterienwachstum und deren mögliche Toxinbildung zu untersuchen.

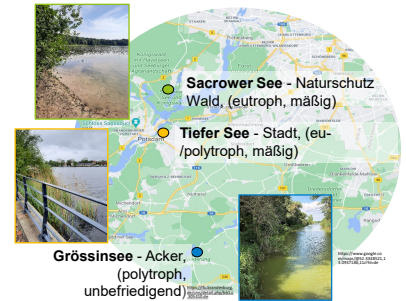


Abb. 1: Orte der Probenahme und Kurzcharakteristika der drei Seen: Trophiegrad und ökologischer Zustand.

Cyanobakterienblüte und Cyanotoxine (2018 - 2020)

Erfasste Parameter:

- Witterungsbedingungen, Lichtintensität, Sichttiefe
- Wasser-/Lufttemperatur, pH-Wert, O₂-Sättigung
- Phycocyaninkonzentration
- Chlorophyll- und Phycocyaninfluoreszenz
- UV/VIS-Absorptionsspektrum
- Nährstoffgehalte (Nitrat, Phosphat)
- Mikroskopische Auswertung
- Mikrobiologische Wasserqualität
- Microcystin & Nodularin Toxinkonzentrationen (ELISA)

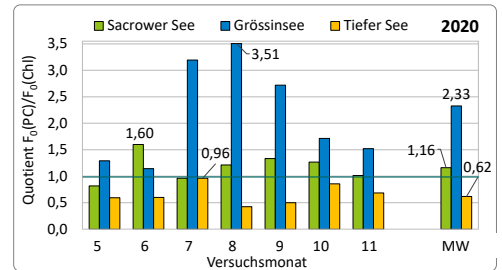
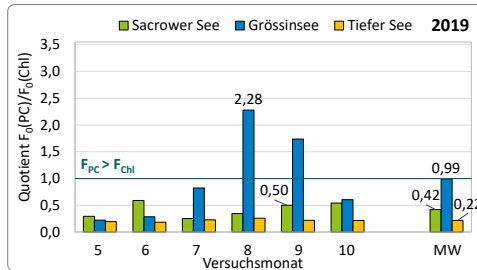


Abb. 2 - 3: Quotient der dunkeladaptierten Fluoreszenzen (Phycocyanin / Chlorophyll) zur Bestimmung des Anteils von Cyanobakterien am Gesamtphytoplankton in den drei Modellseen in den Jahren 2019 (links) und 2020 (rechts).

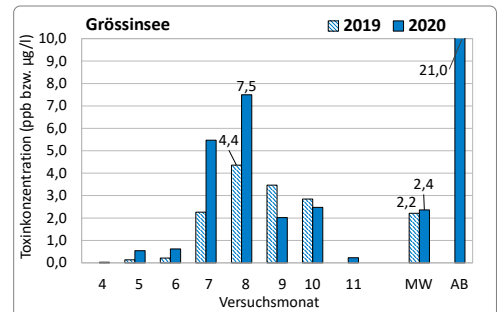
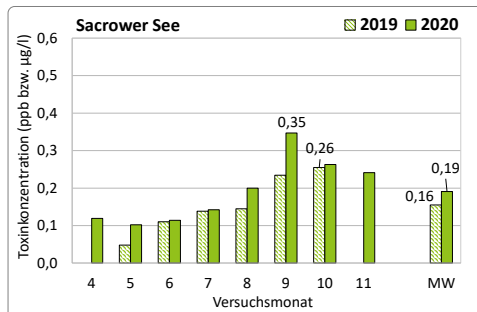
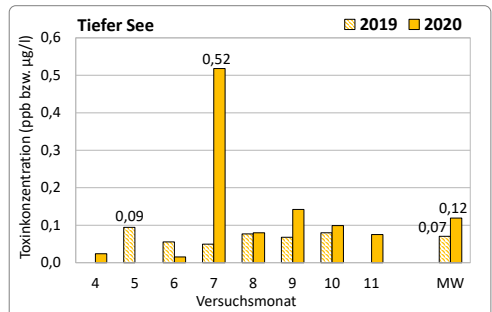
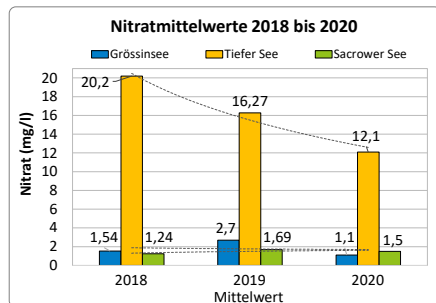


Abb. 4 - 6: Auftreten der Microcystin- & Nodularin-Toxine in den Modellgewässern in den verschiedenen Monaten der Jahre 2019 und 2020, gemessen mittels ELISA (Microcystin-ADDA SAES/Eurofins). MW = Mittelwert, AB = Probenahme direkt aus der Oberflächen-Algenblüte. Alle Toxinwerte blieben unter dem Leitwert 30µg/l des Umweltbundesamtes für Bade- und Freizeitgewässer.



⇒ Oberflächen-Algenblüten wurden im Juli 2018 im Tiefen See, im August 2019 & 2020 im Grössinsee erkannt.
 ⇒ Phycocyanin-Konzentration und -Fluoreszenz als Indikatoren für die Schnellanalytik?
 - für das Auftreten von Blaualgen - JA
 - für das Auftreten von Toxinen und Toxingehalt – NEIN
 ⇒ Das Auftreten der Blaualgen korreliert nicht mit dem Toxingehalt.
 ⇒ Die Quantifizierung der Cyanotoxingehalte in Gewässerproben muss weiterhin mittels ELISA-Testkits oder HPLC-Methoden durchgeführt werden.
 ⇒ Bei sinkenden bzw. stabilen Nährstoffgehalten stiegen die Anteile der Cyanobakterien und Toxinkonzentrationen in allen Seen zum Jahr 2020 an.

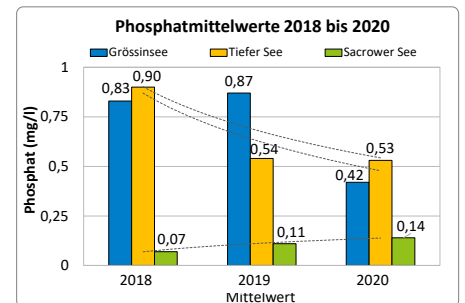


Abb. 8: Phosphatmittelwerte der drei Modellgewässer im Beobachtungszeitraum (LfU – Prüfwert: 0,3 mg/L).

Ergebnisse weiterer Untersuchungen (Laborkultivierungen)

Laborkultivierungen und Feldproben zeigten: nicht Nitrat- und Phosphatkonzentrationen sind die limitierenden Wachstumsfaktoren, sondern andere nicht näher spezifizierbare Umwelteinflüsse. Die Laborkultivierung von Wasserproben im Flat Panel Airlift Photobioreaktor und in 2L-Blasensäulen mit entkoppelten Nährstoffzufüssen führten nicht zu einer künstlichen Cyanobakterienblüte. Die Phytoplanktonpopulationen der laborkultivierten Wasserproben vollzogen einen rapiden Umbau

zu artenärmeren vornehmlich Grünalgenkulturen. Die Phytoplanktonpopulation aus der Probe einer echten Algenblüte (AB) wächst in der Laborkultivierung schlechter als die der regulären Probenahmestelle, ebenso entwickelten sich die Phycocyaninkonzentrationen in der regulären Probe stärker als in der Algenblütenprobe. Dahingegen blieb die Toxinkonzentration der Algenblütenprobe während der Kultivierung höher.

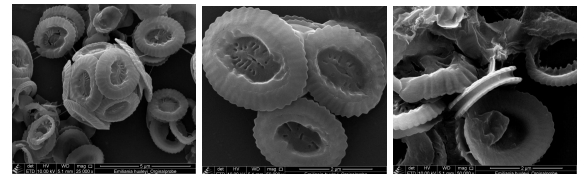
Kultivierung von *Emiliana huxleyi* zur Produktion biogener Kalkpartikel

J. Zander, C. Steinweg, C. Posten

Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik –
Bioverfahrenstechnik, 76131 Karlsruhe, Deutschland

Zusammenfassung

Emiliana huxleyi kann durch Biomineralisierung hochfiligrane Calcit-Partikel, die sogenannten Coccolithen, bilden. Über die Funktion der Coccolithen gibt es viele Theorien. Bisher ist ihre Aufgabe nicht vollständig verstanden, doch bedingt durch ein zunehmendes Interesse am industriellen Einsatz der Partikel werden Antworten darauf gesucht. Die natürlichen Ressourcen reichen für all die Anwendungsgebiete nicht aus. Daher muss ein geeignetes Kultivierungsverfahren für *E. huxleyi* entwickelt werden.

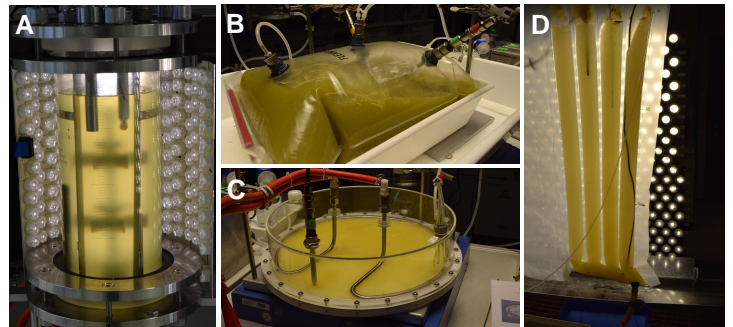


Links: *Emiliana huxleyi* mit Coccolithen, mitte und rechts: Einzelne Coccolithen (Alle REM-Bilder dieses Posters sind von: Dr. Birgit Hetzer, Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, Max Rubner-Institut).

Material und Methoden

In einem ersten Schritt erfolgte die Optimierung des Mediums im Schüttelkolben. Dabei wurden nacheinander alle Elemente des verwendeten ESAW-Mediums variiert. Nach jedem Optimierungsschritt wurden das Wachstum und die Kalzifizierung untersucht, um den Effekt der Veränderung sichtbar zu machen.

Nach Abschluss der Versuchsreihe wurde das modifizierte Medium in vier verschiedenen Reaktorsystemen getestet (siehe Abbildung rechts). So konnten verschiedene Einflüsse wie beispielsweise eine Blasenbegasung, Membranbegasung und bewegte Reaktorteile und deren Auswirkungen auf die Algenkultur getestet werden.

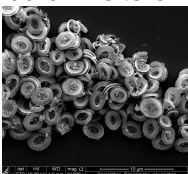


Verschiedene Reaktorsysteme, die für die Kultivierung von *E. huxleyi* verwendet wurden. A: Rührkesselreaktor, B: Bag-Reaktor, C: Membranreaktor D: Schlauchreaktor.

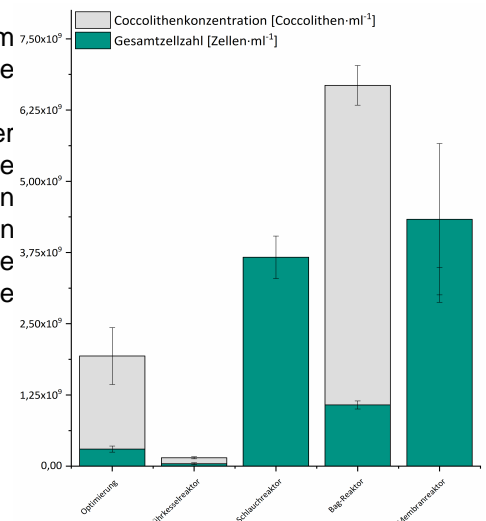
Ergebnisse

Durch die Variationen der Nährstoffkonzentrationen konnte die Zellzahl um das 9-fache erhöht werden. Die Coccolithenkonzentration konnte eine Zunahme um das 6-fache verzeichnen.

In den Reaktoren war die höchste Zellzahl durch regelmäßiges Auffüllen der Nährstoffe nochmals um das 14-fache höher, während die Coccolithenkonzentration um das 3,5-fache gestiegen ist. So konnten Zellkonzentrationen erreicht werden, wie sie auch in ähnlichen Mikroalgenprozessen vorliegen. Im Bag-Reaktor wurde eine Coccolithenmasse von 3,8 g/L gemessen. Zukünftig könnte diese Ausbeute durch weitere Prozessoptimierungen noch weiter gesteigert werden.



Links: Coccolithenmorphologie nach der Optimierung des Mediums, rechts: Maximale Zell- und Coccolithenkonzentration bei der Optimierung des Mediums und den vier Kultivierungen



Johanna.Zander@kit.edu

Natürliches Vorkommen der Blutregenalge (*Haematococcus pluvialis*), mögliche Nutzungsformen und Vermehrung im Labor zur Produktion von Astaxanthin

Martina Zehentner, Theresa Etter, Hannah Lindner, HBLA Ursprung,
Salzburg/Österreich

Im Rahmen unserer Diplomarbeiten an der HBLA Ursprung werden das natürliche Vorkommen der Blutregenalge in Österreich, das Einwirken von Temperatur und Licht sowie der Einfluss des Nährstoffangebots auf das Wachstum von *Haematococcus pluvialis* untersucht.

Allgemeine Charakterisierung von *Haematococcus pluvialis*

Die *Haematococcus pluvialis* ist eine einzellige Alge und gehört zu der Klasse der Grünalgen (Chlorophyceae, Chlorophyta). Sie ist hauptsächlich im Süßwasser verbreitet und kann maximal 0,05mm groß werden. Die äußerste Hülle der Blutregenalge ist eine Zellwand, die manchmal nach innen zusätzlich eine Gallertschicht bildet. Ansonsten besitzt die Zelle einen becherförmigen Chloroplast mit zahlreichen Pyrenoiden, zwei körperlangen Geißeln und einen Augenfleck. Zentral in der Zelle liegt der Zellkern.

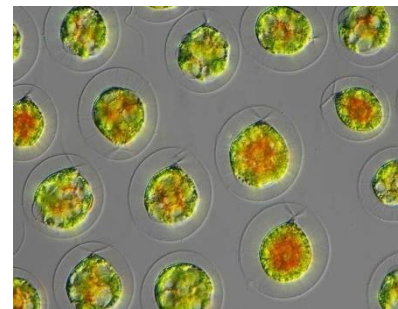


Abbildung 1, Blutregenalge im Mikroskop (F. Neidl)

Bedeutung von *Haematococcus pluvialis*

Die Bedeutung der Blutregenalge liegt vor allem im Nahrungsergänzungsmittelbereich sowie in der Kosmetik- und Lebensmittelbranche. Dafür ausschlaggebend ist besonders der rote Farbstoff Astaxanthin, welchen die Alge unter Stress in den Dauerzellen produziert.

Der Algenreaktor

Die Diplomarbeiten dienen als Grundlage für das Projekt, „geniALGE“ (genialge.at), in welchem die Alge auf Vliesen in einem Algenreaktor gezüchtet werden soll. Auch die Eignung verschiedener Nährmedien für die Kultivierung von *Haematococcus pluvialis* soll dafür untersucht werden.



Abbildung 2, verschiedene Blutregenalgenstämme (S. Ess)