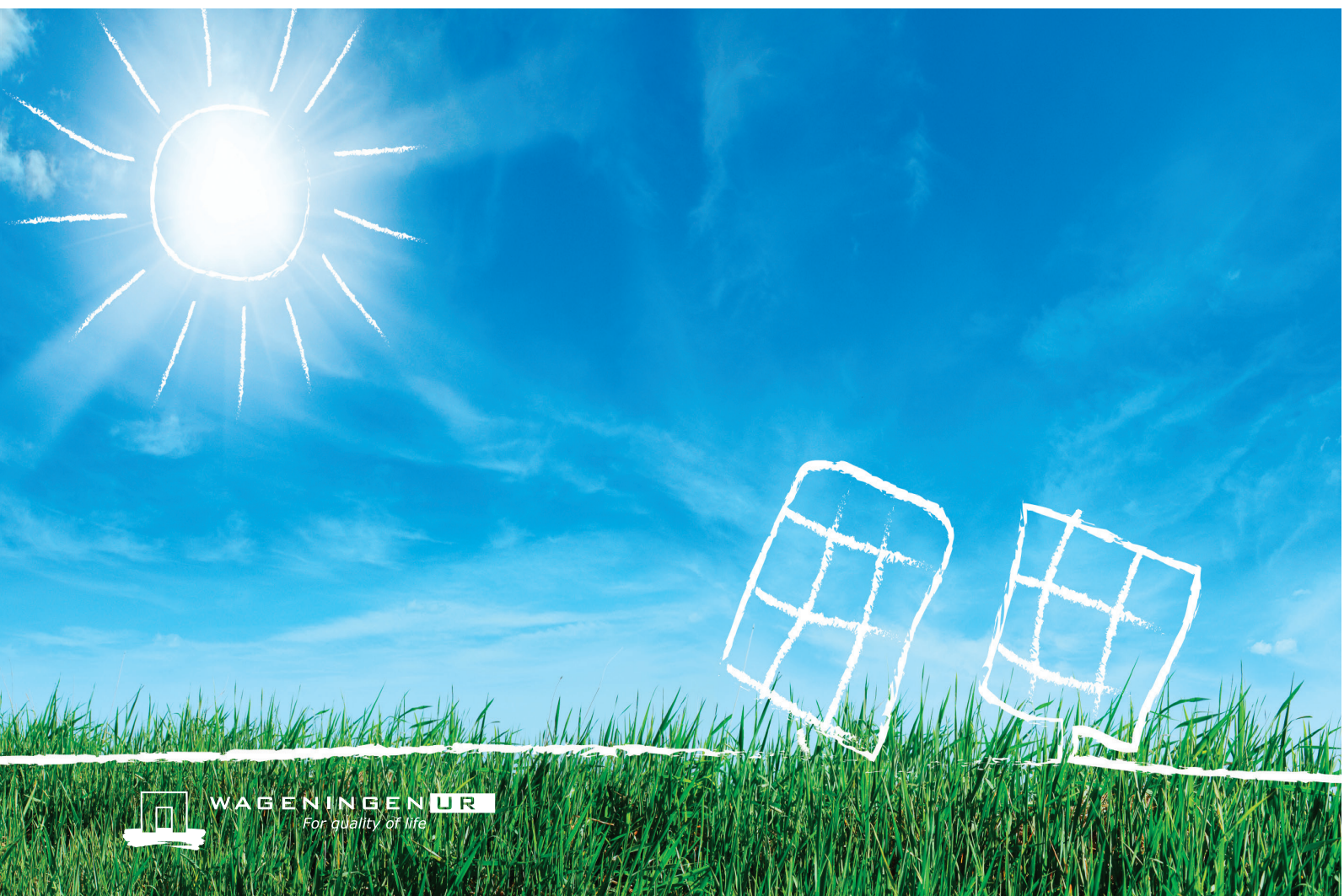


# Nieuwe verwaarding algenbiomassa: Literatuurstudie en praktische screening van enkele ontsluitingsmethoden

Auteurs: Maarten Kootstra, Roelof Schipperus, Wim van den Berg, Saskia Grobber-Gaastra,  
Rommie van der Weide



# Nieuwe verwaarding algenbiomassa:

Literatuurstudie en praktische screening  
van enkele ontsluitingsmethoden

Auteurs: Maarten Kootstra, Roelof Schipperus, Wim van den Berg, Saskia  
Grobbe-Gaastra, Rommie van der Weide

© 2013 Wageningen, ACRRES – Wageningen UR

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van ACRRES- Wageningen UR.

ACRRES – Wageningen UR is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Projecttitel: Naar een nieuwe verwaarding van algenbiomassa

Projectnr: 3250256200

Dit project wordt mede mogelijk gemaakt door het Samenwerkingsverband Noord-Nederland, koers noord.



ACRRES – Wageningen UR

Adres : Edelhertweg 1, Lelystad  
: Postbus 430, 8200 AK Lelystad  
Tel. : 0320 - 29 11 11  
Fax : 0320 - 23 04 79  
E-mail : [info@acrres.nl](mailto:info@acrres.nl)  
Internet : [www.acrres.nl](http://www.acrres.nl)

# Inhoudsopgave

1	INLEIDING .....	5
2	LITERATUURSTUDIE .....	7
2.1	Opzet .....	7
2.2	Beschrijving van algen.....	7
	<i>Chlorella</i> sp.....	7
	<i>Scenedesmus</i> sp.....	9
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	10
	<i>Pediastrum</i> sp. ....	11
	<i>Ankistrodesmus</i> sp. ....	12
2.3	Beschrijving van componenten en producten.....	13
2.4	Ontsluiting van algen .....	14
	Keuzes en gevolgen voor proces .....	14
	Bewerking van algen om componenten te winnen .....	14
	Oogsten en ontwateren .....	14
	Disruptie .....	14
	Extractie .....	15
3	PRAKTISCH ONDERZOEK .....	17
3.1	Opzet .....	17
3.2	Screening enzymatische ontsluiting.....	17
3.3	Screening chemische ontsluiting .....	19
3.4	Conclusies en aanbevelingen n.a.v. screening enzymatische en chemische ontsluiting .....	21
4	LITERATUURLIJST .....	23



# 1 Inleiding

Om de eiwitten, oliën, koolhydraten, carotenoïden en andere nuttige stoffen aanwezig in algencellen los van elkaar te kunnen benutten, is het nodig om de celwanden van de algen open te breken, ofwel om de algen te ontsluiten. Uiteraard is het van belang om dit te doen op een manier die de te winnen componenten zo min mogelijk beschadigt. Dit rapport bestaat uit twee delen. Het eerste is een literatuurstudie waarin een aantal algensoorten wordt omschreven, met waar mogelijk nadruk op de celwandstructuur. Verder wordt een aantal methoden beschreven om de celwanden te openen of te verzwakken. In het tweede deel van het rapport worden een aantal uitgevoerde proeven beschreven waarbij algen zijn behandeld met enzymen, schoonmaakazijn, of ethanol.



## 2 Literatuurstudie

### 2.1 Opzet

De focus van het literatuuroverzicht ligt bij de algensoorten uit de algencultures 'Hallum-mix' en 'ACRRES-mix'. Dit zijn ook de soorten die met enzymen zijn behandeld in proeven die verderop beschreven worden. De genoemde mixen bevatten soorten uit dezelfde algengeslachten, zoals zij in de desbetreffende omgeving voorkomen. De precieze samenstelling varieert per locatie, vijver en seizoen. De belangrijkste algen in de mixen zijn: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Phaeodactylum*, en *Pediastrum*.

### 2.2 Beschrijving van algen

#### ***Chlorella* sp.**

Algen van het geslacht *Chlorella* zijn eencellig, rond, en ongeveer 2-10  $\mu\text{m}$  in doorsnee. Ze komen voor in zowel zoet als zout water, bevatten chlorofyl en zijn doorgaans foto-autotroof, hoewel ook heterotrofe groei wordt beschreven. De celwand bestaat uit cellulose en bevat soms ook glucosamine (chitosan).

*Chlorella* algen kregen vanaf midden 20e eeuw veel aandacht als alternatieve voedselbron, vanwege het toen veronderstelde gemak waarmee grootschalige kweek kon leiden tot gebruik als belangrijke nieuwe eiwitbron. Deze aandacht heeft er mede toe geleid dat *Chlorella* veel is gebruikt in onderzoek. Zo is bekend dat *Chlorella*, afhankelijk van de groeiomstandigheden, kan worden gestuurd richting hoge lipideproductie (met 40-60% van de vetzuren onverzadigd), maar ook richting meer dan 50% eiwit in de droge stof. Ook is bekend dat sommige *Chlorella* soorten relatief grote hoeveelheden carotenoiden zoals astaxanthine,  $\beta$ -caroteen, en luteïne kunnen vormen. Er worden veel gezondheidsclaims neergelegd bij *Chlorella* algen, vaak gebaseerd op de onverzadigde vetzuren, eiwitten en carotenen, maar ook vanwege een hoge inhoud aan vitamines of sporenelementen. Ook aan waterig extract van *Chlorella* algen, ook wel *Chlorella* Growth Factor (CGF) genoemd, worden allerlei gezondheidsbevorderende en zelfs geneeskrachtige eigenschappen toebedacht [1]. Maar hoe deze claims wetenschappelijk ondersteund worden, is vaak onderbelicht.

*Chlorella* algen kunnen ook gekweekt worden onder omstandigheden waarbij ze zetmeel aanmaken en opslaan in de cel, tot ongeveer 50% van het drooggewicht [2, 3].

De *Chlorella* die deel uitmaakt van de ACRRES-mix is *C. protothecoides*, een soort die vooral wordt gebruikt voor de productie van lipiden voor de productie van algen-biodiesel. Zowel autotrofe als heterotrofe kweek wordt gemeld in de literatuur, en met beide kweekmethoden zijn lipidegehalten van meer dan 50% van de droge stof gerapporteerd (in bioreactor) [4, 5] (Figuur 1).

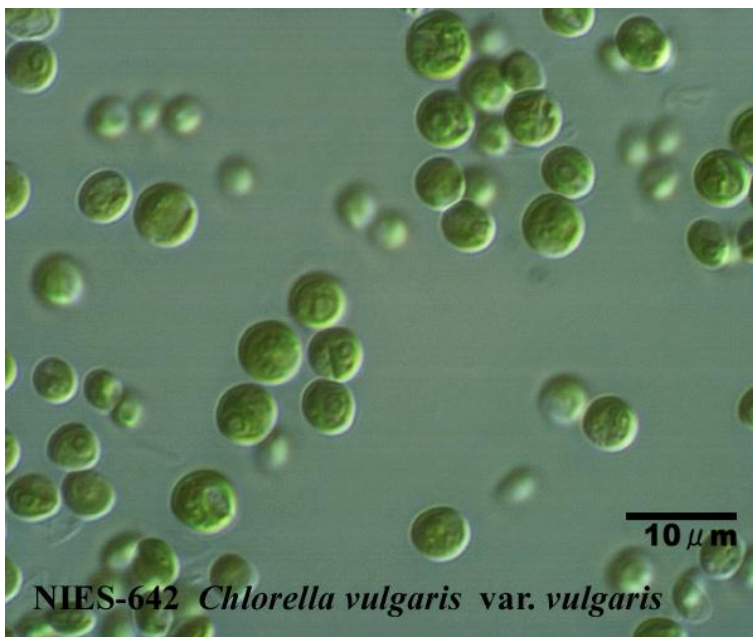
De celwand van *C. protothecoides* is gedefinieerd als glucose-mannose-rigid wall, en die van *C. vulgaris* als glucosamine rigid wall, wat wil zeggen dat de laatste chitosan bevat en de eerste niet [7].

*C. vulgaris* maakt deel uit van de Hallum-mix, en ook in de ACRRES vijvers wordt hij regelmatig gevonden (Figuur 2). Om onderscheid te maken tussen een kleine *C. protothecoides* en een *C. vulgaris*, kan gebruik gemaakt worden van het verschil in celwandsamenstelling.





Figuur 1. Lichtmicroscopfoto van *Chlorella protothecoides* [6]



Figuur 2. Lichtmicroscopfoto van *Chlorella vulgaris* [8]

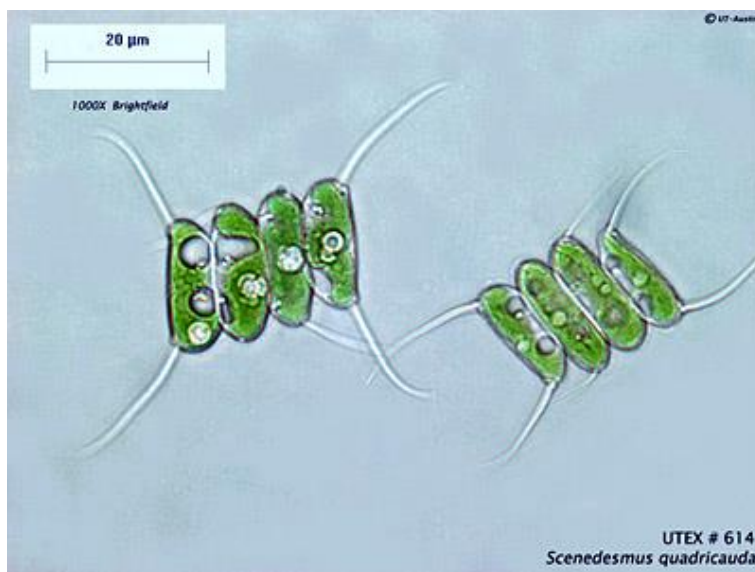
De samenstelling van de polysachariden van de matrix-celwand van *C. vulgaris* is geanalyseerd en bleek te zijn opgebouwd uit +/- 38% galactose, ruim 20% rhamnose, en arabinose, xylose, mannose, en glucose, elk voor ongeveer 10% van alle suikers [9].

Om protoplasten (cellen zonder celwand) te produceren voor verdere genetische onderzoeken, zijn enzymen toegepast. Een mengsel van cellulase en snailase bleek het best te werken. Veel beter dan elk apart, en ook beter dan mengsel van cellulase en pectinase of macerozyme. Snailase (kennelijk afkomstig uit slakken) is een mengsel van ongeveer 20 soorten enzymen en wordt als mogelijkheid gezien aangezien *C. protothecoides* wordt gegeten door slakken [10].

Om de celwand te verwijderen, wellicht ten dele, om zo makkelijker bij de inhoud te kunnen, lijkt een enzymatische behandeling toepasbaar. Hoe economisch verantwoord dit is, is nog niet duidelijk.

### ***Scenedesmus* sp.**

*Scenedesmus* is een geslacht van eencellige groene zoetwateralgen. De cellen zijn ovaal van vorm en doorgaans ongeveer 3x10 tot 10x25µm groot. Verder is opvallend dat de cellen vaak voorkomen in viervouden (coenobia) zijdelings aan elkaar gehecht (hoewel ook *Desmodesmus*-algen dit doen), met prominente uitsteeksels op de hoeken, en minder prominente bij andere cellen (Figuur 3).



Figuur 3. Lichtmicroscopfoto van *Scenedesmus quadricauda* [11]

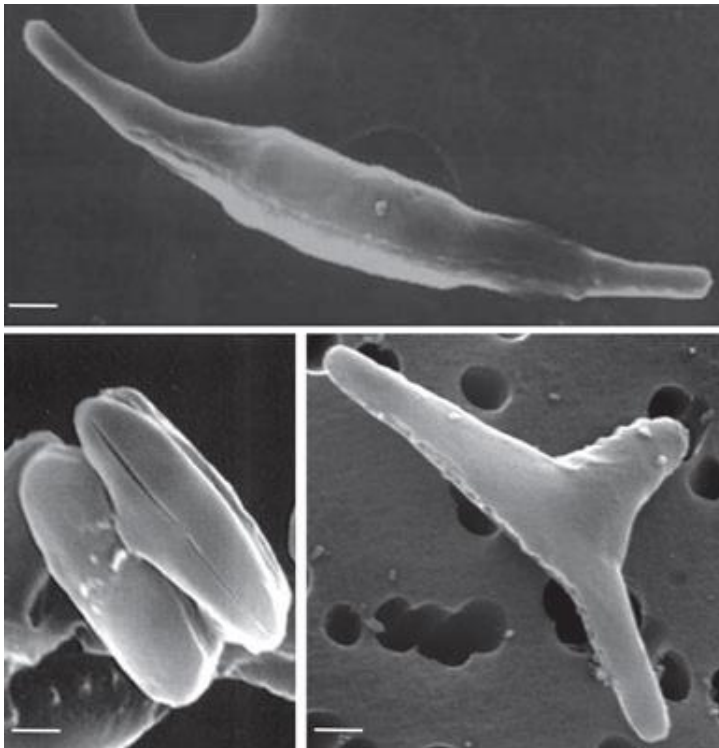
Onder optimale groeiomstandigheden kan 40-50% van de droge stof uit eiwit bestaan. Zonder stress produceert *Scenedesmus* minder van 15% ds lipiden, met ong 10% vetzuren. Door stress gerelateerd aan nutriententekort, stikstof of fosfaat, wordt *Scenedesmus* aangezet tot accumulatie van lipiden, tot 30% en zelf 53% ds. Onder de juiste groeiomstandigheden kan *Scenedesmus* carotenen produceren, bijv. vooral luteïne tot 1% ds [1, 12]. Onder laboratoriumomstandigheden kan een biomassaconcentratie gehaald worden van 0,11 g L<sup>-1</sup> dag<sup>-1</sup>, op secundair effluens (pH 7.7). De maximale groeisnelheid hierbij was 0,2 dag<sup>-1</sup>, en maximaal 80 mg L<sup>-1</sup> dag<sup>-1</sup> lipides kon worden opgehoopt [13].

Afhankelijk van de groeitemperatuur is gevonden dat *Scenedesmus* tussen de 20 en 40% ds lipiden bevatte, met ongeveer 10 tot 20% daarvan in triglyceriden. Bij stijging van de groeitemperatuur van 10 naar 30°C ging het percentage meervoudig onverzadigde vetzuren omlaag van 90 naar 10% van de aanwezige vetzuren. Bij 10°C werd vooral (85%) α-linoleenzuur (α-linolenic acid, C18:3) gevormd, terwijl bij 20°C en 25°C vooral (70% en 60%, resp) docosatrieenzuur (docosatrienoic acid, C22:3) werd gevormd. Bij 30°C bestond nog ongeveer 50% van alle vetzuren uit oliezuur (oleic acid, C18:1) [14].

Van een aantal soorten *Scenedesmus* is de celwandsamenstelling bepaald en hierbij bleek dat alle 9 geteste soorten beschikten over een 'rigid' celwand van polysacchariden bestaande uit glucose, galactose, en mannose, zonder chitosan (vgl *Chlorella protothecoides*). De polysacchariden van de matrix van de celwand bestaan vooral uit mannose, galactose, en glucose [15].

### ***Phaeodactylum tricornutum***

*Phaeodactylum tricornutum* valt binnen de diatomeeën, ook wel kiezelwieren of kiezelalgen genoemd. Dit is een groep mariene algen die zich met name kenmerkt door een rigide celwand/extern skelet bestaande uit siliciumdioxide. *P. tricornutum*, de enige soort in het geslacht *Phaeodactylum*, kan voorkomen in zout, brak en zoet water, en heeft de binnen diatomeeën unieke eigenschap pleiomorf te zijn, ofwel verschillende vormen te kunnen aannemen. Dit kan worden bereikt doordat de celwand veel minder siliciumdioxide bevat dan gewoonlijk het geval bij diatomeeën. Aanwezigheid van silicium is dan ook niet essentieel. Het organisme kan voorkomen als fusiform (langerekte cel, wat dikker in het midden), ovaal (soms geclusterd), en een triradiaal symmetrische vorm (driepuntige ster), zie Figuur 4. Groeiomstandigheden kunnen de vorm beïnvloeden, bijvoorbeeld voor wat betreft lengte, en het lijkt dat ook van fusiform en triradiaal vorm naar de ovale vorm kan worden gegaan, bijvoorbeeld bij suboptimale groeiomstandigheden. Ook is het zo dat alleen de ovale vorm in aanwezigheid van silicium de voor diatomeeën typische frustrules kan maken, terwijl de fusiforme en triradiaal vorm dit niet doen. Wel kan er in aanwezigheid van silicium in het groeimedium ook silicium in de celwand voorkomen, terwijl dit niet leidt tot de typische diatomee-celwand. De maximale groeisnelheden voor de fusiforme typen zijn +/- 0,97 d<sup>-1</sup>, en lager voor de ovale en triradiaal vorm (+/- 0,72 d<sup>-1</sup>) [16, 17].



Figuur 4. SEM foto van de drie vormen van *Phaeodactylum tricornutum*. (a) Fusiforme cel. (b) Twee ovale cellen. (c) Triradiate cel. Schaal: streep = 1 µm [17].

*Phaeodactylum tricornutum* wordt gekweekt als voer voor de aquacultuur van garnalen en tweekleppigen (oesters, mosselen, sint-jakobsschelpen), vanwege de hoge lipide-inhoud. De biochemische samenstelling van *P. tricornutum* is afhankelijk van de groeiomstandigheden. Een gemiddelde samenstelling van de droge stof is gerapporteerd [1]:

- 36,4% eiwit
- 26,1% koolhydraten
- 18,0% lipiden
- 15,9% as

Hierbij moet worden gezegd dat de gehalten, maar ook de vetzuursamenstelling afhankelijk zijn van de groeiomstandigheden, zoals nutriënt-depletie, zoutconcentratie, pH, temperatuur en lichtintensiteit. Verder is ook het moment van oogsten bij een batch (groeifase) van invloed op het oliegehalte en vetzuursamenstelling, wat een vergelijkend onderzoek van literatuur lastig maakt. Verschillende lipide-/oliegehalten zijn gerapporteerd in de droge stof: 21%, 26%, 31%, 18,7%, en 18-57%. *P. tricornutum* produceert relatief veel lange meervoudig onverzadigde vetzuren: arachidonzuur (arachidonic acid (AA)) (C20:4 $\omega$ 6), eicosapentaëenzuur (eicosapentaenoic acid (EPA)) (C20:5 $\omega$ 3), en docosahexaëenzuur (docosahexaenoic acid (DHA))(C22:6 $\omega$ 3) zijn de meest gevormde vetzuren. Gezamenlijk kunnen zij ongeveer 30% van alle aanwezige vetzuren vormen. Zowel in de onderlinge verhouding, als in de vorm waarin ze voorkomen (vrije vetzuren of triglyceriden) kan tijdens de kweek gestuurd worden. Ook door P-limitatie of variëren met de hoeveelheid beschikbare stikstof, kan worden gevarieerd met de lipidesamenstelling in deze alg. *P. tricornutum* kan groeien tussen ong 15-25 °C, met optimale groei bij 20-22 °C, afhankelijk van beluchting. Tussen pH 6 en 9 lijkt groei te kunnen plaatsvinden. Onder laboratoriumomstandigheden (in kolven) worden biomassa productie gemeld van 0,24 en 0,34 g L<sup>-1</sup> dag<sup>-1</sup>, en een lipideproductie van 45 en 72 mg g L<sup>-1</sup> dag<sup>-1</sup>. In fotobioreactoren (buisenreactoren, airlift/helical) wordt 1,3 tot 2,6 g L<sup>-1</sup> dag<sup>-1</sup> gerapporteerd, met EPA productiviteit tot 48 mg L<sup>-1</sup> dag<sup>-1</sup>. In kleine vijvers van 2,2 m<sup>2</sup>, is een biomassa productie van 4 g m<sup>-2</sup> dag<sup>-1</sup> gerapporteerd, met EPA productie van 0,15 g m<sup>-2</sup> dag<sup>-1</sup>. Als oogstmethode wordt centrifugeren (1800xg) en flocculatie met calcium hydroxide gesuggereerd ([1] en referenties in [1]).

De organische celwand van de fusiforme *P. tricornutum* bestaat uit drie lagen, een binnenste van ong 3 nm, en een middelste van 4-6 nm. Het basale deel van de buitenste laag is ongeveer even dik als de binnenste laag, maar door kleine uitstulpingen varieert de totale buitenste laag enigszins in dikte [18]. Verder word de celwand omschreven als samengesteld uit polysacchariden, eiwitten, en uronzuren. Ook worden lipiden genoemd, en het eerder genoemde silicium. *P. tricornutum* kan ook nog exopolysacchariden produceren, en deze bevatten waarschijnlijk ook fenolische aminozuren zoals tyrosine en phenylalanine [16, 19].

### ***Pediastrum* sp.**

*Pediastrum* is een geslacht van eencellige groene zoetwateralgen. De cellen van *P. duplex*, de soort in de ACRRES-mix, hebben de neiging om zich te groeperen in ringvormige, platte (één cel dik) coenobia van 4-64 cellen, en indien er 16 of meer cellen in een coenobium zitten, zullen concentrische ringen gevormd worden met ruimte tussen de afzonderlijke cellen. De cellen zijn 8-32  $\mu$ m in doorsnee, en een coenobium 15-400  $\mu$ m. De binnenste cellen van een coenobium zijn hoekig, en de buitenste cellen bezitten één of twee hoornachtige uitstulpingen (Figuur 5) [20].

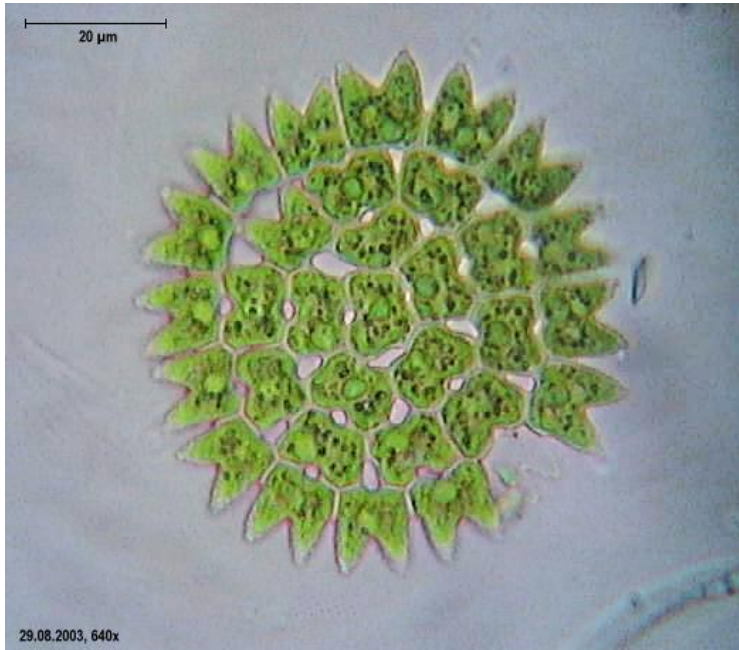
De celwand van *P. duplex* bevat silicium, uitzonderlijk voor groene algen. Ook bevat de celwand een kristallijne component van D-glucose en D-mannose, aanwezig in non-microfibrillair netwerk van onderling verweven ketens [20].

Omdat *Pediastrum* algen goed worden gepreserveerd in sedimenten, worden deze algen gebruikt in paleontologisch onderzoek als (paleo-)bioindicatoren [21]. Ook is bekend dat *P. duplex* erg resistent is tegen microbiële afbraak, en dan met name het sporopollenine-deel van de celwand [22]. Het is niet helemaal duidelijk in hoeverre de laatste twee opmerkingen gerelateerd zijn.

De celwand bevat, afgezien van de eerder genoemde glucose en mannose, ook galacturonzuur en wat fucose. Algemeen wordt gesteld dat de celwand 16,2% eiwit, 0,7% lipiden, 48% koolhydraten, en 8,2% uronzuren bevat. De aminozuurverdeling van het eiwit is ook bekeken, en hieruit bleek dat er niet echt één uitspringt. Glycine, alanine, en serine komen het meest voor, met respectievelijk 1,6%, 1,7%, en 1,9% van het droge celwand-gewicht [22].

In de literatuur is weinig tot geen informatie te vinden over biotechnologische toepassingen van *P. duplex*.





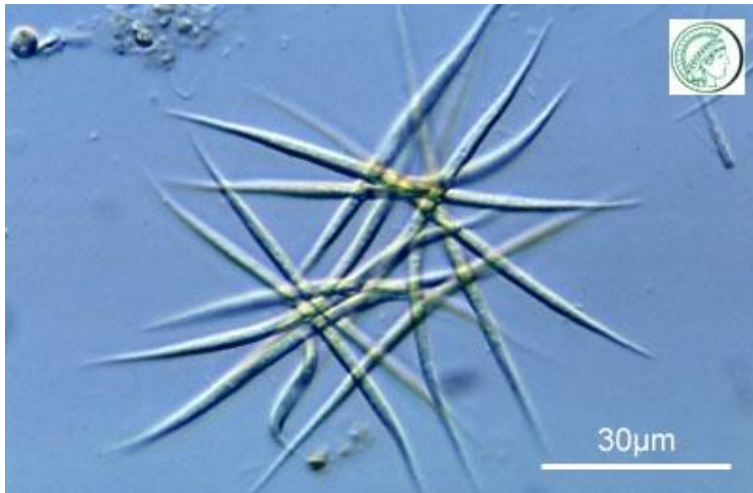
Figuur 5. Lichtmicroscopfoto van *Pediastrum duplex* (bron: Ralf Wagner, 2003)

### ***Ankistrodesmus* sp.**

Deze algensoort zit niet in de ACRRES-mix, maar wordt wel in de vijvers aangetroffen. Kennelijk komt hij 'van buiten'. *Ankistrodesmus* vormt meestal kleine kolonies of bundels van 4 tot 16 afzonderlijke cellen. De cellen zijn langgerekt met puntige uiteindes, en meestal wat krom of gedraaid, hoewel een rechte vorm ook voor kan komen (Figuur 6 en Figuur 7). *Ankistrodesmus* komt voor in zoetwater, meestal in enigszins zuur schoon water, bij gematigde temperaturen. Het onderscheid tussen de verschillende soorten wordt doorgaans gemaakt op basis van celgrootte en -vorm [20]. Over biotechnologische toepassingen lijkt in de literatuur weinig of geen informatie te bestaan, afgezien van meldingen als organisme dat wordt gebruikt in studies naar waterkwaliteit, watervervuiling, en opname/afbraak van zware metalen of biocides in aquatische ecosystemen [23-25].



Figuur 6. Lichtmicroscopfoto van *Ankistrodesmus falcatus* [26]



Figuur 7. Lichtmicroscopfoto van *Ankistrodesmus fusiformis* (B. Meyer, [26])

## 2.3 Beschrijving van componenten en producten

Indien een alg veel olie (triglyceriden) produceert, kan deze worden toepast, na esterificatie, voor de productie van biodiesel. Algen kunnen ook specifieke vetzuren produceren voor gebruik in voeding en diervoeding. Meestal wordt hiermee bedoeld op de productie van meervoudig onverzadigde vetzuren.

Eiwitten hebben waarde in de diervoeding, en eventueel ook voor menselijke voeding. Sommige algen bestaan voor ruim 50% (op basis van droge stof) uit eiwitten.

Wanneer een alg veel zetmeel produceert kan worden gedacht aan toepassing van dit zetmeel voor de productie van bioethanol, of andere fermentatieproducten uit de glucose waaruit het zetmeel bestaat. Hetzelfde zou kunnen gelden voor de suikers uit de celwand, maar deze zitten vaker in lastiger afbreekbare polymeervorm, zoals  $\beta$ -glucaa en  $\beta$ -mannaan, in structuren als cellulose en chitosan/chitine. Wellicht interessant is een toepassing als Mycosorp, gemaakt met  $\beta$ -glucaa uit celmateriaal van gistcellen. Dit Mycosorp-materiaal wordt vermarkt als mycotoxine-bindend, wat een positief effect zou geven op de afgenomen groei en gezondheid van dieren, wanneer deze gevoerd worden met voer waarin mycotoxines zoals aflatoxine en zearalenon voorkomen [27]. Polysachariden uit de celwand van gisten worden ook genoemd in verband met het tegengaan van het nestelen/opnemen van pathogenen in de darmen van varkens [28]. Het zou kunnen dat  $\beta$ -glucaanhoudend celwandmateriaal van algen ook op een dergelijke manier toepassing kan vinden. Deze toepassingen worden ook gesuggereerd voor extracellulaire polysachariden van macro-algen (zeewier) in een Van Hall Larenstein draft-rapport binnen het huidige project. Ook wordt hier de mogelijkheid genoemd om klei die voor mycotoxine-binding wordt gebruikt te verbeteren door toevoeging van  $\beta$ -glucaa uit zeewier [29]. In hoeverre dit interessant is kan worden bekeken, en ook of dit ook geldt voor onderdelen (zoals  $\beta$ -glucaa) uit de celwand van micro-algen.

Carotenoiden, zoals  $\beta$ -caroteen dat in vitamine A kan worden omgezet, en de pigmenten luteïne en astaxanthine worden in algen gevormd om lichtenergie te absorberen, maar ook om het chlorofyl te beschermen tegen lichtschade. Deze stoffen hebben toepassingen als kleurstof in voeding, maar ook in diervoeding, bijv astaxanthine in voeder voor zalm om het vlees dieper rozerood te kleuren.

## 2.4 Ontsluiting van algen

### Keuzes en gevolgen voor proces

De keuze voor het te winnen product zal uiteraard van grote invloed op het totale proces. Niet alleen zal de keuze voor de te kweken alg ervan afhangen, maar ook de kweekomstandigheden. Immers, voor sommige producten moet de alg zo snel mogelijk groeien, terwijl voor andere producten het organisme juist moet worden gestressed om aangezet te worden tot productie. De combinatie van organisme en gewenst product zal ook in grote mate de keuze voor het ontsluiten van de alg bepalen. Zo is het heel goed mogelijk dat wanneer een celwandonderdeel het te winnen product is, een ander ontsluitingsproces moeten worden gevolgd dan wanneer de celwand 'in de weg zit' om bij de celinhoud te komen. Hieronder volgen een aantal deelprocessen en mogelijkheden.

### Bewerking van algen om componenten te winnen

Bij de productie van biodiesel van olie uit algen komen de volgende stappen aan bod:

1. Oogsten en ontwateren
2. openbreken van cellen (disruptie)
3. extractie van olie
4. conversie van olie naar diesel

In algemene zin zal ook bij andere producten een deel van de, of alle, bovengenoemde stappen moeten worden gevolgd. Oogsten en ontwateren zullen waarschijnlijk een onderdeel zijn van de meeste downstream-processen bij de raffinage van algen. Bij de genoemde extractiestappen hangt de uitvoering meer af van de te winnen component.

### Oogsten en ontwateren

Voor het oogsten en ontwateren van algen kan gebruik worden gemaakt van sedimentatie, flocculatie, centrifugatie, filtratie (druk- of vacuum-), of een combinatie hiervan. Eventueel kan er nog een droogstap volgen, indien nodig voor de volgende stap: de disruptie.

### Disruptie

Bekende manieren om cellen stuk te maken zijn: 'bead-milling', hogedruk-homogenisatie, en sonicatie. Ook kan enzymatische degradatie van de celwand worden toegepast, of Pulsed Electric field (PEF). Bij PEF wordt de cel blootgesteld aan een sterk en wisselend elektrisch veld, waardoor er gaten in het celmembraan ontstaan en de celinhoud naar buiten kan komen. Oplossen van droge algen in ionische vloeistof (ionic liquid) kan ook. Deze vloeistoffen kunnen worden gezien als vloeibare zouten, maar wel bij kamer- of slechts licht verhoogde temperatuur. De meeste biomassa, ook algen, lossen redelijk makkelijk op in een geschikte ionische vloeistof, waarbij de celstructuur volledig verloren gaat. Uit deze vloeistof kunnen dan weer de verschillende fracties worden teruggewonnen. Het nadeel is dat de ionische vloeistoffen zelf meestal niet goedkoop zijn, en terugwinning van de vloeistoffen na gebruik is niet heel makkelijk. Als voordeel kan gezien worden dat het zowel kan zorgen voor celdisruptie als voor 'extractie' van de gewilde stoffen [30].

Celwanddegradatie kan ook worden bereikt door chemische of enzymatische behandeling. Een chemische behandeling kan bijvoorbeeld inhouden het toevoegen van zuur of base, of van ethanol. Een wat mildere methode is de enzymatische behandeling. Deze is in het verleden ontwikkeld voor de productie van protoplasten (algen zonder celwand, met intact celmembraan), om verder moleculair biologisch/genetisch werk te vergemakkelijken. Het type enzym dat gebruikt wordt, hangt uiteraard af van de samenstelling van de celwand, maar ook van de bedoeling van de behandeling: moeten delen van de celwand uiteindelijk geogst worden, of ligt de focus bij de inhoud van de cel? Al naar gelang de samenstelling van de celwand

kunnen worden gebruikt: cellulase, chitinase, chitosinase, lysozym, etcetera. Hierbij dient ook opgemerkt te worden dat vaak mengsels van verschillende enzymen worden toegepast, en ook een commercieel enzym kan bestaan uit een mengsel van verschillende enzymen. Zo kan er in 'cellulase' aanwezig zijn: endo-cellulase (knipt cellulose-ketens doormidden), exo-cellulase (knipt cellobiose, een dimeer van glucose, af van een uiteinde), en cellobiase (splitst cellobiose in twee glucosemoleculen). Het beste enzym-mengsel, de aanwezige componenten en de onderlinge verhouding hiervan kunnen dus erg specifiek voor de toepassing zijn.

### **Extractie**

Bij algenkweek voor biodieselproductie moet na de disruptie de aanwezige olie worden gewonnen. Dit kan door middel van extractie met een oplosmiddel. Het is een bekende en veelgebruikte techniek, waarbij als nadeel zou kunnen worden gesteld dat de gebruikte oplosmiddelen vaak toxisch zijn en mede hierom niet als duurzaam worden gezien (bijv. hexaan). Gebruik van superkritisch CO<sub>2</sub> kan hierbij een oplossing zijn, maar deze technologie vereist door de procescondities vrij grote investeringen. Overigens wordt persen ook toegepast, en ook kan de extractie ondersteund worden met een ultrasone behandeling, of met magnetronbehandeling [31]. Uiteraard hangt de methode waarmee het gewenste product uit de kapotgemaakte algen wordt gehaald erg af van het product. De hierboven genoemde methoden zijn groten deels van toepassing op olie extractie, maar bij een andere te extraheren component zal de methode anders zijn. Zo kan bij extractie van eiwitten gedacht worden aan het water-oplosbaar maken van eiwitten door het veranderen van de zuurtegraad (pH).

Er bestaan ook mogelijkheden om algen te 'melken'. Dit houdt in dat product, bijvoorbeeld carotenoïden, tijdens de kweek wordt gewonnen, ofwel *in situ* wordt geëxtraheerd [32].





## 3 Praktisch onderzoek

### 3.1 Opzet

Binnen het project wordt gezocht naar een praktische manier om algen op grote schaal te ontsluiten. Hierbij wordt met name gedacht aan een enzymatische of een chemische ontsluiting. Voor de enzymatische ontsluiting wordt in dit deel van het onderzoek gekeken naar enzymen die de potentie hebben om de celwand van algen te doorbreken, en voor de chemische ontsluiting wordt gekeken naar behandeling met schoonmaakazijn en met ethanol.

### 3.2 Screening enzymatische ontsluiting

Er worden 5 enzym-mixen (en twee extra combinaties van mixen) getest op hun vermogen om algencellen open te breken. De enzym-mixen worden vergeleken met vier referenties: water als blanco, schoonmaakazijn (50% eindconcentratie volumebasis) als positieve controle, en de 0,2 mol/L fosfaatbuffer die wordt gebruikt om de enzymen mee te verdunnen bij pH 3 en pH 6. De zeven enzymbehandelingen bestaan uit:

1. Maaginhoud van de lebmaag, bij pH 3 gelijk aan de condities in de maag.
2. Maaginhoud van de boekmaag, bij pH 6.
3. Maaginhoud van de netmaag, bij pH 6.
4. Depol 670L, een commercieel beschikbare enzym-mix met een bereik van pH 4-5 en de temperatuur mag niet hoger worden dan 65 °C .
5. Protease FE212, een protease-mix uit *Bacillus* sp. Engelse beschrijving: Protease. Protein hydrolytic activity: 150 CU/ml. Amino acid ester hydrolytic activity : 75 N-acetylglycine ethyl ester hydrolysis unit (NAGEU)/ml. pH range: 6-8 (Opt: 7) temperature: 10-65 °C (Opt: 60°C).
6. Een 50/50 (op volumebasis) mix van Depol 670L en Protease FE212.
7. Een mix van enzymen 1 t/m 5 (20% van elk, op volumebasis)

De gebruikte maaginhoud (herkomst: Kelstein) met 2 delen glycerol gemengd, waarna dit mengsel 10x is verdund met fosfaatbuffer. De commerciële enzymmixen zijn direct 10x verdund met fosfaatbuffer. De gebruikte fosfaatbuffer is 0,2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Acros; 424375000) in water, op pH begracht met HCl (37%, Merck/VWR, Vel 1030). Het gebruikte schoonmaakazijn is een oplossing van 5 tot 15% azijnzuur in water (Piek).

De enzymmixen worden op de gewenste pH gebracht met de fosfaatbuffer en getest op 2 verschillende algencultures; de ACRRES-mix en een zuivere cultuur van *Chlorella protothecoides* (SLYCP29). Bij de behandeling zijn de algen overnacht ingezet bij 30°C. Na deze incubatie volgde een microscopische inspectie waarbij 50 cellen onder de microscoop werden bekeken, en het percentage opengebroken cellen is weergegeven in Tabel 1. Ter illustratie staan in Figuur 8 een aantal foto's van *Chlorella* cellen uit de ACRRES-mix, na behandeling. Links een blanco controle met gezonde cellen, in het midden twee geperforeerde cellen na behandeling met lebmaag enzym, en rechts een aantal cellen waar de celwand lijkt los te laten na een behandeling met schoonmaakazijn.

Over de screening van de enzymen kan gezegd worden dat de enzymatisch behandelingen weinig effect lijken te hebben op de *Chlorella* cellen. De ACRRES-*Chlorella* lijkt iets gevoeliger dan die in de monocultuur voor de lebmaag-enzymen en de mix van Depol 670/Protease FE212, maar de werking is niet heel sterk met respectievelijk 44% en 37% van de cellen geopend. Wanneer de 5 enzymen worden gemengd, is de gezamenlijke werking wat beter. Zowel voor de ACRRES-*Chlorella* als de monocultuur wordt ruim de helft

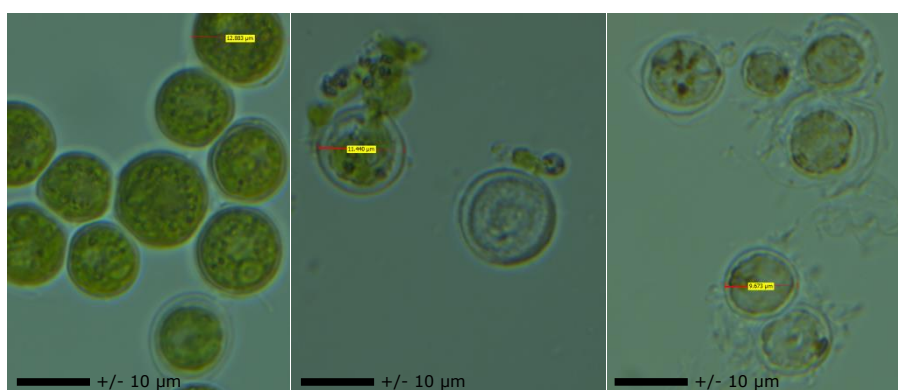
van de cellen geopend tijdens incubatie. Voor *Phaeodactylum* zijn de resultaten vergelijkbaar met die van de ACRRES-*Chlorella*, zij het iets extremer. De behandeling met lebmaag-enzymen leidt tot volledige afbraak van de cellen, terwijl de andere maag-enzymen geen enkele uitwerking lijken te hebben. Het mengsel van Depol 670/Protease FE212 heeft een niet heel sterke werking, maar het mengsel van alle 5 enzym-mixen leidt tot opening van bijna alle cellen. De positieve controle met schoonmaakazijn leidde tot afbraak van de celwand bij bijna alle cellen, terwijl de blanco behandeling met water zoals verwacht vrijwel geen open cellen tot gevolg had. De bufferoplossing die gebruikt werd om de enzymen mee te verdunnen en de pH in te stellen, had zoals verwacht weinig effect, met de *Chlorella* uit de monocultuur als uitzondering. Deze bleek gevoelig voor de fosfaatbuffer bij pH 3. Opvallend, aangezien de lebmaag-enzymen bij deze pH geen effect leken te hebben. Dit is iets om bij eventuele verdere proeven in de gaten te houden.

In het algemeen kan nog worden opgemerkt dat deze resultaten indicatief en dus niet alleszeggend zijn. Een celwand die niet open gaat, kan nog steeds verzwakt zijn en gevoeliger voor eventuele verdere bewerking. En zoals eerder in dit rapport gesteld, het gewenste effect hangt af van het gewenste product.

Tabel 1. **Screening enzymatische behandeling: percentage open algencellen na behandeling.**

Enzym/behandeling	pH	ACRRES-mix		Monocultuur
		<i>Chlorella</i>	<i>Phaeodactylum</i>	<i>Chlorella protothecoides</i>
Lebmaag	3	44	100	0
Boekmaag	6	16	2	0
Netmaag	6	0	0	0
Depol 670L	6	2	0	10
Protease F212	6	0	0	2
Mix Depol + Protease	6	37	33	4
Mix 5 enzymen	6	63	96	52
Schoonmaakazijn 50%	3	100	96	100
Fosfaatbuffer	6	0	0	0
Fosfaatbuffer	3	4	0	100
Blanco (water)	9	4	0	0

Groen = meer dan 75% van de cellen geopend; geel = tussen 50 en 75%; rood = 50% of minder



Figuur 8. **Lichtmicroscopfoto's van *Chlorella* sp. uit ACRRES-mix na verschillende behandelingen.**

Links: blanco controle met gezonde cellen; midden: twee geperforeerde cellen na behandeling met lebmaag enzym; rechts: cellen na behandeling met schoonmaakazijn.

### 3.3 Screening chemische ontsluiting

De opzet en het doel van deze proeven is gelijk aan die bij de enzymproeven. Vijf eindconcentraties schoonmaakazijn, variërend van 10% tot 50% (volumebasis), en twee eindconcentraties ethanol, 50% en 25% (volumebasis), zijn getest op hun vermogen om algencellen open te breken. Hetzelfde schoonmaakazijn is gebruikt als bij de enzymproeven, en de ethanol was 96% zuiver, gedenatureerd met 5% methanol (Boom 76053183). Voor de ontsluiting van algen op grotere schaal is het interessant om met een hogere concentratie algen te werken, vandaar dat tests zijn uitgevoerd met zowel algencultuur als geconcentreerde algenpasta van de oogst uit de algenvijvers van ACRRES. De algenpasta werd eerst 1:1 verdund met water en vervolgens 1:1 gemengd met een oplossing om de bedoelde concentratie schoonmaakazijn of ethanol te bereiken, evenals een gelijke concentratie algen. Bij de behandelingen zijn de algen overnacht ingezet bij 4°C. Na de incubatie volgde een microscopische inspectie waarbij 50 cellen onder de microscoop werden bekeken, waarvoor een verder verdunning plaats vond. Het percentage opgebroken cellen is weergegeven in Tabel 2 en

Ter illustratie staan in Figuur 9 een aantal foto's van cellen van *Chlorella* en *Scenedesmus* cellen uit de ACRRES-mix, na behandeling. Links een blanco controle met gezonde cellen, in het midden twee geperforeerde cellen na behandeling met lebmaag enzym, en rechts een aantal cellen waar de celwand lijkt los te laten na een behandeling met schoonmaakazijn.

Iets dat opvalt bij de behandelingen van de algenculturen is dat *Phaeodactylum* erg gevoelig lijkt, aangezien deze alg bij vrijwel alle behandelingen volledig af lijkt te breken. Bij de algenpasta is de gevoeligheid een stuk minder, en de werking is alleen vrijwel volledig bij de hogere concentraties en neemt af bij de lagere. Misschien is het verschil te verklaren uit het feit dat er in de pasta veel meer cellen per volume zitten, maar dit gaat dan niet op voor de *Chlorella*-cellen. Hier lijken de cellen in de pasta juist iets gevoeliger. De reden voor dit verschil is onbekend. Overigens lijken de *Chlorella* cellen uit de ACRRES-mix ook voor de chemische behandeling wat gevoeliger dan die in de zuivere cultuur.

Bij de algenpasta-experimenten zijn ook de effecten op *Scenedesmus* en *Ankistrodesmus*-algen bekeken. Het lijkt erop dat deze algen vergelijkbaar reageren met *Phaeodactylum*, misschien iets minder gevoelig.

Over het algemeen zijn de resultaten zoals verwacht zou kunnen worden: hoe hoger de concentratie van de chemische stof, hoe duidelijker de werking en dus hoe groter het percentage van de cellen dat geopend wordt. De blanco controle met alleen water had geen open cellen tot gevolg.

Tabel 2. **Screening enzymatische behandeling, algencultuur: percentage open algencellen na behandeling**

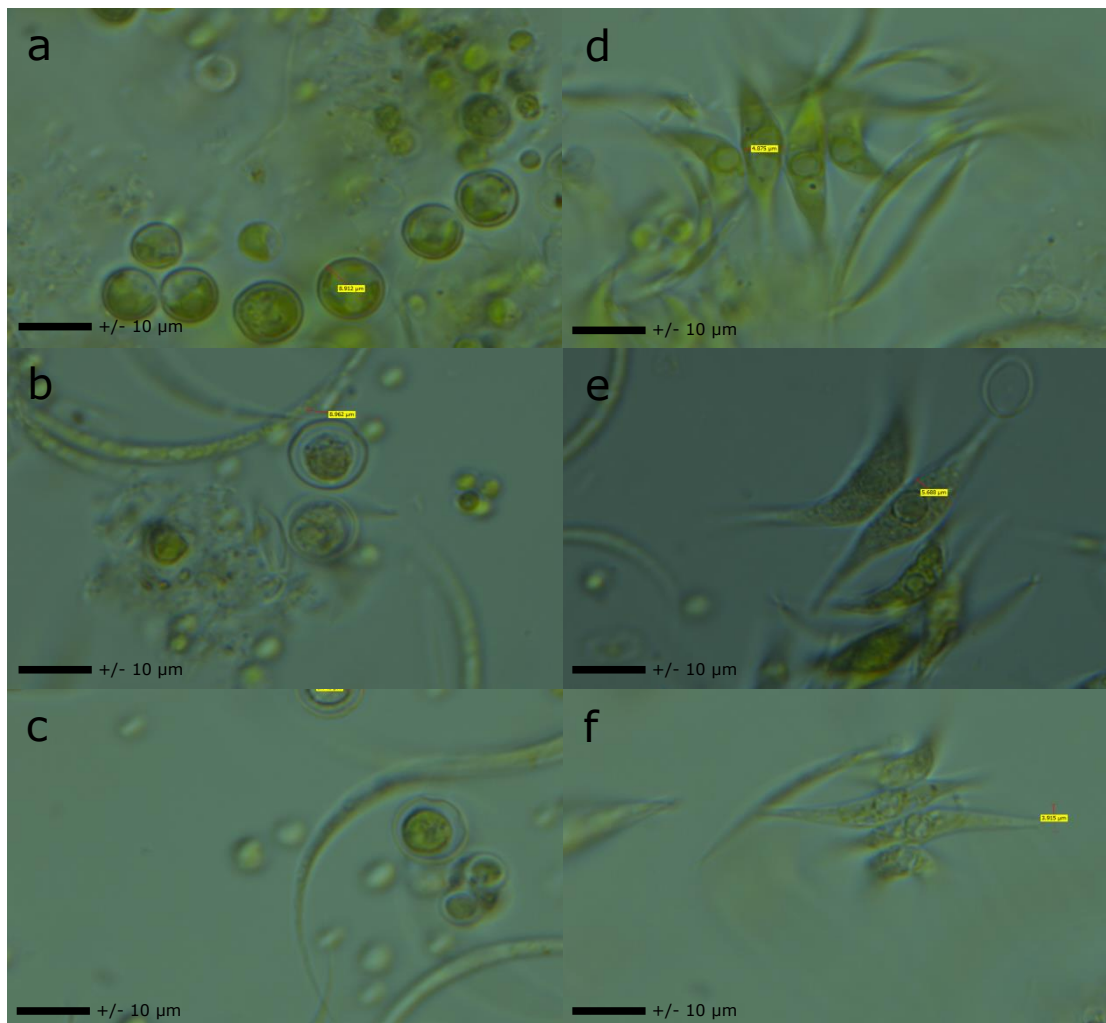
Behandeling	ACRRES-mix		Monocultuur
	<i>Chlorella</i>	<i>Phaeodactylum</i> <sup>*1</sup>	<i>Chlorella protothecoides</i>
Blanco (water)	0	0	0
Schoonmaakazijn 50%	100	100	100
Schoonmaakazijn 40%	100	100	100
Schoonmaakazijn 30%	84	76	36
Schoonmaakazijn 20%	54	100	26
Schoonmaakazijn 10%	51	100	16
Ethanol 50%	91	100	75
Ethanol 25%	52	100	51

Groen = meer dan 75% van de cellen geopend; geel = tussen 50 en 75%; rood = 50% of minder  
<sup>\*1</sup> Bij de telling van *Phaeodactylum* is in veel gevallen na de incubatieperiode slechts een beperkt aantal cellen terug te vinden. Omdat in de blanco wel 50 cellen te tellen zijn lijkt het erop dat de lysis van *Phaeodactylum* volledig verloopt en de cellen compleet uit elkaar vallen.

Tabel 3. **Screening chemische behandeling, algenpasta: percentage open algencellen na behandeling**

Behandeling	ACRRES-mix			
	<i>Chlorella</i>	<i>Phaeodactylum</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Ankistrodesmus</i>
Blanco (water)	0	0	0	0
Schoonmaakazijn 50%	96	100	100	100
Schoonmaakazijn 40%	96	100	100	100
Schoonmaakazijn 30%	94	74	37	15
Schoonmaakazijn 20%	77	28	13	4
Schoonmaakazijn 10%	98	21	14	12
Ethanol 50%	78	92	84	89
Ethanol 25%	99	32	4	18

Groen = meer dan 75% van de cellen geopend; geel = tussen 50 en 75%; rood = 50% of minder



Figuur 9. **Lichtmicroscopfoto's van *Chlorella* en *Scenedesmus*, uit ACRRES-mix na verschillende behandelingen.**

a=onbehandelde *Chlorella* cellen; b=*Chlorella* na 25% ethanol; c=*Chlorella* na 50% schoonmaakazijn; d=onbehandelde *Scenedesmus* cellen; e= *Scenedesmus* na 25% ethanol; f= *Scenedesmus* na 50% schoonmaakazijn.

### 3.4 Conclusies en aanbevelingen n.a.v. screening enzymatische en chemische ontsluiting

In de screening van enkele enzymen om cellen te openen kwamen vrij grote verschillen in effectiviteit van verschillende enzymen naar voren, net als verschillen in gevoeligheid van de geteste soorten algen. De lebmaag-enzymen hadden beperkt succes op de *Chlorella* uit de ACRRES-mix, maar geen effect op die uit de monocultuur. Het meest succesvol was het mengsel van alle 5 geteste enzymen. *Phaeodactylum*-cellen lijken gevoeliger dan *Chlorella* voor de lebmaag-enzymen en het mengsel van de 5 enzymen.

Kennelijk bieden enzymatische behandelingen mogelijkheden om celwanden van algen af te breken. Er moet worden bekeken of het beter is per soort alg een min of meer specifiek enzym te vinden, of dat beter een mengsel van enzymen kan worden gebruikt.

Bij de chemische ontsluiting kan worden gesteld dat zowel schoonmaakazijn als ethanol effectief zijn, en hoe hoger de concentratie hoe beter. Bij 40-50% schoonmaakazijn en bij 50% ethanol breken vrijwel alle cellen open. Opvallend is dat *Phaeodactylum* minder gevoelig lijkt voor celwandafbraak als de behandeling op geconcentreerde algenpasta plaatsvindt, terwijl de *Chlorella* uit de ACRRES-mix dan juist gevoeliger wordt, vergeleken met de behandeling van niet-geconcentreerde geogste cultuur.

Ook de chemische behandelingen bieden mogelijkheden om celwanden van algen af te breken, en ook hier reageren verschillende soorten algen anders op de behandeling.

Het verdient aanbeveling om verder te gaan met onderzoek naar dit soort behandelingen, zodat verder gekeken kan worden naar geschikte ontsluitingsmethoden, en eventueel stappen genomen kunnen worden naar optimalisatie. Om dit te doen zal het nodig zijn om meer specifiek te zijn in de soorten algen die gekweekt worden, en ook wat betreft de gewenste producten.



## 4 Literatuurlijst

1. Garofalo, R., Algae and aquatic biomass for a sustainable production of 2nd generation biofuels - Taxonomy, Biology and Biotechnology, 2011, Aquafuels. p. 258.
2. Pirt, M.W. and S.J. Pirt, Photosynthetic production of biomass and starch by *Chlorella* in chemostat culture. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*, 1977. 27(6): p. 643-650.
3. Izumo, A., et al., Physicochemical properties of starch in *Chlorella* change depending on the CO<sub>2</sub> concentration during growth: Comparison of structure and properties of pyrenoid and stroma starch. *Plant Science*, 2007. 172(6): p. 1138-1147.
4. Xiong, W., et al., High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. 2008. 78(1): p. 29-36.
5. Xu, H., X. Miao, and Q. Wu, High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 2006. 126(4): p. 499-507.
6. Marten, G.G., Larvicidal algae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2007. 23(sp2): p. 177-183.
7. Takeda, H., Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 1991. 27(2): p. 224-232.
8. NBRP and NIES, Algae Resource Database, 2013, National BioResource Project & National Institute for Environmental Studies, Japan.
9. Takeda, H., Taxonomical assignment of chlorococcal algae from their cell wall composition. *Phytochemistry*, 1993. 34(4): p. 1053-1055.
10. Lu, Y., R. Kong, and L. Hu, Preparation of protoplasts from *Chlorella protothecoides*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012. 28(4): p. 1827-30.
11. UTEX, The culture collection of algae at the University of Texas at Austin, 2013.
12. Xin, L., et al., Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 2010. 101(14): p. 5494-5500.
13. Xin, L., H. Hong-ying, and Y. Jia, Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *New Biotechnology*, 2010. 27(1): p. 59-63.
14. Xin, L., H. Hong-ying, and Z. Yu-ping, Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, 2011. 102(3): p. 3098-3102.
15. Takeda, H., Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. *Phytochemistry*, 1996. 42(3): p. 673-675.
16. Johansen, J.R., Morphological variability and cell wall composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *Great Basin Naturalist*, 1991. 51(4).
17. De Martino, A., et al., Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions<sup>1</sup>. *Journal of Phycology*, 2007. 43(5): p. 992-1009.



18. Reimann, B.E.F. and B.E. Volcani, Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms: III. The structure of the cell wall of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Journal of Ultrastructure Research*, 1968. 21(3-4): p. 182-193.
19. Tesson, B., C. Gaillard, and V. Martin-Jézéquel, Brucite formation mediated by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Chemistry*, 2008. 109(1-2): p. 60-76.
20. Guiry, M.D. and G.M. Guiry, *AlgaeBase*, 2013, National University of Ireland.
21. Weckström, K., et al., The ecology of *Pediastrum* (Chlorophyceae) in subarctic lakes and their potential as paleobioindicators. 2010. 43(1): p. 61-73.
22. Gunnison, D. and M. Alexander, Basis for the Resistance of Several Algae to Microbial Decomposition. *Applied Microbiology*, 1975. 29(6): p. 729-738.
23. Shioi, Y., H. Tamai, and T. Sasa, Inhibition of Photosystem II in the Green Alga *Ankistrodesmus falcatus* by Copper. *Physiologia Plantarum*, 1978. 44(4): p. 434-438.
24. Maguire, R.J., P.T.S. Wong, and J.S. Rhamey, Accumulation and Metabolism of Tri-n-butyltin Cation by a Green Alga, *Ankistrodesmus falcatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1984. 41(3): p. 537-540.
25. Kilham, S., et al., Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biology*, 1997. 38(3): p. 591-596.
26. Planktonnet, Plankton\*Net; European Union 6th Framework programme. Project title: An open-access system for developing and supporting distributed knowledge centres for taxonomic data - a pilot study targeting EU phytoplankton, 2013.
27. Yiannikouris, A., G. Bertin, and J.P. Jouany, Reducing mycotoxin impact: the science behind Mycosorb®. 2005, Alltech UK: Stamford. p. 265-276.
28. Kogan, G. and A. Kocher, Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science*, 2007. 109(1-3): p. 161-165.
29. Migne, M. and S. Van de Ven, Opportunities of biotechnology on the production and use of microalgae - The effects of algae on the binding of mycotoxins in feed to prevent harms to cows, 2013 In preparation.
30. Teixeira, R.E., Energy-efficient extraction of fuel and chemical feedstocks from algae. *Green Chemistry*, 2012. 14(2): p. 419-427.
31. Mercer, P. and R.E. Armenta, Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011. 113(5): p. 539-547.
32. Kleinegris, D.M.M., et al., The selectivity of milking of *Dunaliella salina*. *Marine Biotechnology*, 2010. 12(1): p. 14-23.

