

**Masterarbeit**

# **Isolierung von Omega-3-Fettsäuren aus Algenbiomasse**

Ausgeführt zur Erlangung  
des akademischen Grades einer Diplom-Ingenieurin

am Institut für

Chemische Verfahrenstechnik und Umwelttechnik,

Technische Universität Graz

In Zusammenarbeit mit der BDI-BioEnergy International AG



eingereicht von  
Bsc. Antonia Mayer

Betreuung: Dipl.-Ing. Dr.techn. Susanne Lux

**Graz, Juli 2012**

## **Eidesstaatliche Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, Juli 2012

Antonia Mayer

# Danksagung

Mit der Abgabe der Diplomarbeit und dem Abschließen des Studiums geht ein großer Abschnitt meines Lebens zu Ende. Ich habe während dieser Zeit viel für das Jetzt und die Zukunft gelernt und viele Menschen haben mich dabei begleitet.

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Dipl.-Ing Dr.techn. Susanne Lux und Dipl.-Ing. Dr.techn. Heike Frühwirth für die engagierte Betreuung bei der Entstehung dieser Arbeit bedanken. Mein Dank gilt auch Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Matthäus Siebenhofer, der stets ein wachsames Auge auf mich hatte.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Freunden, StudienkollegInnen und insbesondere bei meiner Familie zu bedanken, die mich jederzeit unterstützt und motiviert haben.

# Kurzfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isolierung von Omega-3-Fettsäuren aus Mikroalgenbiomasse untersucht. Dafür wurden extraktive und reaktiv/extraktive Verfahren verwendet.

Der praktische Teil der Arbeit gliedert sich in drei Hauptbereiche. Im ersten Teil wurde Fischöl als Versuchsmaterial verwendet, mit dem das Oxidationsverhalten der Omega-3-Fettsäuren während der Extraktion untersucht wurde. Es zeigte sich, dass Sauerstoff in der Luft keinen Einfluss auf den Gehalt der Omega-3-Fettsäuren in den Proben hatte.

Im zweiten Teil der Arbeit diente Mikroalgenbiomasse als Ausgangsmaterial, die bereits einer Extraktion unterzogen worden war und keinerlei Lipide mehr enthielt. Diese wurde mit Fischöl imprägniert, um das Desorptionsverhalten des Fischöls mit verschiedenen Lösungsmitteln zu untersuchen. Die Omega-3-Fettsäuren kommen im Fischöl zum größten Teil als unpolare Triglyceride vor, weshalb das Fischöl am besten mit dem unpolaren Lösungsmittel n-Hexan von der Algenbiomasse desorbiert werden konnte. Mit n-Hexan als Lösungsmittel wurden weiter der Einfluss der Versuchszeit sowie der Ölmenge, mit der die Biomasse zu Beginn imprägniert wurde, untersucht.

Im letzten Abschnitt wurde versucht, die Omega-3-Fettsäure  $\alpha$ -Linolensäure (ALA) gezielt aus Mikroalgenbiomasse des Typs *Chlorella vulgaris* zu extrahieren. Dafür wurde ein Lösungsmittelscreening durchgeführt, bei dem Methanol und Isopropanol als Vertreter der polaren und n-Hexan aus der Gruppe der unpolaren Lösungsmittel gewählt wurden. Diese wurden auch in Kombination miteinander verwendet. Es hat sich gezeigt, dass im Gegensatz zu den Versuchen mit Fischöl, Lipide vor allem mit polaren Lösungsmitteln aus der Mikroalge extrahiert werden konnten. Daraus lässt sich schließen, dass Lipide in *Chlorella vulgaris* vor allem polarer Natur sind. Bei der Analyse der Fettsäurezusammensetzung ergab sich, dass der Gehalt an ALA in allen Proben nach der Extraktion etwa gleich hoch war.

Als reaktives Verfahren wurde die Extraktion mit einer zeitgleichen Umesterung kombiniert. Diese Art der Prozessführung wird In Situ-Umesterung genannt. Dabei werden die Lipide mit Methanol extrahiert und gleichzeitig zu Fettsäureestern umgeestert. Die Lösung wurde danach mit n-Hexan ausgeschüttelt, um die Fettsäureester aus dem Methanol/Lipid-Gemisch herauszulösen.

# Abstract

The aim of this thesis is to investigate the isolation of Omega-3 fatty acids from microalgae biomass through extractive and reactive/extractive processes.

The practical part can be subdivided into three main segments. In the first part fish oil was used as test material to investigate the oxidation behavior of Omega-3 fatty acids during extraction. No influence by oxygen in the surrounding on the concentration of Omega-3 fatty acids in the samples has been observed.

In the second part, already extracted micro algae biomass, not containing any lipids any more, was used as feedstock. It was impregnated with fish oil in order to study the desorption behavior of fish oil by using various organic solvents. Omega-3 fatty acids in fish oil mainly occur as part of non-polar triglycerides. Hence fish oil was desorbed best by the non-polar solvent n-hexane from the biomass. Subsequently n-hexane was chosen as solvent in order to research the influence of extraction time and the amount of oil at the beginning.

In the last segment of the practical part, it was aimed to extract  $\alpha$ -linoleic acid, an omega-3 fatty acid, from micro algae biomass of the family of *Chlorella vulgaris*. A solvent screening was conducted, using methanol and isopropanol from the group of polar and n-hexane from the group of unpolar solvents. Additionally it was tried to combine the solvents in order to achieve highest possible yield. It was shown that, contrary to the previous experiments with fish oil, use of polar solvents lead to a higher extraction yield from microalgae. Hence it can be concluded that the lipids in *Chlorella vulgaris* are mainly of polar nature. Analysis of the fatty acid composition shows that the fraction of ALA in the samples after extraction is approximately constant.

As reactive process, the extraction was combined with simultaneous transesterification. This kind of process is known as In Situ-transesterification. The lipids are being extracted with methanol and in the same step interesterified to fatty acid esters. The solution was subsequently contacted with n-hexane for extracting the fatty acid esters from the methanol/lipid mixture.

## Inhalt

1	Einleitung .....	1
2	Grundlagen .....	2
2.1	Algen.....	2
2.1.1	Allgemeines .....	2
2.1.2	Verwendung von Algen in der Technik .....	3
2.2	Lipide .....	6
2.2.1	Polare Lipide .....	7
2.2.1.1	Galactolipide oder Glyceroglycolipide.....	7
2.2.1.2	Phospholipide .....	8
2.2.1.3	Sphingolipide .....	9
2.2.2	Neutrale Lipide .....	10
2.2.2.1	Fettsäuren.....	10
2.2.2.2	Mono-, Di-, Triglyceride.....	11
2.2.2.3	Wachse.....	12
2.2.2.4	Carotinoide.....	12
2.2.3	Lipidzusammensetzung in Algen.....	13
2.2.4	Lipidzusammensetzung in Fischöl.....	16
2.3	Omega-3-Fettsäuren.....	16
2.3.1	Allgemeines .....	17
2.3.2	Oxidationsverhalten.....	17
2.3.3	Bedeutung für den Menschen .....	18
2.3.4	Produktion von Omega-3-Fettsäure-Konzentraten - Stand der Technik.....	19
2.3.4.1	Produktion von Konzentraten aus Fischöl .....	19
2.3.4.2	Produktion von Konzentraten aus alternativen Quellen .....	20
2.4	Extraktion .....	21
2.4.1	Allgemeines .....	21
2.4.2	Flüssig-Flüssig Extraktion.....	21
2.4.2.1	Allgemeines .....	21

2.4.2.2	Phasengleichgewicht.....	22
2.4.2.3	Stoffführung .....	23
2.4.3	Fest-Flüssig Extraktion.....	24
2.4.4	Extraktionsmittel.....	25
2.5	Extraktion von Algenlipiden mit organischen Lösungsmitteln.....	27
2.6	In Situ-Umeresterung .....	28
2.7	Adsorption.....	29
2.7.1	Allgemeines .....	30
2.7.2	Stoffführung .....	30
3	Experimenteller Teil.....	32
3.1	Verwendete Stoffe und Chemikalien .....	32
3.1.1	Fischöl.....	32
3.1.2	Algenbiomasse.....	33
3.1.3	Lösungsmittel.....	34
3.2	Geräte und Apparaturen.....	35
3.2.1	Rotationsverdampfer .....	35
3.2.2	Membran- Vakuumpumpe .....	36
3.2.3	Filternutsche .....	36
3.3	Versuche mit Fischöl.....	37
3.3.1	Vorversuche.....	37
3.3.2	Versuchsanlage .....	38
3.3.3	Versuchsdurchführung .....	39
3.4	Löslichkeitsversuche von Fischöl mit Algenbiomasse.....	40
3.4.1	Wahl des geeigneten Lösungsmittels .....	40
3.4.2	Einfluss der Versuchsdauer.....	41
3.4.3	Nachspülversuche.....	41
3.4.4	Variation der Ölmenge .....	41
3.5	Versuche mit Chlorella Vulgaris.....	42
3.5.1	Wahl des geeigneten Extraktionsmittels .....	42
3.5.2	Einfluss der Versuchsdauer.....	43

3.5.3	Die firmeninterne Rezeptur der BDI-BioEnergy International AG.....	43
3.5.4	In Situ-Umesterung .....	44
4	Ergebnisse und Diskussion .....	46
4.1	Stabilitätsversuche mit Fischöl .....	46
4.2	Löslichkeitsversuche von Fischöl mit Algenbiomasse.....	48
4.2.1	Lösungsmittelscreening.....	48
4.2.2	Einfluss der Versuchsdauer.....	50
4.2.3	Nachspülversuche.....	51
4.2.4	Variation der Ölmenge .....	52
4.3	Versuche mit <i>Chlorella vulgaris</i> .....	52
4.3.1	Lösungsmittelscreening.....	53
4.3.2	Einfluss der Versuchsdauer.....	55
4.3.3	Die firmeninterne Rezeptur der BDI-BioEnergy International AG.....	58
4.3.4	In Situ-Umesterung .....	60
5	Zusammenfassung.....	63
6	Literaturverzeichnis .....	66
7	Anhang.....	69



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der Lipide .....	7
Abbildung 2: Monogalactosyldiglycerid (MGDG) und Digalactosyldiglycerid (DGDG) .....	8
Abbildung 3: Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) .....	8
Abbildung 4: Grundform eines Phospholipids .....	9
Abbildung 5: Grundform eines Sphingolipids .....	9
Abbildung 6: Aufbau von DGTS, DGTA und DGCC .....	14
Abbildung 7: Aufbau von $\alpha$ -Linolensäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure ....	17
Abbildung 8: Schema eines Extraktionsprozesses [16] .....	21
Abbildung 9: Beispiel für ein Dreiecksdiagramm einer typischen Solventextraktion [16] .....	23
Abbildung 10: Einstufige Extraktion .....	23
Abbildung 11: Vielstufige Kreuzstromextraktion .....	24
Abbildung 12: Vielstufige Gegenstromextraktion .....	24
Abbildung 13: Beispiel für ein Dreiecksdiagramm einer Fest-Flüssig-Extraktion [16] .....	25
Abbildung 14: Vorgänge bei einer Extraktion von Algenlipiden [20] .....	28
Abbildung 15: Umesterung von Triglyceriden mit Methanol .....	29
Abbildung 16: Einstufige Adsorption [16] .....	30
Abbildung 17: Einstufige Desorption [16] .....	31
Abbildung 18: Algenbiomasse <i>Chlorella vulgaris</i> (links: Lipide wurden bereits extrahiert, rechts: Lipide sind noch enthalten) .....	34
Abbildung 19: Rotationsverdampfer .....	35
Abbildung 20: Filternutsche .....	36
Abbildung 21: Versuchsaufbau zu Stabilitätsuntersuchung von Omega-3-Fettsäuren bei sauerstoffreduzierter Versuchsatmosphäre .....	39
Abbildung 22: Phasentrennung von Fischöl und Lösungsmittel .....	40
Abbildung 23: Evaporationsvorgang .....	43
Abbildung 24: Reaktion von Methanol und Acetylchlorid .....	44
Abbildung 25: Versuchsaufbau bei der In Situ-Umesterung .....	45
Abbildung 26: Fischölmenge, nachdem das Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, Isopropanol) abgezogen worden war (ausgehend von 148 Gramm Fischöl) .....	47
Abbildung 27: Desorbierte Ölmenge beim Lösungsmittelscreening für das Fischöl nach Abzug der verschiedenen Lösungsmittel .....	49
Abbildung 28: Einfluss der Zeit bei der Desorption von Fischöl mit n-Hexan auf die Ausbeute .....	50
Abbildung 29: Erhaltene Ölmenge bei Nachspülung des Filterkuchens mit n-Hexan nach Abzug des Lösungsmittels .....	51

Abbildung 30: Desorbierte Ölmenge in Abhängigkeit der Ölmenge zu Beginn nach Abzug des Lösungsmittels.....	52
Abbildung 31: Extrahierte Lipidmenge nach Abzug des Lösungsmittels bei dem Lösungsmittelscreenings für Chlorella vulgaris .....	53
Abbildung 32: Glaskolben nach dem Evaporieren des Lösungsmittels (n-Hexan) .....	54
Abbildung 33: Verlauf der Extraktionskurve mit der Zeit bei der Extraktion von Algenlipiden mit Methanol.....	55
Abbildung 34: Modell der Funktion $me = m_0 * (1 - e^{-k * t})$ für die experimentell erhaltenen Extraktionskurve von Algenlipiden mit Methanol.....	57
Abbildung 35: Extrahierte Lipidmenge aus Chlorella vulgaris bei der Anwendung der firmeninternen Rezeptur der BDI-BioEnergy International AG nach Abzug des Lösungsmittelgemischs .....	59
Abbildung 36: Menge an Probe der In Situ-Umesterungsversuche nach Abzug von Methanol .....	61

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geläufige Fettsäuren .....	10
Tabelle 2: Chemische Strukturen von Mono-, Di- und Triglycerid .....	12
Tabelle 3: Fettsäurezusammensetzung einiger Algen [5] .....	13
Tabelle 4: Anteil von Omega-3-Fettsäuren in TAG einiger Algenarten [5].....	15
Tabelle 5: Lipidzusammensetzung einiger Algenarten [5].....	16
Tabelle 6: Anteil an Omega-3-Fettsäuregehalt in verschiedenen Fischarten [1] .....	19
Tabelle 7: Elutrope Reihe [18] .....	26
Tabelle 8: Anteil der Fettsäuren am Gesamtfettsäuregehalt im Fischöl lt. Hersteller .....	33
Tabelle 9 Anteil der Fettsäuren am Gesamtfettsäuregehalt in der Chlorella lt. Hersteller.....	34
Tabelle 10: Eigenschaften und Stoffwerte verwendeter Lösungsmittel [23] .....	35
Tabelle 11: Fettsäuremuster von Fischöl bei Versuchsdurchführung unter Stickstoffatmosphäre und bei normalen Umgebungsbedingungen .....	48
Tabelle 12: Fettsäuremuster des gelösten Fischöls in diversen Lösungsmitteln .....	50
Tabelle 13: Fettsäuremuster beim Lösungsmittelscreening für die Algenlipidextraktion.....	54
Tabelle 14: Fettsäuremuster bei der Untersuchung der Versuchsdauer mit Methanol als Extraktionsmittel auf die Ausbeute an Algenlipiden .....	58
Tabelle 15: Fettsäuremuster der Proben bei der Extraktion von Algenlipiden nach der firmeninternen Methode, ausgehend von 20, 50 und 100 Gramm Biomasse .....	60
Tabelle 16: Fettsäuremuster des ersten sauren In Situ-Umeesterungsversuchs .....	62
Tabelle 17: Stabilitätsversuche von Omega-3-Fettsäuren mit Fischöl.....	69
Tabelle 18: Lösungsmittelscreening der mit Fischöl imprägnierten Mikroalgenbiomasse.....	69
Tabelle 19: Zusammenfassung des Lösungsmittelscreenings für die imprägnierte Biomasse und der Einflussfaktors Zeit auf die wieder gelöste Ölmenge.....	70
Tabelle 20: Zusammenfassung der Nachspülversuche und der Variation der Ölmenge .....	71
Tabelle 21: Zusammenfassung des Lösungsmittelscreening für die Chlorella vulgaris und der Untersuchung der Zeit als Einflussfaktor auf die extrahierte Lipidmenge .....	72
Tabelle 22: Zusammenfassung der In Situ-Umeesterungsversuche .....	73
Tabelle 23: Ergebnisse der Wasserbestimmung.....	74

## 1 Einleitung

Langkettige Omega-3-Fettsäuren zählen zur Gruppe der langkettigen ungesättigten Fettsäuren, die für den Menschen lebenswichtig sind, aber vom Körper nicht selbst synthetisiert werden können. Aus diesem Grund müssen sie dem Organismus auf anderem Wege zugeführt werden. Die wichtigste Quelle für die Gewinnung von Omega-3-Fettsäuren stellen maritime Produkte dar. Algen und Phytoplankton sind in der Lage, Omega-3-Fettsäuren zu synthetisieren und sind gleichzeitig Hauptnahrungsmittel vieler Fischarten, die auf diese Weise wiederum die Fettsäuren aus der Alge in ihren eigenen Lipidhaushalt überführen. Durch den Verzehr von Fisch gelangen sie schlussendlich in den menschlichen Körper.

In der Industrie wird versucht, die Omega-3-Fettsäuren in Fischöl mit Hilfe diverser Verfahren wie chromatographischer Trennung, fraktionierter oder molekularer Destillation, Harnstoffkomplexierung oder Extraktion mit überkritischem Kohlenstoffdioxid zu isolieren und aufzukonzentrieren. Das Konzentrat wird dann entweder direkt in Kapselform an den Konsumenten weiterverkauft oder verschiedenen Nahrungsmitteln zugesetzt.

Eine Alternative zu Fischöl stellen Mikroalgen dar. Sie weisen ebenfalls einen hohen Gehalt an langkettigen ungesättigten Fettsäuren auf, der je nach Art höher als bei Fischöl sein kann. Der Gehalt ist abhängig von den Umweltbedingungen während der Wachstumsphase und der Verarbeitung. [1]

Bei BDI-BioEnergy International AG, einem industriell etablierten Unternehmen im Bereich von Biodieselanlagen, wird an der Entwicklung von Anlagenkonzepten für die Verarbeitung von Fischöl und von Omega-3-Fettsäuren gearbeitet. In der Abteilung für Forschung und Entwicklung wird außerdem versucht, Mikroalgen mit hohem Gehalt an Omega-3-Fettsäuren zu kultivieren und diese so aufzuarbeiten, dass sie Tierfuttermittel beigemischt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie Omega-3-Fettsäuren mittels extraktiven und reaktiv/extraktiven Verfahren aus Mikroalgenbiomasse herausgelöst werden können. Im Vorfeld wurden Löslichkeitsversuche mit Fischöl durchgeführt, das ebenfalls reich an Omega-3-Fettsäuren ist. Außerdem wurde die Stabilität der Fettsäuren gegenüber Oxidation durch Luftsauerstoff untersucht.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Algen

Hört man in unseren Breiten den Begriff „Alge“, denken die meisten Menschen an lange Pflanzenstränge, die in Italien und in anderen Urlaubsländern an den Strand gespült werden und einem das Badevergnügen vermiesen. Dabei sind Algen viel mehr als nur das Unkraut des Meeres. Sie bilden nicht nur die Basis der weltweiten maritimen Nahrungskette, sondern sind auch für die Produktion der Hälfte des Sauerstoffs in unserer Atmosphäre verantwortlich. [2]

In diesem Kapitel soll dem Leser ein Überblick über Algen im Allgemeinen und des Weiteren über ihre vielfältige Anwendung in Industrie, Forschung und Ernährung gegeben werden.

#### 2.1.1 Allgemeines

Unter Algen versteht man grundsätzlich eine heterogene Gruppe von Organismen, die durch Fotosynthese einen großen Teil an Sauerstoff in der Atmosphäre produzieren und in wässriger Umgebung leben. Form und Größe variieren stark und im Gegensatz zu den Landpflanzen fehlt ihnen das für unsere Begriffe pflanzliche Aussehen, da sie weder Blätter noch Stämme und Wurzeln besitzen. Die Zahl der verschiedenen Algenarten reicht von Angaben von 36.000 bis zu zehn Millionen, von denen jede einzelne eine spezielle Rolle im Ökosystem durch Interaktionen mit anderen Organismen einnimmt.

Bei den meisten Algen handelt es sich um Eukaryonten, die aus einem Zellkern mit einer porigen Hülle darum bestehen. Sie werden auf Grund verschiedener Merkmale wie zum Beispiel Pigmentierung, Lebenszyklus oder zellulärer Struktur in eine Vielzahl von Untergruppen eingeordnet, wobei als die wichtigsten die Gruppen der Grün-, die der Rot- und die der Kieselalgen anzusehen sind. Die prokaryontischen Cyanobakterien, auch bekannt als Blaualgen, besitzen keinen Zellkern und ähneln eher Bakterien, werden aber dennoch zu den Algen gezählt. Widersprüchlich zu der zuvor genannten Definition gibt es auch einige Organismen, die zu den Algen gezählt werden, obwohl sie keine Fotosynthese betreiben. Ein Beispiel dafür wäre die begeißelte Euglena. Einige Spezies gedeihen auch nicht in wässriger, sondern in trockener Umgebung wie Felsen oder auf feuchtem Boden. Diese sind dann widerstandsfähiger gegenüber kalten und trockenen Umweltbedingungen als ihre in Wasser lebenden Verwandten.

Ausgehend von ihrer Größe können Algen in Mikroalgen und Makroalgen unterteilt werden. Bei *Mikroalgen* handelt es sich häufig um Einzeller in runder bis leicht länglicher Form, die ohne Mikroskop nicht erkennbar sind. Die einzelnen Zellen können auch mehr oder weniger zusammenhängende Kolonien gründen. Man nennt sie in dem Fall Coenobia. Einzeller und Kolonien können auch mit Flagella behaftet, also begeißelt, sein. Dabei ist wichtig zu wissen, dass Flagellaten nicht automatisch Algen sind.

Eine weitere häufig vorkommende Form der Mikroalge ist die Faser. Sie besteht entweder aus einer einzelnen, geradlinigen Reihe von Zellen, wo sich diese oft eine Zellwand teilen oder einer Reihe, von der sich weitere Reihen abzweigen. Solch verzweigte Algenformen wachsen häufig auf Felsen oder in trüben Gewässern.

Im Gegensatz zu Mikroalgen sind *Makroalgen* mit freiem Auge erkennbar und können sogar Längen von bis zu 50 Metern erreichen. Ein gutes Beispiel für Makroalgen ist der Seetang.

Die meisten Algen pflanzen sich sowohl sexuell als auch asexuell fort und nutzen so die Vorteile beider Wege. Bei der asexuellen Vermehrung müssen nicht erst Geschlechtszellen produziert und Partner gefunden werden, wodurch ein rasches Wachstum der Alge gegeben ist. Die meisten einzelligen Algen vermehren sich durch simple Zellteilung. Bei der sexuellen Fortpflanzung kann sich die Alge besser auf veränderte Umweltbedingungen einstellen, da durch die Verschmelzung von Geschlechtszellen und Meiose eine genetische Veränderung erreicht werden kann. [2,3]

### 2.1.2 Verwendung von Algen in der Technik

Die technische Anwendung von Algen ist äußerst vielfältig und betrifft sowohl die Pharmazie als auch die Nahrungsmittelindustrie und noch viele weitere Bereiche. Die nachfolgende Aufzählung bietet lediglich einen groben Überblick und ist als nicht vollständig anzusehen.

#### **Algen in der Forschung**

Algen werden vielfach in der Forschung im Labor eingesetzt, da sie rasch wachsen, kurze Regenerationszeiten haben und einfach zu kultivieren sind. Aus diesem Grund wurden auch viele biologische Entdeckungen zuerst bei Algen gemacht. So wurde zum Beispiel die Ribonukleinsäure (RNA) das erste Mal bei Seetang nachgewiesen und auch das Absorptionsspektrum für Fotosynthese wurde mit Hilfe der Algen wissenschaftlich belegt.

Heutzutage gibt es Datenbanken, die Informationen über die verschiedenen Algenstämme sammeln, ihre Wachstumsbedingungen und ähnliches beschreiben. In Sammlungen von

Forschungsberichten werden Experimente und daraus gewonnene Erkenntnisse beschrieben.

### **Algen in Bioassays und in der Paläontologie**

Ein Anwendungsgebiet für Algen ist ihre Verwendung in Bioassays in wässriger Umgebung. Bei *Bioassays* wird mit lebenden Organismen gearbeitet und deren Verhalten auf chemische und physikalische Zusätze in ihrer Umwelt beobachtet. Bilden Algen beispielsweise als Reaktion auf Veränderungen ihrer Umgebungsbedingungen Algenblüten oder sterben sie ab?

Man kann die Schadstoffkonzentration im Wasser zwar auch auf chemischen Weg exakt bestimmen, allerdings sind so die direkten Auswirkungen auf die Umwelt schwer bis gar nicht absehbar. Algen reagieren empfindlicher als viele Tiere auf Schadstoffe in Waschmitteln, Herbiziden oder Färbemitteln, weswegen sie häufig und gerne bei Bioassays eingesetzt werden. Aus der Veränderung ihrer Zusammensetzung kann man dann auf die Qualität von Trinkwasser, den Verschmutzungsgrad industrieller Abwässer oder die Wasserqualität stehender Gewässer schließen. Sie sind gewissermaßen kleine Monitore ihrer Umgebung. Tests mit Algen sind heute wichtige Bestandteile in der Abwasserreinigung und sind in einigen Ländern auch verpflichtend. Da Algen sehr unterschiedlich in ihrem Aufbau sind, variiert auch ihr Verhalten gegenüber Toxinen, weswegen für die Tests auch verschiedene Algengruppe herangezogen werden.

Algen werden des Weiteren häufig als paläontologische Indikatoren eingesetzt. Manche Bestandteile der abgestorbenen Alge sind resistent gegen Fäulnis und bleiben über viele Jahre erhalten. Oft lagern sie sich in Meeressedimente ein, wo sie Millionen von Jahren überdauern. Je weiter weg der Algenrest von der Sedimentsoberfläche ist, desto älter ist er. Forscher können somit heute auf längst vergangene Änderungen des Klimas schließen. Es liegt zum Beispiel eine Sedimentschicht aus Algen vor, bei denen die auf der Algenoberfläche ausgeprägte Eisschicht auf den oberen Schichten dünner ist als auf den unteren Schichten. Daraus kann geschlossen werden, dass es zu einem gewissen Zeitpunkt eine Änderung (in dem Fall Erwärmung) des Klimas gegeben haben muss. [2]

### **Algen in der Abwasseraufbereitung**

Doch Algen werden nicht nur zur Bestimmung von Schadstoffen im Bereich der Abwasserbehandlung eingesetzt, sie spielen auch in der Aufarbeitung selbst eine wichtige Rolle. Die Abwässer werden vor ihrer Entsorgung oder weiteren Aufarbeitung häufig in sogenannte „High rate“-Ponds geleitet, in denen Algen Stoffe wie Phosphate oder Nitrate aus den Abwässern aufnehmen und in ihre Matrix einbauen. Dieser Vorgang wird

*Assimilation* genannt. Die Algen können danach geerntet, getrocknet und als Düngemittel oder nach der Fermentierung zu Methanol oder Ethanol als Kraftstoff verarbeitet werden. [2]

### **Algen als Biokraftstoff**

Auch als Biokraftstoff stellen Algen eine Alternative zu fossilen und anderen nachwachsenden Rohstoffen dar. Nach der Extraktion kann das aus der Algenbiomasse erhaltene Öl zu Biodiesel weiterverarbeitet werden. Dazu werden Triglyceride mit Alkohol unter Anwesenheit eines Katalysators umgeestert, wodurch Monoester entstehen, die als Biodiesel bezeichnet werden.

Diesel aus Mikroalgen hat ähnliche Eigenschaften wie gewöhnlicher Diesel, bietet allerdings einige Vorteile: Die Verwendung von Mikroalgen als Ausgangsmaterial für die Biodieselproduktion liegt nicht im Konkurrenzkampf mit der Nahrungsmittelversorgung wie es etwa bei anderen Biokraftstoffquellen wie Mais oder Raps der Fall ist. Genau wie diese ist Algenbiomasse biologisch abbaubar und zählt somit zu den nachwachsenden Rohstoffen. Außerdem können sie Kohlenstoffdioxid in ihren Organismus aufnehmen, der ansonsten als Schadstoff in die Atmosphäre entlassen wird. Verglichen mit der Produktion von herkömmlichem Diesel kann so bis zu 78% an CO<sub>2</sub> eingespart werden. Es werden bei ihrer Kultivierung auch keine Grundflächen in Anspruch genommen, die anderwärtig genutzt werden könnten und Nebenprodukte, die während der Biodieselproduktion entstehen wie Proteine und Biomasse, die nach der Extraktion verbleibt, können sinnvoll als Futtermittel oder Dünger eingesetzt werden. Allerdings ist diese technische Anwendung noch nicht wirtschaftlich und es wird wohl noch 10 bis 15 Jahre dauern, bis sich der Prozess der Biokraftstoffproduktion aus Algen industriell etabliert hat. [2,3,4]

### **Algen als Nahrungsquelle und in der Pharmazie**

Algen dienen in ihrer Ursprungs- oder verarbeiteten Form auch als Nahrung und als Grundlage diverser anderer Produkte. In Aquakulturen werden Schalentiere und Fische mit ihnen gefüttert und auch dem Menschen dienen Algen schon seit Jahrtausenden als Nahrung und sie werden auf verschiedenste Arten verarbeitet. Das Cyanobakterium *Spirulina* enthält beispielsweise gleich viele Proteine wie Nüsse oder auch Sojabohnen und ist reich an Vitamin B, ungesättigten Fettsäuren und dem orangen Farbstoff  $\beta$ -Karotin, der im Körper zu Vitamin A umgesetzt wird. Auch der *Chlorella* werden viele positive Wirkungen nachgesagt wie beispielsweise erhöhte Wundheilung oder ihre vorbeugende Wirkung gegenüber Tumorbildung und Gefäßverkalkung. Diese Hypothesen sind jedoch nicht wissenschaftlich bewiesen, da hinter den Veröffentlichungen Firmen stehen, die Chlorella-Algen verarbeiten. Nichtsdestotrotz findet die Alge als Nahrungs- bzw. Nahrungsergänzungsmittel breiten Absatz. *Dunaliella* enthält sogar 50-mal so viel  $\beta$ -Karotin



wie Spirulina, bei idealen Wachstumsbedingungen bis zu 14%. Aus diesem Grund ist die industrielle Verarbeitung von Dunaliella bereits rund um den Globus verbreitet und es steckt noch weiteres Potential im Anbau dieser speziellen Algenspezies. Die Dinoflagellate (Panzergeißler) *Cryptothecodinium cohnii* ist die einzige bisher kommerzielle Quelle von langkettigen ungesättigten Fettsäuren aus Mikroalgen. Die daraus gewonnene Fettsäure Docosahexaensäure (DHA) dient als Zusatz zu Säuglingsnahrung und als Nahrungsergänzungsmittel. Noch in der Entwicklung steht der Prozess zur Gewinnung von Eicosapentaensäure (EPA) aus *Phaedactylum tricornutum*. Berechnungen zufolge müssen die Produktionskosten um 80 Prozent gesenkt werden, um das Verfahren wirtschaftlich zu machen.

Seetang enthält viel Vitamin B und C und diverse Minerale wie Iod. Eine Gemeinsamkeit aller genannten Algenarten ist, dass sie durch ihre speziellen Wachstumsbedingungen (beispielsweise hoher pH-Wert) Schadstoffe weniger leicht verbreiten und die Algen deswegen in offenen Becken angebaut werden können. Empfindlichere Algenarten werden in geschlossenen Photoreaktoren gezüchtet.

Auch die Pharmaindustrie hat die Algen als Quelle vieler Basisprodukte für diverse Pharmazeutika für sich entdeckt. Da die Alge bereits viel früher als der Mensch in der Weltgeschichte auf den Plan tritt, hatte sie ausreichend Zeit Schutzmechanismen gegen raue Umweltbedingungen oder Bedrohungen durch fremde Organismen zu entwickeln. So produzieren viele Cyanobakterien zum Beispiel unter anderem Sulfolipide, die auch beim Menschen gegen einen Herpes-Virus und HIV wirken sollen. Ein weiteres Beispiel sind die Alkaloide einer roten Meeresalge, die unterstützend gegen Brust- und Lungentumore wirken. [1,2,8]

## 2.2 Lipide

Lipide sind Substanzen, die aus einem oder mehreren Bausteinen bestehen und ein ähnliches Lösungsverhalten, jedoch keine strukturellen Gemeinsamkeiten erkennen lassen. Sie sind hydrophob, das heißt, sie sind nicht in Wasser, jedoch in organischen Lösungsmitteln löslich und lassen sich leicht von Proteinen und Kohlenhydraten trennen. Einige sind grenzflächenaktiv, da sie zusätzlich mit einer hydrophilen Gruppe ausgestattet sind. Diese Lipide werden als polar oder amphiphil bezeichnet, jene, denen diese Gruppe fehlt, als neutral oder unpolar. [5,6,7,8]

Abbildung 1 zeigt eine Aufstellung wichtiger Lipide in Eukaryonten, die in den folgenden Abschnitten besprochen werden.

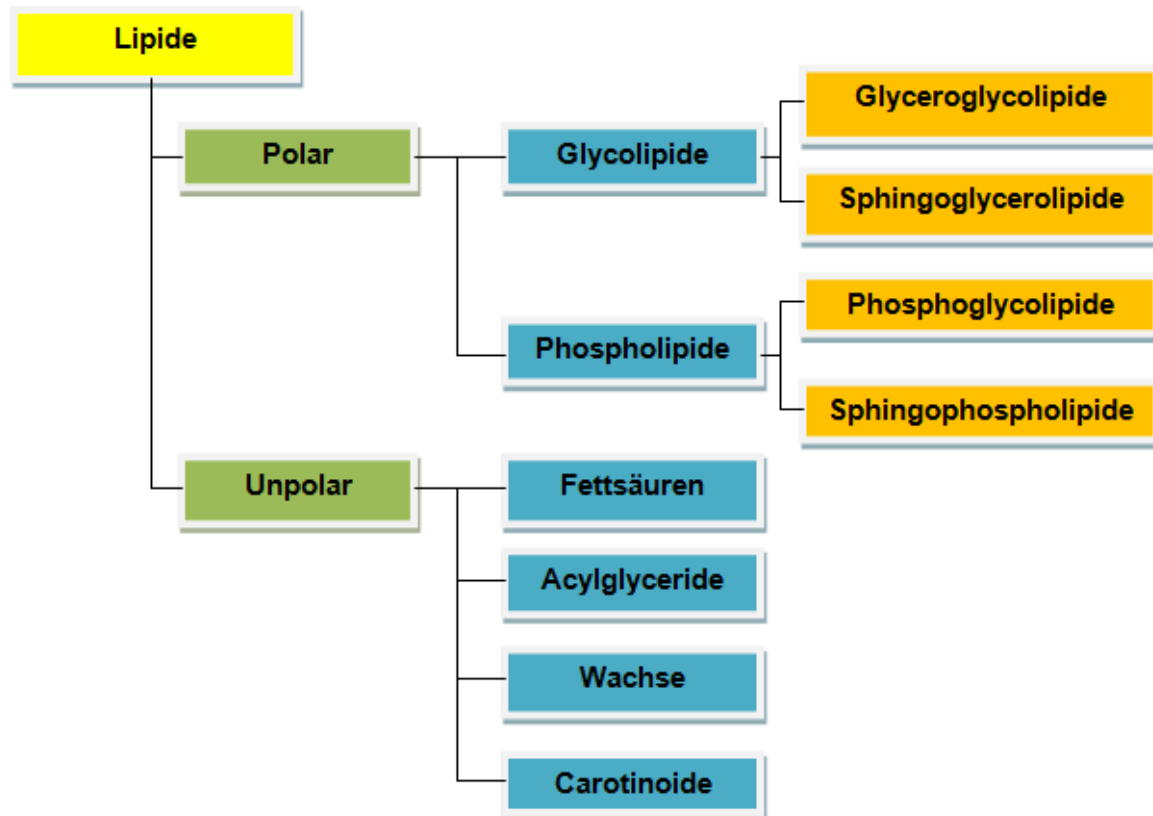


Abbildung 1: Einteilung der Lipide

### 2.2.1 Polare Lipide

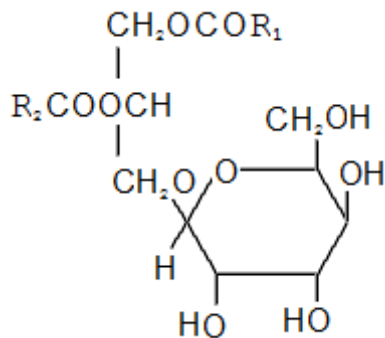
Polare Lipide bestehen aus einem hydrophoben und einem hydrophilen Teil und werden auch *amphipolare* oder *amphiphile* Lipide genannt. In wässriger Lösung nehmen sie auf Grund der unterschiedlichen Polarität geordnete Strukturen in Form von Doppelschichten ein, die wiederum als Mizellen oder als Lamellen vorliegen können. Das macht sie neben Proteinen zu den wichtigsten Bestandteilen von Zellmembranen. Sie nehmen auch direkt an deren Fusion teil. Durch die Ausbildung der Doppelschichten wird die Membranstruktur stabilisiert, bleibt aber dennoch elastisch. Dadurch beeinflussen sie auch indirekt Stoffwechselfvorgänge, die über die Zellmembran ablaufen. Einige Lipide spielen auch bei der Signaltransduktion der Zellen als Signalstoff oder bei der Antwort auf Änderungen der Umweltbedingungen eine Rolle. [5,6,7,8]

#### 2.2.1.1 Galactolipide oder Glyceroglycolipide

*Galactolipide* gehören zur Gruppe der Glycolipide, die durch ein Glycerinmolekül, bei dem die ersten zwei Kohlenstoffatome mit hydrophoben Acylgruppen verestert sind,

gekennzeichnet ist. Am dritten Kohlenstoffatom finden sich ein, zwei, selten auch drei oder vier Galactosemoleküle. Den Aufbau eines Monogalactosyldiglycerids bzw. eines Digalactosyldiglycerids zeigt Abbildung 2, in der  $R_{1,2}$  die Kohlenwasserstoffketten der Fettsäuren bezeichnen. [5,8]

### MGDG



### DGDG

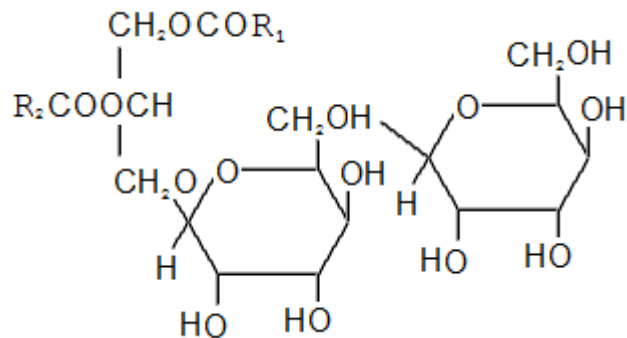


Abbildung 2: Monogalactosyldiglycerid (MGDG) und Digalactosyldiglycerid (DGDG)

Das pflanzliche Sulfolipid, *Sulfoquinovosyldiacylglycerol*, kurz SQDG genannt, ist gleich wie ein Monogalactosyldiglycerid aufgebaut, am sechsten Kohlenstoffatom ist es jedoch mit einer Sulfongruppe verbunden, siehe Abbildung 3. Es ist häufig in den Chloroplasten zu finden. [6]

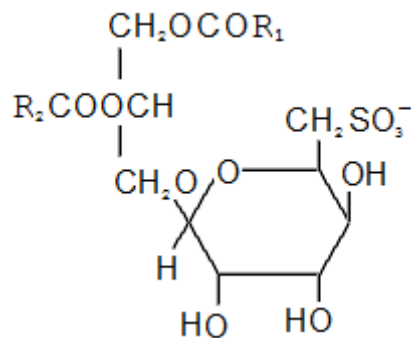


Abbildung 3: Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG)

#### 2.2.1.2 Phospholipide

Die Grundform eines Phospholipids (Phosphoglycerid) besteht aus einem Glycerinmolekül, das an zwei Stellen mit Fettsäuren und an der dritten Stelle mit Phosphorsäure verbunden ist. Diese bildet den polaren Teil des Lipids. Auf der anderen Seite ist die Säure mit einer

stark polaren Gruppe wie Cholin, Serin oder Ethanolamin verbunden, worauf auch die Namen bekannter Phospholipide wie Phosphatidylcholin (Lecithin), Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin zurückzuführen sind. Abbildung 4 zeigt die Grundform eines Phospholipids.

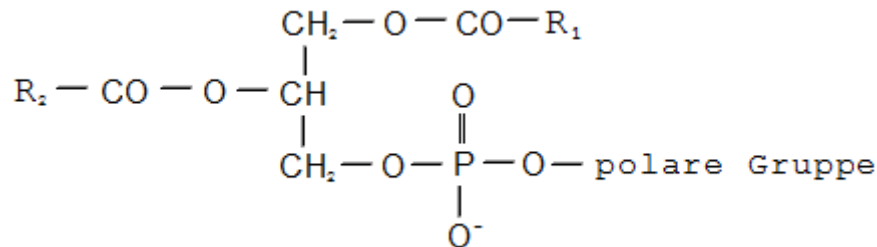


Abbildung 4: Grundform eines Phospholipids

Phospholipide sind empfindlich gegen Autooxidation, gut in Chloroform-Methanol-Mischungen und schlecht in Aceton lösbar. [6,8]

### 2.2.1.3 Sphingolipide

Sphingolipide besitzen an der Stelle von Glycerin als Grundgerüst Sphingosin, ein langkettiges Aminodiol. Die darin vorkommende Aminogruppe bildet mit der Fettsäure ein Ceramid, eine spezielle Form eines Säureamids.

Die primäre OH-Gruppe ist mit einer Untergruppe verbunden, die das Lipid charakterisiert bzw. ihm seinen Namen gibt. Handelt es sich um ein Phosphorsäure-Molekül, spricht man von einem *Sphingophospholipid* oder einer Ceramid-Phosphat-Base. Ist die Untergruppe ein Mono-, Di- oder Oligosaccharid, wird das Lipid als *Sphingoglycolipid* bezeichnet und ist das Zuckermolekül über eine Phosphatbrücke mit dem Ceramid verbunden ist, liegt ein *Sphingophosphoglycolipid* oder Ceramid-Phosphat-Zucker vor. Abbildung 5 zeigt den Grundaufbau eines Sphingolipids. R<sub>1</sub> bezeichnet dabei den Kohlenwasserstoffrest einer Fettsäure, R<sub>2</sub> die namensgebende Untergruppe. [6]

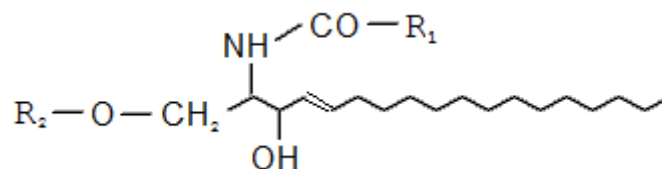


Abbildung 5: Grundform eines Sphingolipids







## 2.2.2 Neutrale Lipide

Lipide, die keine zusätzliche polare Gruppe aufweisen, werden als neutral eingestuft. Zu ihnen zählen neben Mono-, Di- und Triglyceriden, Carotinoide, Fettsäuren mit mehr als zwölf Kohlenstoffatomen und neben Wachsen auch Sterine, Sterinester und Tocopherole. [6,8]

### 2.2.2.1 Fettsäuren

Generell handelt es sich bei Fettsäuren um organische Verbindungen, die aus einer verschieden langen Kohlenwasserkette und einer Carboxylgruppe bestehen. Die kürzeste Kohlenwasserstoffverbindung, die zu den Fettsäuren gezählt wird, ist die Buttersäure mit vier Kohlenstoffatomen. Fettsäuren unterscheiden sich durch Länge, Anzahl, Position und Konfiguration der Doppelbindungen und können zusätzlich funktionelle Gruppen enthalten. Tabelle 1 zeigt einige geläufige Fettsäuren.

Tabelle 1: Geläufige Fettsäuren

Kurzbezeichnung	Struktur	Trivialname
14:0		Myristinsäure
16:0		Palmitinsäure
18:0		Stearinsäure
18:1(9)		Ölsäure
18:2 (9,12)		Linolsäure
18:3 (9,12,15)		Linolensäure

Die dominierenden Fettsäuren in der Natur sind Palmitin-, Öl- und Linolsäure. Die übrigen Fettsäuren werden auch Nebenfettsäuren bezeichnet.

Fettsäuren werden in der Literatur oft nicht namentlich genannt, sondern als Kürzel angeführt, zum Beispiel 18:1(9). Die erste Ziffer steht für die Anzahl an Kohlenstoffatomen, gefolgt von den Ziffern für die Anzahl und Position der Doppelbindungen.

Die Bindungen zwischen den Kohlenstoffverbindungen können als Einfach- oder Mehrfachbindungen vorliegen. Ist ersteres der Fall, bezeichnet man die vorliegende Fettsäure als *gesättigt*, bei Zwei- oder Dreifachbindungen als *ungesättigt*. Treten mehr als eine Mehrfachbindung in der Kette auf, ist die Fettsäure mehrfach ungesättigt. Als

Kurzbezeichnung für mehrfach ungesättigte Fettsäuren ist die Abkürzung *PUFA* (Polyunsaturated Fatty Acids) geläufig. Die meisten in der Natur auftretenden Fettsäuren sind ungesättigt, bei den gesättigten Fettsäuren dominieren die unverzweigten Verbindungen mit gerader Anzahl an Kohlenstoffatomen. [1,6,8,9,10]

#### 2.2.2.2 *Mono-, Di-, Triglyceride*

Bei Mono-, Di- oder Triglyceriden ist ein Glycerinmolekül mit einer, zwei oder drei Fettsäuren verestert, deren Kohlenwasserstoffketten in Tabelle 2 als R bezeichnet werden. Die Fettsäuren können gleich sein oder sich voneinander unterscheiden und beeinflussen durch ihre Struktur das Schmelz- und Kristallisationsverhalten der Acylglyceride. Hierin ist auch der Grund zu finden, weshalb manche Triglyceride bei Raumtemperatur im festen (*Fette*), andere jedoch im flüssigen (*Öl*) Zustand vorliegen. Einfache Verbindungen sind starr und gerade, wodurch eine dichte Packung entsteht. In Fettsäuren vorkommende Doppelbindungen weisen hingegen einen Knick auf, was eine dichte Aneinanderreihung verhindert und die Fluidität der Lipide beeinflusst. Triglyceride sind sogenannte Speicherlipide, die einen hohen Brennwert aufweisen (37 kJ/g bzw. 9 kcal/g) und durch deren Abbau Energie bereitgestellt werden kann. Die wichtigsten Reaktionen bei Triglyceriden sind die Hydrolyse, die Methanolyse und die Umesterung. Bei der letztgenannten kommt es zu einem Austausch von Alcyresten, bei dem sich ein Gleichgewicht einstellt, das von Faktoren wie der Struktur und Konzentration von den verwendeten Triglyceriden abhängig ist. Die Umesterung ist heute von großer technischer Bedeutung. [1,6,8]

Tabelle 2: Chemische Strukturen von Mono-, Di- und Triglycerid

Bezeichnung	Struktur
Monoglycerid	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{R}_1 \\   \\ \text{H} - \text{O} - \text{CH} \\   \\ \text{CH}_2 - \text{O} - \text{H} \end{array}$
Diglycerid	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{R}_1 \\   \\ \text{H} - \text{O} - \text{CH} \\   \\ \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{R}_2 \end{array}$
Triglycerid	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{R}_2 \\   \\ \text{R}_1 - \text{CO} - \text{O} - \text{CH} \\   \\ \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{R}_3 \end{array}$

### 2.2.2.3 Wachse

Natürliche Wachse bestehen aus freien Fettalkoholen und Fettalkoholen, die mit langkettigen Fettsäuren verbunden sind. Sie schützen bei Pflanzen die Oberfläche von Blättern, Stengeln und Samen vor dem Austrocknen und gegen den Befall durch Mikroorganismen von außen. Auch Obst wird mit ihnen überzogen, um es vor dem Austrocknen zu bewahren.

Wachse sind bei höheren Temperaturen in Fett löslich und kristallisieren bereits bei Raumtemperatur, wodurch es zu unerwünschten Trübungen bei Speiseölen kommt. [6,8]

### 2.2.2.4 Carotinoide

Kohlenwasserstoffverbindungen, die aus acht Isopreneinheiten und somit 40 Kohlenstoffatomen bestehen, sind unter der Bezeichnung Carotinoide zusammengefasst. Sie werden nur von Pflanzen synthetisiert und verleihen ihnen eine oft gelbe, orange oder rote Färbung. Bei grünen Pflanzen werden sie von Chlorophyll überdeckt.

Über die Nahrung nehmen Tiere Carotinoide in ihr Gewebe auf. Ein bekanntes Beispiel ist der gelbgefärbte Dotter eines Hühnereis. [6,8]

### 2.2.3 Lipidzusammensetzung in Algen

#### Glycolipide

Die Zusammensetzung der Glycolipide in Algen ähnelt jener höheren Pflanzen. Sie sind vor allem in Membranen zu finden, die an der Fotosynthese beteiligt sind. Bei dem größten Teil der Glycolipide handelt es sich um polare Galactolipide, entweder um Monogalactosyldiglyceride (MGDG) oder um Digalactosyldiglyceride (DGDG). Diese machen 40 bis 55 und 15 bis 35% aller Membranlipide aus. Das pflanzliche Sulfolipid Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) stellt mit bis zu 29% Anteil einen weiteren wichtigen Bestandteil der Membrane dar. Eine Besonderheit der Struktur lipide in Algen ist ihr hoher Anteil an langkettigen ungesättigten Fettsäuren (PUFA). Zusätzlich zur  $\alpha$ -Linolensäure (ALA, 18:3 $\omega$ -3) können noch Eicosapentaensäure (EPA, 20:5 $\omega$ -3) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6 $\omega$ -3) in den MGDG, DGDG und SQDG enthalten sein. Tabelle 3 zeigt den Anteil an PUFA in den Glycolipiden einiger Meeresalgen. Die Kurzbezeichnung der Omega-3-Fettsäuren unterscheidet sich im zweiten Teil von der gewöhnlichen Schreibweise der Fettsäuren. Durch das Omega-Zeichen wird angezeigt, dass sich die erste Doppelbindung am dritten Atom vom Ende der Kohlenwasserstoffkette aus gesehen befindet. [5,6,9]

Tabelle 3: Fettsäurezusammensetzung einiger Algen [5]

Lipidklasse	% von Fettsäuren gesamt in Glycolipiden					
	16:3	16:4	18:3 $\omega$ -3	18:4	20:5 $\omega$ -3	22:6 $\omega$ -3
			ALA		EPA	DHA
<i>Chlorophyta Chlamydomas moewusii</i>						
MGDG	4	36	43			
DGDG	11	2	18			
SQDG			9	1		
<i>Chlorophyta Parietochloris incisa</i>						
MGDG	21		32		1	
DGDG	2		19		1	
SQDG			19			
<i>Haptophyta Pavlova lutheri</i>						
MGDG			4	26	44	
DGDG			2	13	49	
SQDG			Spuren	1	3	
<i>Haptophyta Isochrysis galbana</i>						
MGDG			4	15	28	5
DGDG			3	12	25	7
SQDG			1	3	8	1
<i>Bacillariophyta Phaedactylum tricorunatum</i>						
MGDG	18	4			31	Spuren
DGDG	17	5			22	Spuren
SQDG					11	
<i>Rhodophyta Porphyridium cruentum</i>						
MGDG					16	
DGDG					20	
SQDG					19	



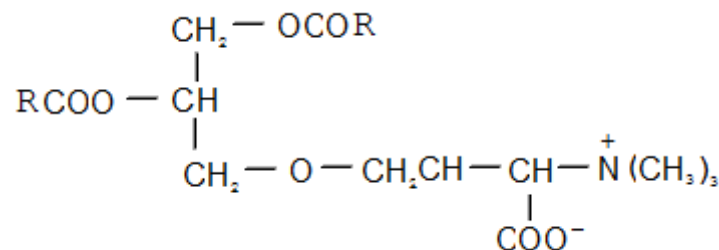
## Phospholipide und Betainlipide

Die wichtigsten in den Algen vorkommenden Phospholipide sind Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerol (PG). Zusätzlich finden sich noch Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI) und Diphosphatidylglycerin (DPG).

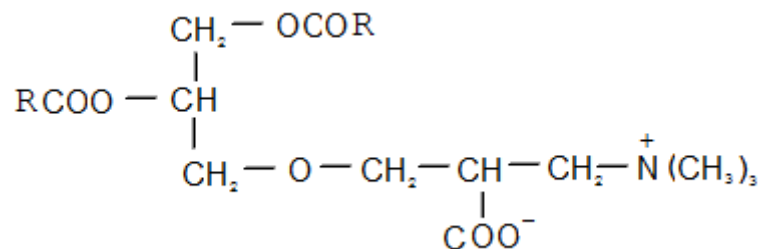
Bis auf PG sind die Phospholipide Bestandteile von Membranen, die nicht an der Fotosynthese beteiligt sind.

Betainlipide sind nicht in höher entwickelten Pflanzen zu finden, sie sind jedoch in Algen weit verbreitet, wo sie in Membranen die Funktionen einnehmen, die in höheren Pflanzen vom Phosphatidylcholin (PC) verrichtet werden. Die drei wichtigsten Betaine sind in Abbildung 6 zu erkennen, R bezeichnet wiederum die Kohlenwasserstoffketten der Fettsäure.

1,2-diacylglyceryl-3-O-4'-(N,N,N-trimethyl)-homoserin (**DGTS**)



1,2-diacylglyceryl-3-O-2'-(hydroxymethyl)-(N,N,N-trimethyl)-β-alanin (**DGTA**)



1,2-diacylglyceryl-3-O-carboxy-(hydroxymethyl)-cholin (**DGCC**)

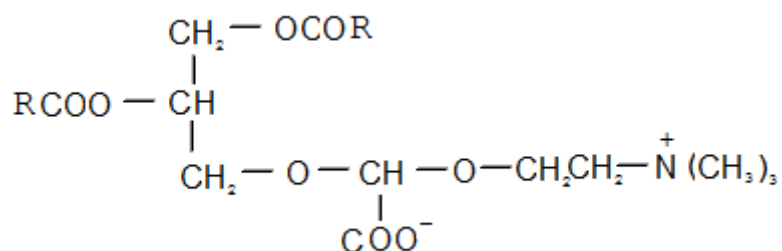


Abbildung 6: Aufbau von DGTS, DGTA und DGCC

Bemerkenswert ist der Unterschied in der Fettsäurezusammensetzung von DGTS in Süßwasser- und Meeresalgen. Süßwasseralgen enthalten hauptsächlich gesättigte Fettsäuren an der sn-1 Position des Glycerins und ungesättigte Fettsäuren (meist 18:3 oder 18:2) an der sn-2 Position, während DGTS in Meeresalgen mit PUFA an beiden Positionen verestert sein kann. [5]

### Triglyceride

Triglyceride (TAG) liegen in Algen meist angehäuft als Speicherprodukte vor. Der Gehalt an TAG ist von Alge zu Alge unterschiedlich und kann von 2 bis zu 77 % des Gesamtlipidanteils betragen. Er ist auch abhängig von diversen Umwelteinflüssen wie Temperatur oder pH-Wert. Normalerweise werden TAG in Licht synthetisiert, in den Zytosolen gelagert und bei Dunkelheit zur Produktion von polaren Lipiden verwendet.

TAG in Algen enthalten sowohl gesättigte als auch ungesättigte Fettsäuren und einige sehr ölhaltige Spezies weisen einen hohen Grad an PUFA auf. Tabelle 4 zeigt den Anteil an Omega-3-Fettsäuren in den TAG und Tabelle 5 eine Zusammensetzung der diversen Lipide einiger Algenarten. [5]

Tabelle 4: Anteil von Omega-3-Fettsäuren in TAG einiger Algenarten [5]

Algenart	Fettsäure	Anteil in TAG [%]
<i>Chlorophyta Parietochloris incisa</i>	ALA (18:3)	0,4
	EPA (20:5)	0,7
	DHA (22:6)	-
<i>Haptophyta Pavlova lutheri</i>	ALA (18:3)	-
	EPA (20:5)	7
	DHA (22:6)	1,1
<i>Haptophyta Isochrysis galbana</i>	ALA (18:3)	1,5
	EPA (20:5)	25,6
	DHA (22:6)	8,1
<i>Bacillariophyta Phaedactylum tricornuntum</i>	ALA (18:3)	-
	EPA (20:5)	35,5
	DHA (22:6)	1,2
<i>Rhodophyta Porphyridium cruentum</i>	ALA (18:3)	-
	EPA (20:5)	15,9
	DHA (22:6)	-

Tabelle 5: Lipidzusammensetzung einiger Algenarten [5]

Alge	% vom Lipiden gesamt											
	MGDG	DGDG	SQDG	PG	PC	PE	PI	TAG	DGTS	DGTA	MAG	DAG
<i>Chlorophyta Chlamydomas moewusii</i>												
-	35	15	10	9	-	8	6	-	16	-	-	-
<i>Chlorophyta Parietochloris incisa</i>												
-	22	14	4	2	6	3	1	43	4	-	-	-
<i>Haptophyta Pavlova lutheri</i>												
-	19	12	9	1	-	-	-	46	-	6	-	-
<i>Haptophyta Chrysochromulina polylepis</i>												
-	7	32	-	4	43	4	1	14	-	-	-	-
<i>Haptophyta Isochrysis galbana</i>												
-	18	13	6	1	9	2	4	25	-	-	6	12
<i>Bacillariophyta Phaeodactylum tricornutum</i>												
-	21	12	2	2	6	4	1	40	-	-	4	7
<i>Rhodophyta Porphyridium cruentum</i>												
-	14	24	5	-	5	-	2	25	-	-	3	19

#### 2.2.4 Lipidzusammensetzung in Fischöl

Der Fettgehalt von Fischen ist sehr unterschiedlich und hängt außer von der Fischart auch von vielen anderen Faktoren ab, wie vom Reifungszyklus, dem Nahrungsangebot und den – gewohnheiten. Fischöl, das direkt nach der Extraktion vorliegt, ist ein Gemisch aus einer Vielzahl von Komponenten wie freien Fettsäuren, Glyceride, Phospholipide, Sterole, Tocopherole und manchmal Schwermetalle. Nach der Extraktion wird das Öl aufbereitet und alle unerwünschten Komponenten daraus entfernt. Das raffinierte Fischöl enthält danach vor allem Triglyceride, die Omega-3-Fettsäuren enthalten, die bevorzugt an der zweiten Stelle des Glycerins gebunden sind und die ernährungsphysiologisch für den Menschen wichtig sind. Allerdings enthält Fischöl nur wenige Tocopherole, die antioxidativ wirken. Mehr zu den Omega-3-Fettsäuren und ihrem Oxidationsverhalten im folgenden Kapitel. [6,11]

### 2.3 Omega-3-Fettsäuren

Omega-3-Fettsäuren sind uns heutzutage vor allem aus der Werbung bekannt, wo uns Menschen, die durch die Einnahme der Fettsäuren, gesünder, klüger und vitaler sein sollen als der Durchschnitt, entgegen lachen. Natürlich steht dahinter eine ausgeklügelte Marketingstrategie, die den Verkaufswert der speziellen Produkte steigern soll, allerdings entspricht der Grundgedanke, dass wir Omega-3-Fettsäuren zum Leben brauchen, durchaus der Wahrheit.

### 2.3.1 Allgemeines

Viele Fettsäuren kann der menschliche Körper selbst synthetisieren, einige jedoch müssen unserem Organismus von außen zugeführt werden. Man spricht dabei von essentiellen Fettsäuren, zu denen neben den Omega-6-Fettsäuren auch die Gruppe der Omega-3-Fettsäuren zählt. Diese Fettsäuren haben ihre erste Doppelbindung am sechsten bzw. dritten Kohlenstoffatom vom Ende der Kohlenwasserstoffkette aus gesehen. [1,6,9]

Da das Augenmerk dieser Arbeit auf den Omega-3-Fettsäuren liegt, sind die Strukturformeln der drei bekanntesten Vertreter aus dieser Gruppe in Abbildung 7 zu sehen:

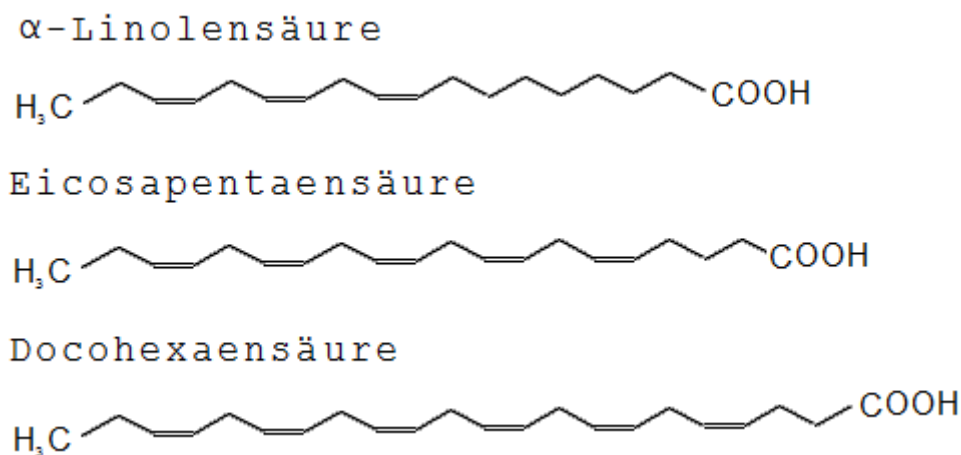


Abbildung 7: Aufbau von  $\alpha$ -Linolensäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure

Es ist ersichtlich, dass die  $\alpha$ -Linolensäure (ALA, 18:3 $\omega$ -3) die kürzeste Kohlenstoffkette der drei Säuren aufweist. Sie kann zu Eicosapentaensäure (EPA, 20:5 $\omega$ -3) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6 $\omega$ -3) weitersynthetisiert werden. EPA ist Bestandteil von Phospholipiden von Zellmembranen und ist ein Ausgangsstoff für die Bildung von Eicosanoiden, hormonähnlichen Stoffen, die viele Zellfunktionen wie den Blutfluss und die Sekretabsonderung aus Drüsen regeln. DHA ist vor allem im Gewebe der Netzhaut und des Gehirns und in den Nerven des Gehör- und Geruchsinns zu finden. [1,12]

### 2.3.2 Oxidationsverhalten

Ein charakteristisches, wenn auch unerfreuliches Kennzeichen der Omega-3 PUFA ist ihre Oxidationsanfälligkeit. Sie begünstigt die Bildung von Peroxiden und anderen unerwünschten Komponenten, die PUFA reiches Öl übel riechen oder verderben lassen.

Die Oxidationsgeschwindigkeit ist abhängig von der Lipidzusammensetzung des Öls und von Parametern wie Temperatur, Lichtverhältnissen und der Präsenz von Sauerstoff und anderen Schwermetallen. Auch die Position der ungesättigten Fettsäure im Triglycerid

beeinflusst die Oxidationsgeschwindigkeit. So oxidieren Triglyceride mit ungesättigten Fettsäuren in der ersten oder dritten Position schneller als jene, bei denen die Fettsäure an der 2er Stellung zu finden ist.

Die Oxidation in Fischöl kann in drei Phasen eingeteilt werden: eine *Induktionsphase*, eine *Wachstumsphase* und eine *Schlussphase*.

Die Länge der Induktionsphase hängt von der Fettzusammensetzung des Lipids ab. Je mehr Allylgruppen vorkommen, desto kürzer ist sie und umso schneller verläuft die folgende Oxidation. Es werden in dieser Phase Radikale und Hydroperoxide gebildet, die mit Lipidmolekülen zu weiteren reaktiven chemischen Substanzen reagieren, so dass die Oxidation mit Sauerstoff ermöglicht wird. Diese Kettenreaktion wird *Autooxidation* genannt. Die Bildung der Radikale im Anfangsstadium verläuft autokatalytisch und wird durch Lichteinwirkung und der Präsenz von Schwermetallen begünstigt.

Auf Grund ihrer Oxidationsanfälligkeit ist es nötig, Lebensmittel und Öle, die Omega-3-Fettsäuren enthalten, bestmöglich zu schützen. Das macht eine Lagerung bei optimalen Bedingungen unabdingbar. Studien haben gezeigt, dass dabei eine licht- und sauerstoffarme Umgebung förderlich ist. Zusätzlich wurden weitere Methoden zur Stabilisierung entwickelt, wie etwa die Verwendung von Antioxidantien, wobei jene bevorzugt werden, die natürlich vorkommen. Beispiele sind Flavonoide und Tocopherol, das uns als Vitamin E geläufig ist.

Eine zusätzliche Möglichkeit ist die Verkapselung oder Mikroverkapselung der Lipide mit einem Überzugsmittel. Sprühtrocknung ist das dafür heute am häufigsten eingesetzte und billigste Verfahren, aber auch die Anwendung von Gefriertrocknung oder Ultraschallzerstäubung wurden auf diesem Gebiet weiterentwickelt, um die bei der Sprühtrocknung hohen Temperaturen zu vermeiden. [1,6,13]

### 2.3.3 Bedeutung für den Menschen

PUFA sind Bestandteile jeder Zellmembran und beeinflussen somit deren Struktur, das dynamische Verhalten und die Regulation der Ionenkanäle. Des Weiteren beeinflussen sie auch die Genexpression. Es ist demnach lebenswichtig für den Menschen, den eigenen Organismus ausreichend mit Omega-3 PUFA zu versorgen. Sie helfen Krankheiten wie Artherosklerose, gemeinhin auch Arterienverkalkung genannt, vorzubeugen und senken den Triglyceridgehalt im Blut, wodurch ein besserer Blutfluss herbeigeführt wird und somit die Wahrscheinlichkeit einer Herz-Kreislauf-Erkrankung durch Verstopfung der Venen sinkt.

Um lebensnotwendige Funktionen aufrecht erhalten zu können, wird eine Mindestzufuhr von EPA und DHA von 0,1 bis 0,2 g angenommen, der empfohlene Wert liegt bei 1,25 g pro Tag, das entspricht etwa 0,5% der Gesamtenergie bei einem Energierichtwert von 2400 kcal. [4] Die Eicosapentaensäure (EPA) und die Docosahexaensäure (DHA) stellen Derivate von  $\alpha$ -Linolensäure (ALA) dar. Das heißt, grundsätzlich müsste allein die Aufnahme von ALA reichen, um den Körper ausreichend mit essentiellen PUFA zu versorgen. Allerdings verläuft die Synthese nur sehr langsam, weswegen zu einer zusätzlichen Aufnahme von EPA und DHA angeraten wird. Dies geschieht heute vor allem durch mit Omega-3-Fettsäuren angereicherte Lebens- und Nahrungsergänzungsmittel. [1,14]

### 2.3.4 Produktion von Omega-3-Fettsäure-Konzentraten - Stand der Technik

Der Großteil der am Markt erhältlichen Omega-3-Fettsäure-Konzentrate liegt in der Form von Esterderivaten vor. Allerdings ist man durch Untersuchungen mittlerweile zu dem Schluss gekommen, dass die Fettsäuren für den menschlichen Körper leichter in der Form von Triglyceriden verwertbar sind. [1]

Das folgende Kapitel gibt einen kurzen Überblick, welche Quellen für die Produktion der Konzentrate zur Verfügung stehen und wie diese technisch am besten verwertet werden können.

#### 2.3.4.1 Produktion von Konzentraten aus Fischöl

Fischöl gilt als natürlich Quelle für Omega-3-Fettsäuren. Tabelle 6 zeigt, dass vor allem Meeresfische mit einem hohen Fettgehalt viel EPA und DHA enthalten.

Tabelle 6: Anteil an Omega-3-Fettsäuregehalt in verschiedenen Fischarten [1]

Gattung	g/100 g Portion	
	EPA (C20:5 $\omega$ -3)	DHA (C22:6 $\omega$ -3)
Makrele	1,1	2,56
Sardine	0,62	1,12
Lachs	0,5	1
Thunfisch	0,24	0,98
Hecht	0,1	0,54
Schwertfisch	0,15	0,3

Allerdings müssen die Fettsäuren vor ihrem Verkauf erst in eine für den menschlichen Organismus leicht zu metabolisierende Form gebracht werden. Durch Studien ist heute

belegt, dass es sich bei dieser Form um jene von Acylglycerinen handelt, bei denen die Fettsäure an die sn-2 Position gebunden ist. Bisher sind aber vor allem Aufarbeitungsmethoden entwickelt worden, in denen die Fettsäuren in den Konzentraten als Ester auftreten, die durch die Umesterung von Triglyceriden erhalten werden. Diese Ester werden durch weitere Verfahrensschritte wie Chromatographie, Molekular- oder Vakuumdestillation, Kristallisation bei niedrigen Temperaturen, Harnstoffkomplexierung oder neuere, viel versprechende Methoden wie der Fraktionierung bzw. Chromatographie mit überkritischen Fluiden oder dem Einsatz von Enzymen aufkonzentriert, bevor sie in der pharmazeutischen oder Lebensmittelindustrie weiterverarbeitet werden. [1]

#### **2.3.4.2 Produktion von Konzentraten aus alternativen Quellen**

Nicht erst seit heute ist bekannt, dass der weltweite Fischbestand in Zukunft sinken wird. Außerdem nehmen durch die zunehmende Wasserverschmutzung viele Meeresfische Schadstoffe wie Kupfer, Quecksilber oder Dioxine auf, die durch den Verzehr schlussendlich auch in den menschlichen Körper gelangen. Aus diesen Gründen werden andere Quellen für die Konzentrierung von Omega-3-Fettsäuren gesucht.

Eine Alternative stellen Mikroalgen oder Phytoplankton dar, die die Basis der marinen Nahrungskette bilden. Eine Studie vergleicht das aus Mikroalgen gewonnene Öl mit Fischöl. Es hat sich dabei herausgestellt, dass beide etwa denselben Gehalt an Omega-3 PUFA aufweisen. Für das Öl aus Mikroalgen spricht die Tatsache, dass es im Gegensatz zum Fischöl geruchlos ist und weniger Cholesterin enthält. Außerdem sind darin zusätzlich Squalen und Physterine zu finden, die sich positiv auf die Gesundheit des Menschen auswirken.

Mikroalgen sind genügsam und leicht und das ganze Jahr über kultivierbar, was sie aus wirtschaftlicher Sicht gesehen sehr interessant macht und weshalb in den letzten Jahren viele Untersuchungen über die optimalen Wachstumsbedingungen erschienen sind.

Die Aufarbeitungsmethoden gleichen jenen, die bei Fischöl angewendet werden und sind auch Inhalt vieler Studien.

Eine weitere Alternative zu Fischöl sind transgene, also genetisch veränderte Pflanzen. Obwohl das Wissen und die Möglichkeiten zur industriellen Produktion gegeben sind, wird dieser Weg der Gewinnung von Omega-3 PUFA Konzentraten als ethisch bedenklich angesehen und daher in weiten Teilen der Welt vermieden. [1]

## 2.4 Extraktion

Bei der Extraktion wird eine Substanz durch die Zugabe einer Flüssigkeit selektiv aus einem Feststoff- oder einem Flüssiggemisch herausgelöst. [15]

### 2.4.1 Allgemeines

Abbildung 8 zeigt das grundsätzliche Ablaufschema eines Extraktionsprozesses. Das Ausgangsgemisch, die Trägerstoffphase, wird in einem Extraktor mit dem Lösungsmittel L (oder auch Extraktionsmittel genannt) zusammengeführt und intensiv miteinander in Kontakt gebracht. Nach der Extraktion erfolgt die Trennung in die *Raffinat*- und die *Extrakt*phase. Die Raffinatphase entspricht dabei der Trägerstoffphase und die Extraktphase dem angereicherten Lösungsmittel. Das Extrakt wird wiederum einem weiteren Trennprozess unterworfen und das recycelte Lösungsmittel kann wieder zur Extraktion eingesetzt werden.

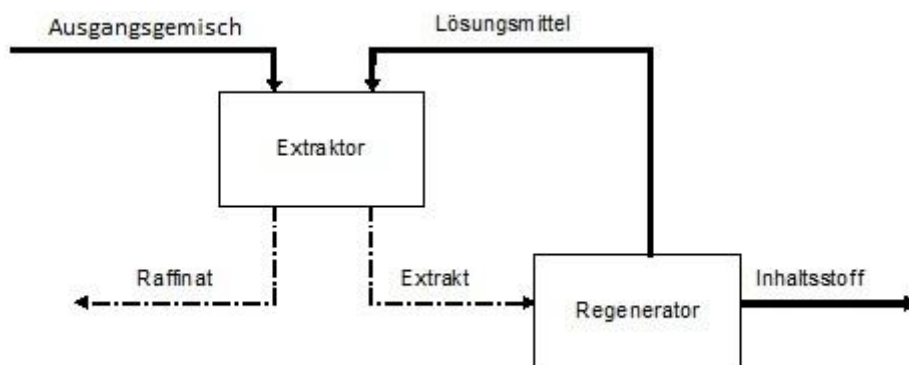


Abbildung 8: Schema eines Extraktionsprozesses [16]

Da in der Praxis der Trägerstoff fast immer mit dem Lösungsmittel verunreinigt wird, müssen Trennschritte nachgeschaltet werden. Dadurch gestalten sich Extraktionsprozesse in der Praxis häufig kompliziert. [15,16,17]

### 2.4.2 Flüssig-Flüssig Extraktion

#### 2.4.2.1 Allgemeines

Bei der Flüssig-Flüssig Extraktion, auch *Solventextraktion* genannt, liegen die Trägerphase und das Lösungsmittel beide im flüssigen Zustand vor. Sie wird meistens kontinuierlich



durchgeführt, da die beiden flüssigen Phasen leicht durch die Apparate gefördert werden können.

Solventextraktion wird unter anderem eingesetzt, wenn

- die Komponenten bei höheren Temperaturen miteinander reagieren und unerwünschte Nebenprodukte bilden
- die Komponenten sehr hohe oder tiefe Siedepunkte aufweisen
- die Siedepunkte der Komponenten nahe beieinander liegen oder ein Azeotrop vorliegt
- die Menge der Schlüsselkomponente gering ist, so dass sich eine Destillation als zu teuer erweisen würde. [15,16]

#### 2.4.2.2 Phasengleichgewicht

Voraussetzung für die Durchführbarkeit einer Extraktion ist die vollkommene oder teilweise Unmischbarkeit von Lösungsmittel und Trägerstoff. Diese Unmischbarkeit ist durch eine Mischungslücke gekennzeichnet, die durch ein *Dreiecksdiagramm* für jedes ternäres Gemisch bei gleichbleibender Temperatur und konstantem Druck optisch darstellbar ist. Abbildung 9 zeigt ein solches Diagramm für ein System, das für die Solventextraktion verwendet werden kann.

An den Eckpunkten sind die Reinkomponenten aufgetragen und die Mischungslücke wird durch die Biondalkurve ersichtlich, die das System in ein Einphasen- bzw. ein Zweiphasengebiet teilt. Unterhalb der Kurve zerfällt das ternäre System in zwei flüssige Phasen. Mit zunehmender Konzentration an zu extrahierendem Stoff B wird die Mischungslücke immer kleiner, da sich die Gleichgewichtszustände der beiden Phasen immer weiter annähern, bis sie im kritischen Punkt (K. P.) zusammenfallen und die Mischungslücke somit verschwindet. Auch mit steigender Temperatur nimmt die Mischungslücke bei vielen ternären Gemischen weiter ab. Die Gleichgewichtszustände zwischen der Raffinat- und Extraktphase werden durch die gestrichelt gezeichneten Konoden verbunden. [16,17]

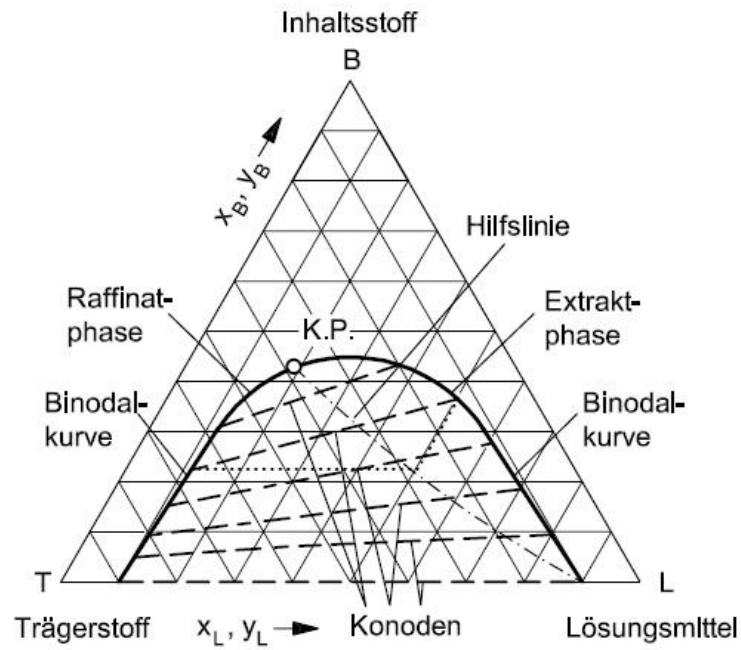


Abbildung 9: Beispiel für ein Dreiecksdiagramm einer typischen Solventextraktion [16]

### 2.4.2.3 Stoffführung

Eine Extraktion kann einstufig, mehrstufig, im Gleichstrom oder im Gegenstrom erfolgen.

#### Einstufige Extraktion

Bei der einstufigen Extraktion wird versucht durch intensives Mischen des Ausgangstromes  $\dot{F}$  mit dem Lösungsmittel  $\dot{L}$  eine möglichst große Phasengrenzfläche zu erreichen und den Stoffaustauschvorgang damit zu verbessern. Es wird so viel Lösungsmittel zugesetzt, dass der Mischpunkt  $\dot{M}$  im Zweiphasengebiet liegt und das Gemisch in das Raffinat  $\dot{R}$  und in das Extrakt  $\dot{E}$  zerfällt, die nach hinreichend langer Zeit im Gleichgewicht zueinander stehen, wie Abbildung 10 zeigt.

Das Mengenverhältnis  $\dot{F}/\dot{L}$  bestimmt außerdem die

Zusammensetzung von Extrakt bzw. Raffinat.

In der Praxis kann mit der einstufigen Extraktion nur ein

geringer Trenneffekt erzielt werden, weshalb die vielstufige Extraktion bevorzugt wird. [16]

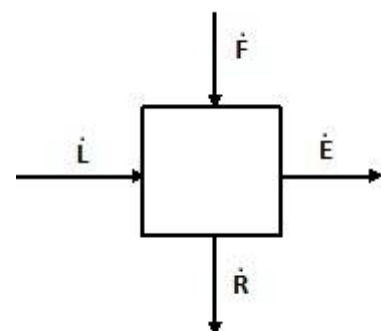


Abbildung 10: Einstufige Extraktion

### Vielstufige Kreuzstromextraktion

Bei der vielstufigen Kreuzstromextraktion durchläuft der Ausgangsstrom  $\dot{F}$  viele Stufen, wobei bei jeder Stufe frisches Extraktionsmittel  $\dot{L}$  zugeführt wird. Dadurch ergeben sich naturgemäß auch mehrere Mischpunkte. Der Stromverlauf ist in Abbildung 11 zu sehen. Verwendet man genügend Stufen, kann der zu extrahierende Stoff beinahe vollständig aus dem Raffinat gelöst werden, allerdings nimmt auch die Konzentration des Stoffes im Extrakt von Stufe zu Stufe ab. [16]

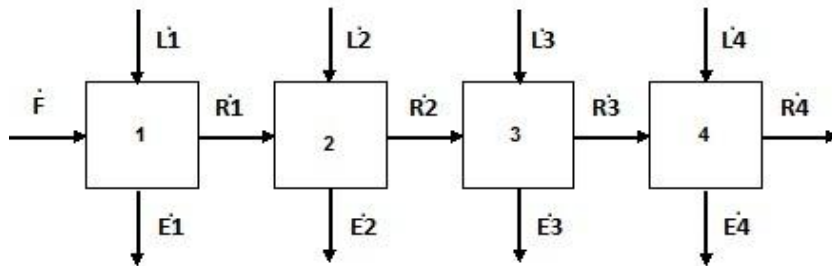


Abbildung 11: Vielstufige Kreuzstromextraktion

### Vielstufige Gegenstromextraktion

Die vielstufige Extraktion kann auch im Gegenstrom geführt werden, siehe Abbildung 12. Dabei nimmt die Konzentration  $x_F$  des zu extrahierenden Stoffes im Ausgangsstrom  $\dot{F}$  auf  $x_n$  (in diesem Fall  $x_4$ ) ab, während die Konzentration  $y_0$  auf  $y_1$  im Extraktstrom zunimmt. [16]

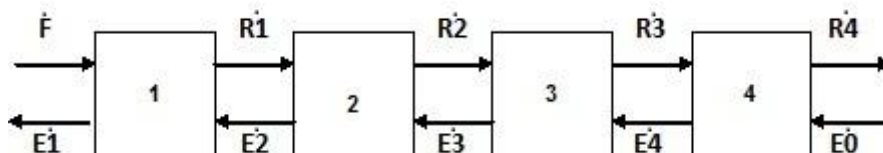


Abbildung 12: Vielstufige Gegenstromextraktion

### 2.4.3 Fest-Flüssig Extraktion

Bei der Fest-Flüssig Extraktion, auch *Leaching* genannt, wird ein Stoff aus einem Feststoffgemisch mit Hilfe eines flüssig vorliegenden Lösungsmittels gelöst. Sie wird meistens diskontinuierlich durchgeführt, da sich die feste Ausgangsphase erstens nur schwer fördern lässt und zweitens hohe Verweilzeiten nötig sein können, die einen kontinuierlichen Betrieb fast unmöglich machen.

Um sich den Ablauf einer Fest-Flüssig Extraktion vorstellen zu können, nimmt man an, dass die poröse Feststoffmatrix, aus der der Inhaltstoff herausgelöst werden soll, aus Grob- und Feinporen besteht, wobei sich der zu extrahierende Stoff vorwiegend in den Feinporen befindet. Während der Extraktion tritt das Lösungsmittel in die Poren ein und vermengt sich dort mit dem Inhaltstoff. Durch Diffusion erfolgt während der Extraktion ein Konzentrationsausgleich zwischen der Lösung, die das Extraktionsgut umgibt und jener, die sich darin befindet. Im Gleichgewichtszustand hat die Flüssigkeit in den Fein- und in den Grobporen die gleiche Zusammensetzung, das heißt, das Verhältnis  $B/F$  im Raffinat und im Extrakt ist identisch. Die Konoden, die das Gleichgewicht zwischen Raffinat und Extrakt angeben, entspringen in diesem Fall alle in der linken Ecke des Dreieckdiagramms, siehe Abbildung 13.

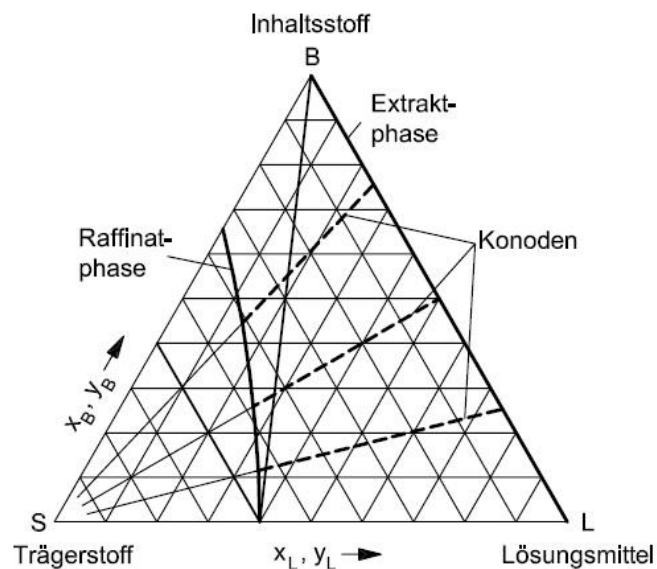


Abbildung 13: Beispiel für ein Dreieckdiagramm einer Fest-Flüssig-Extraktion [16]

Man nimmt an, dass die Rückgewinnung des Lösungsmittels oft nicht vollständig erfolgt und durch das Wirken von Adhäsionskräften Restflüssigkeit in den Feinporen verbleibt. Dadurch ist eine vollständige Extraktion praktisch nicht möglich. Dieser Zustand wird durch die *Raffinatskurve* bildlich veranschaulicht.

Das hier angenommene Modell, bei dem sich der Inhaltstoff frei in den Feinporen befindet, ist stark vereinfacht, denn in der Realität ist jener oft ein Bestandteil der Matrix selbst (zum Beispiel bei Pflanzenzellen) und muss erst separat herausgelöst werden. [16,17]

#### 2.4.4 Extraktionsmittel

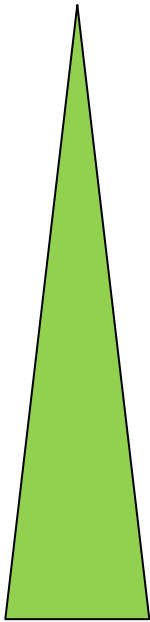
Die Wahl des Extraktionsmittels ist von entscheidender Bedeutung für den Verlauf einer Extraktion. Es soll eine möglichst große Mischungslücke mit dem Raffinat aufweisen und den gewünschten Inhaltstoff selektiv aus einem Stoffgemisch herauslösen.

Das Lösungsvermögen eines Extraktionsmittels wird durch drei verschiedene Faktoren beeinflusst. Der erste Faktor beschreibt die Dispersionswechselwirkungen, der zweite und dritte Faktor umfassen den Anteil der Dipol/Dipol- Wechselwirkung und der Wasserstoffbrückenbildung. Der Anteil der Dispersionswechselwirkungen ist für viele Stoffe etwa gleich groß, während die zwei letzten Faktoren je nach Stoff stark variieren können. Besonders hoch ist der Anteil der Wasserstoffbrückenbildung zum Beispiel bei polaren Substanzen wie Wasser, Alkoholen und Aminen.

Es gilt die Regel: „Ähnliches löst Ähnliches“. Unpolare Substanzen sind zum Beispiel in Wasser nicht lösbar, da die Anziehungskräfte der Wassermoleküle untereinander um vieles stärker sind als die Kräfte, die zwischen den Wassermolekülen und den Molekülen der unpolaren Substanz wirken. Die Wassermoleküle lagern sich aneinander und verdrängen die anderen Moleküle, so dass die beiden Flüssigkeiten getrennt bleiben. Methanol hingegen besteht ähnlich wie Wasser aus polaren Molekülen, die sich bei einer Vermischung mittels Wasserstoffbrücken an den Wassermolekülen anlagern können und umgekehrt. Dadurch sind Wasser und Methanol in jedem beliebigen Mengenverhältnis miteinander mischbar.

Die Elutionskraft oder Stärke eines Lösungsmittels wurde empirisch bestimmt und mit dem Symbol  $\epsilon_0$  als Zahlenwert festgehalten. Die Reihung von schwachen bis zu starken Lösungsmitteln wird elutrope Reihe genannt und ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Elutrope Reihe [18]

Lösungsmittel	$\epsilon_0$	Polarität
n-Pentan	0	
n-Hexan	0	
Isooctan	0,1	
Cyclohexan	0,03	
Cyclopentan	0,04	
Toluol	0,22	
Benzol	0,25	
Diethylether	0,29	
Chloroform	0,31	
Aceton	0,43	
Essigsäuremethylester	0,46	
Nitromethan	0,49	
Isopropanol	0,6	
Ethanol	0,68	
Methanol	0,73	
Essigsäure	groß	
Wasser	größer	

Weitere Anforderungskriterien an das Lösungsmittel sind eine ausreichend große Dichtedifferenz  $\Delta\rho$ , um die der Extraktion nachfolgenden Trennschritte zu vereinfachen, die Verfügbarkeit, die chemische Stabilität, ein möglichst niedriger Preis und keine oder nur geringe Giftigkeit. [16,18,19]

## 2.5 Extraktion von Algenlipiden mit organischen Lösungsmitteln

Die Extraktion von Lipiden aus der Algenzelle kann in fünf Schritte unterteilt werden, die in Abbildung 14 zu sehen sind.

Wird die Zelle einem unpolaren Lösungsmittel wie Hexan oder Chloroform ausgesetzt, penetriert das Lösungsmittel zunächst durch die Membran in das Zytoplasma (1). Dort trifft es auf Lipide, mit denen es interagiert und über van der Waals-Kräfte Lösungsmittel-Lipid-Komplexe formt (2 und 3). Dieser Komplex diffundiert, angetrieben durch einen Konzentrationsgradienten, zunächst durch die Zellmembran und danach durch den statischen Lösungsmittelfilm, der sich unmittelbar um die Zelle legt (4). Dieser Film entsteht auf Grund der Wechselwirkungen zwischen den Zellwänden und dem organischen Lösungsmittel und bleibt bestehen, unabhängig vom Strömungs- und Bewegungszustand des Lösungsmittels. Zum Schluss findet sich das Lipid in dem Lösungsmittel (5).

Manche neutrale Lipide bilden zusammen mit polaren Lipiden einen Komplex, der über Wasserstoffbrücken mit den Proteinen in der Zellwand verbunden ist. Die van der Waals-Kräfte, die zwischen unpolaren Lösungsmitteln und neutralen Lipiden entstehen, reichen nicht aus, um den Komplex von der Zellwand zu lösen. Aus diesem Grund greift man hier auf Mischungen aus polaren und unpolaren Lösungsmitteln zurück, da polare Lösungsmittel wie Methanol mit polaren Lipiden Wasserstoffbrücken ausbilden können, wodurch sich der Lipidkomplex von dem Protein lösen lässt. Auch dieser Vorgang wird in fünf Einzelschritte unterteilt, wie in der unteren Hälfte von Abbildung 14 zu sehen ist. Der Vorteil bei der Kombination aus polaren und unpolaren Lösungsmitteln ist, dass alle Arten von Lipiden (polar, unpolar, an Zellwand gebundene) aus der Algenzelle herausgelöst werden können, weshalb sie auch in der Praxis bevorzugt wird. [20]

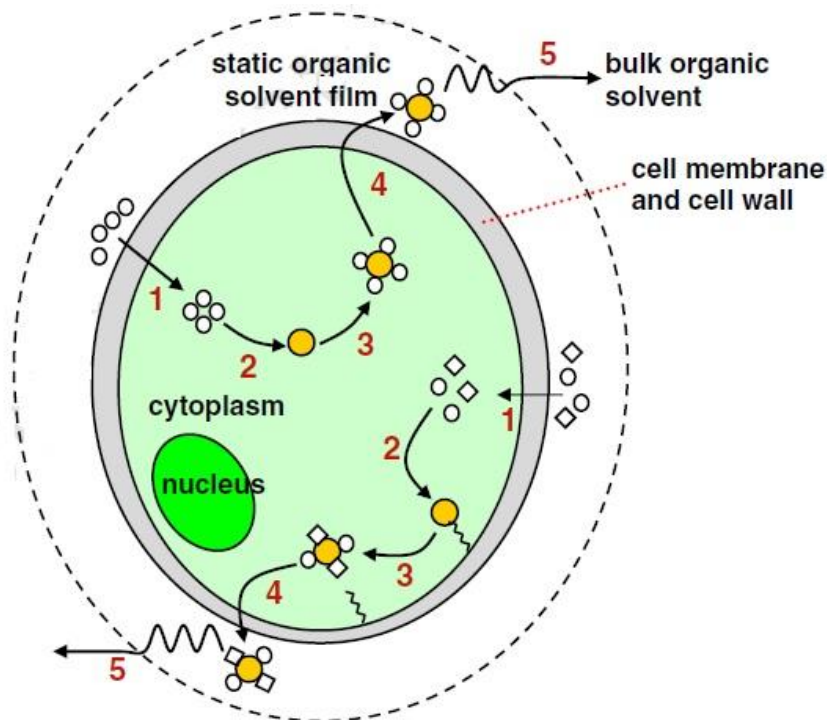


Abbildung 14: Vorgänge bei einer Extraktion von Algenlipiden [20]

- Unpolares Lösungsmittel
- ◇ Polares Lösungsmittel
- Lipid

Die Menge an Lipiden, die durch Extraktion aus der Algenbiomasse gewonnen werden kann, ist von vielen Faktoren abhängig. Dazu zählen der ursprüngliche Lipidgehalt in der Alge, die Extraktionszeit und auch der Massenübergangskoeffizient, der wiederum abhängig ist von der Drehzahl des Rührers, der Temperatur und dem Verhältnis von Lösungsmittel zu trockener Biomasse. [20]

## 2.6 In Situ-Umeresterung

Wie bereits im Kapitel zu den technischen Anwendungen von Algen angesprochen, können Algen auch als Rohstoff für die Produktion von Biodiesel herangezogen werden. Triglyceride, die zuvor aus der Biomasse extrahiert wurden, werden mit einem kurzkettigen Alkohol in Anwesenheit eines Katalysators zu Methylester und Glycerin umgeestert, siehe Abbildung 15.

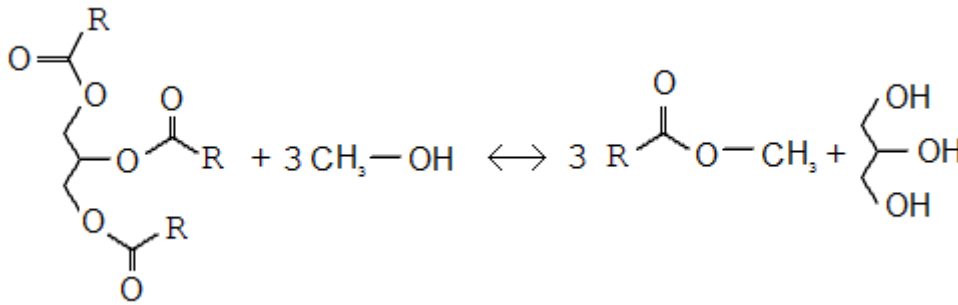


Abbildung 15: Umesterung von Triglyceriden mit Methanol

Die konventionelle Methode zur Herstellung von Biodiesel besteht demzufolge aus zwei separaten Schritten: der Extraktion zur Gewinnung der Triglyceride und der darauffolgenden Umesterung. Das Ziel der In Situ-Umesterung besteht darin, die Prozessführung insofern zu vereinfachen, als dass Extraktion und Umesterung in einen Prozessschritt zusammengefasst werden. Der Katalysator wird der Biomasse zeitgleich mit dem Methanol beigesetzt, wodurch extrahierte Triglyceride sofort verestert werden können. Das Gemisch, das neben Methanol, Biodiesel, Glycerin und Katalysator auch noch unveresterte Lipidanteile und Zellrückstände enthält, muss nach der Veresterung noch aufgearbeitet und gereinigt werden. Zellrückstände werden durch Filtration entfernt, während das Methanol durch Destillation rückgewonnen wird. Das Gemisch wird danach stehen gelassen, bis sich Glycerin am Boden absetzt und die obere Phase, die die unveresterten Lipide und den Biodiesel enthält, abdekantiert werden und anschließend mit Wasser gewaschen werden kann, um alle Rückstände des Katalysators zu beseitigen.

Einflussfaktoren auf die Effizienz der In Situ- Veresterung sind wie bei der Extraktion unter anderem das Verhältnis von Methanol zu Biomasse und die Reaktionstemperatur. Studien haben im Weiteren gezeigt, dass der Wassergehalt, der in der Biomasse vorliegt, sich negativ auf das Ergebnis auswirkt, da das Wasser das Gleichgewicht bei der Reaktion von Öl zu Biodiesel beeinflusst. [20,21]

## 2.7 Adsorption

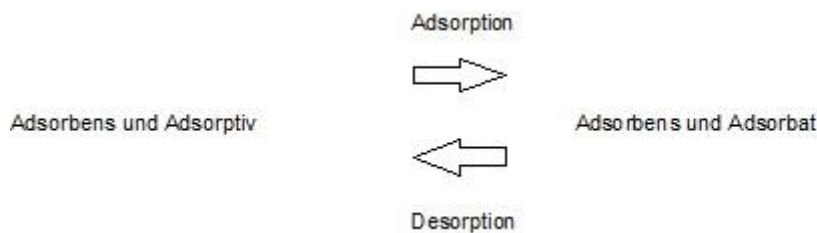
Da bei den Versuchen, die im praktischen Teil der Arbeit durchgeführt werden, auch die Adsorption eine Rolle spielt, werden für ein besseres Verständnis die wichtigsten Grundlagen zusammengefasst.



### 2.7.1 Allgemeines

Bei der Adsorption werden Moleküle (Adsorptive) aus einer fluiden Phase an die Oberfläche eines Feststoffes (Adsorptionsmittel, Adsorbens) angelagert. Somit handelt es sich um einen Oberflächeneffekt an der festen Phase. Werden die Teilchen hingegen von der Oberfläche gelöst, spricht man von *Desorption*.

Industriell verwendete Adsorbentien sind beispielsweise Silicagel, Tonerdegel, Aktivkohle und Molekularsiebe. Sie alle haben den Vorteil der Mikroporosität und demnach eine große innere Oberfläche, an die sich die Adsorptive anlagern können. [16]



### 2.7.2 Stoffführung

Die Stoffführung bei einer Ad- bzw. Desorption kann kontinuierlich oder diskontinuierlich, ein- oder mehrstufig und im Gleich- oder Kreuzstrom geführt werden. Bevorzugt wird in der Technik die diskontinuierliche Verfahrensweise, da sich die Beförderung des festen Adsorbens mühsamer gestaltet als die Beförderung eines Fluids bei der Extraktion.

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen einen einstufigen Ad- bzw. Desorber und die dazugehörigen Arbeitsdiagramme. S bezeichnet die feste Phase und G die flüssige Phase. Der Index r steht für das unbeladene, reine Adsorbens bzw. für den beladenen Flüssigstrom. Das Adsorbens wird von der Beladung  $X_0$  auf  $X_1$  angereichert, indem der Trägerstrom  $\dot{G}$  das Adsorptiv abgibt. Dadurch wird dessen Beladung  $Y_0$  auf  $Y_1$  vermindert. Die Steigung  $-\frac{\dot{S}_r}{\dot{G}_r}$  lässt sich in das Gleichgewichtsdigramm eintragen.

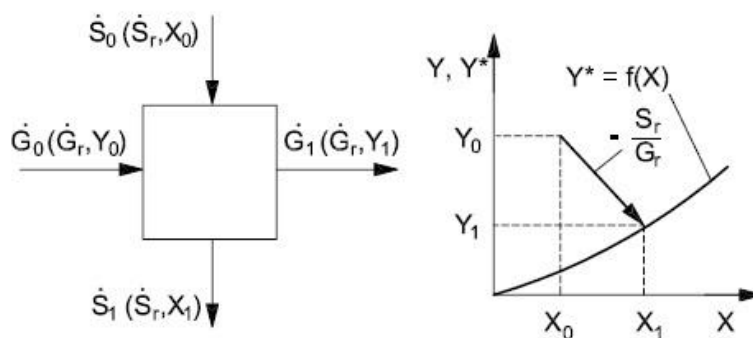


Abbildung 16: Einstufige Adsorption [16]

Bei der Desorption verläuft der Vorgang umgekehrt. Das Adsorbens wird entladen, während der Trägerstoff mit dem Adsorptiv angereichert wird.

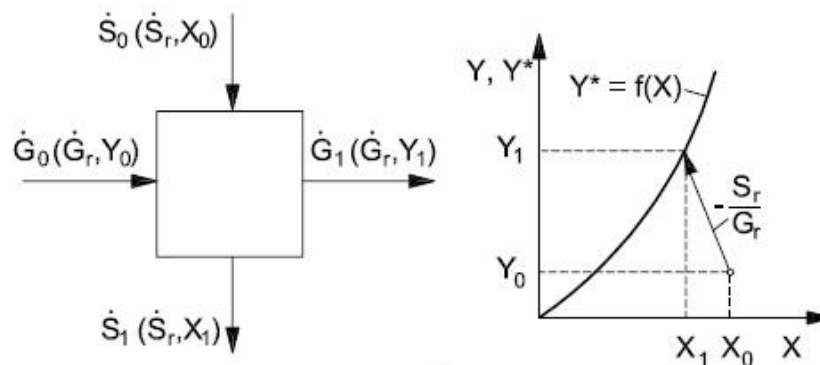


Abbildung 17: Einstufige Desorption [16]

Die Adsorption läuft so lange ab, bis das Gleichgewicht zwischen den beiden Phasen erreicht ist. Dieses Gleichgewicht ist abhängig von den treibenden Potentialgefällen sowie von den Stofftransportwiderständen, die am Adsorbens vorherrschen:

- Transport in der fluiden Phase zur Konzentrationsgrenzschicht, die ein Teilchen umhüllt;
- Transport durch die Konzentrationsgrenzschicht;
- Transport in den Makro- und Mesoporen in der fluiden Phase;
- Transport in den Mikroporen in der fluiden Phase;
- Anlagerung des Moleküls an die Adsorberoberfläche. Dies entspricht dem Übergang vom fluiden zum adsorbierten Zustand.

Bei der Adsorption wird in diesem letzten Schritt Wärme freigesetzt, während bei der Desorption Wärme zugeführt werden muss, damit der Prozess ablaufen kann. Die Widerstände treten demzufolge bei der Desorption auch in umgekehrter Reihenfolge auf. [16]

### 3 Experimenteller Teil

Im experimentellen Teil der Arbeit wurden verschiedene Ausgangsstoffe verwendet: Lachsöl, Mikroalgenbiomasse, mit der bereits Extraktionsversuche durchgeführt worden waren und die daher keine Lipide und Wertstoffe mehr enthielt und Mikroalgenbiomasse der *Chlorella vulgaris*. Das Lachsöl und die Algenbiomasse enthalten langkettige ungesättigte Fettsäuren, allerdings unterscheiden sie sich im Hinblick auf ihre Verteilung auf die verschiedenen Lipide. Während die Fettsäuren im Fischöl in gebundener Form vor allem in unpolaren Triglyceriden zu finden sind, kommen sie in den Mikroalgen auch in polaren Lipiden vor. Demnach sind verschiedene Extraktionsmittel nötig, um die Lipide und die Fettsäuren aus dem Ausgangsmaterial zu lösen.

Die Versuche unterscheiden sich durch das Ausgangsmaterial und die Durchführung. Sie wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und es wurden immer die gleichen Chemikalien, Lösungsmittel und Gerätschaften verwendet. Daher erfolgt zunächst eine Beschreibung der am häufigsten eingesetzten Substanzen und Laborgeräten, die in den Versuchsreihen der Arbeit wiederzufinden sind.

#### 3.1 Verwendete Stoffe und Chemikalien

##### 3.1.1 Fischöl

Bei dem Fischöl handelte sich um ein Lachsöl der Firma C.E. Instruments, das sowohl ALA, EPA als auch DHA enthält. Es wurde dicht verschlossen in einer Glasflasche im Kühlschrank aufbewahrt. Tabelle 8 zeigt die vom Hersteller zur Verfügung gestellten Analyseergebnisse der Fettsäureanteile am Gesamtfettsäuregehalt. Die Anteile sind in Area% angegeben. Zum Vergleich mit den Versuchsergebnissen wurden diese den Massenprozent (m%) gleichgesetzt. Die drei Omega-3-Fettsäuren ALA, EPA und DHA sind in der Tabelle farblich gekennzeichnet. Es wird angenommen, dass neben Triglyceriden auch noch freie Fettsäuren in dem Öl enthalten waren.

Tabelle 8: Anteil der Fettsäuren am Gesamtfettsäuregehalt im Fischöl lt. Hersteller

Anteil der Fettsäuren am Gesamtfettsäuregehalt im Fischöl		
Myristinsäure (C14:0)	Area %	5,51
C15:0	Area %	0,35
Palmitinsäure (C16:0)	Area %	13,44
Palmitoleinsäure(C16:1)	Area %	7,72
Margarinsäure (C17:0)	Area %	1,12
C17:1	Area %	0,92
Stearinsäure (C18:0)	Area %	3,17
Ölsäure (C18:1)	Area %	18,65
C18:1 iso	Area %	2,58
Linolsäure (C18:2)	Area %	7,63
Linolensäure (C18:3) ALA	Area %	1,85
C18:4	Area %	1,39
Arachinsäure (C20:0)	Area %	0,52
Gadoleinsäure (C20:1)	Area %	0,2
C20:2	Area %	0,03
Arachidonsäure (C20:4)	Area %	3,01
C22:0	Area %	1,40
Eicosapentaensäure (C20:5) EPA	Area %	8,96
Erucasäure (C22:1)	Area %	2,75
Lignoserinsäure (C24:0)	Area %	0,64
C24:1	Area %	0,16
Clupanodonsäure (C22:5)	Area %	3,84
Docosahexaensäure (C22:6) DHA	Area %	7,01

### 3.1.2 Algenbiomasse

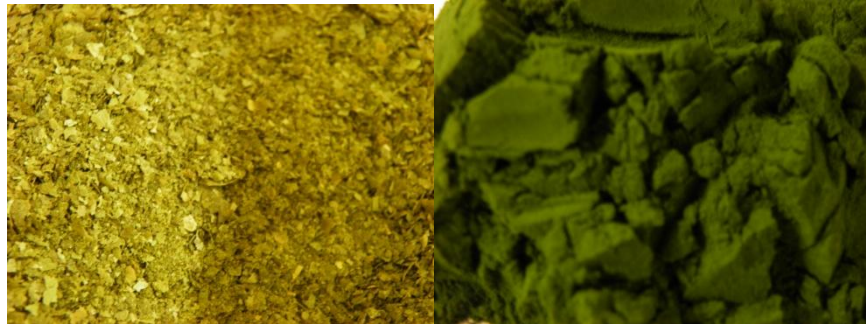
Bei der Algenbiomasse handelte es sich um Mikroalgen des Typs *Chlorella vulgaris* in getrockneter Form. Ein Teil der Biomasse war zuvor bereits für Extraktionsversuche verwendet worden und enthielt aus diesem Grund keine Lipide mehr. Diese Biomasse wurde zur Imprägnierung mit Fischöl verwendet.

Unbehandelte Mikroalgenbiomasse diente als Ausgangsmaterial im letzten Teil der Versuche, bei denen es darum ging, die Fettsäuren aus den Mikroalgen zu extrahieren.

Die Mikroalge *Chlorella vulgaris* ist eine einzellige, kugelförmige und unbegeißelte Grünalge, die vorwiegend in Süßwasser gedeiht und einen Durchmesser von 2,5 bis 12 µm aufweist. Sie enthält viel Chlorophyll, Aminosäuren, Nukleinsäuren, Enzyme, Fette, Ballaststoffe, Mineralien wie Magnesium und Calcium und Vitamine der Gruppen A, B und C. Außerdem sind ihre Lipide reich an ungesättigten Fettsäuren. [22]

Die Mikroalgenbiomasse stammte von der Firma Necton S.A. Die Dichte ist 0,5 bis 0,8 g/ml. Sie besitzt einen Fettanteil von acht bis 13 Massenprozent und enthält die Omega-3-Fettsäuren  $\alpha$ -Linolensäure (ALA). EPA und DHA sind hingegen nicht in der Alge enthalten.

In Abbildung 18 ist die Biomasse, bei der die Lipide mit Methanol und Ethanol extrahiert worden waren (links) und Biomasse vor der Extraktion (rechts) nebeneinander zu



**Abbildung 18: Algenbiomasse Chlorella vulgaris (links: Lipide wurden bereits extrahiert, rechts: Lipide sind noch enthalten)**

sehen. Man erkennt, dass durch die Extraktion neben den Lipiden auch das Chlorophyll herausgelöst wurde und die Alge ihre charakteristisch grüne Färbung verloren hat.

Der Anteil der verschiedenen Fettsäuren in den Lipiden bezogen auf die Gesamtmasse der Mikroalge ist in der Tabelle 9 ersichtlich. Diese Angaben wurden vom Hersteller zur Verfügung gestellt. Das Sicherheitsdatenblatt, die genaue Produktspezifikation sowie die Zusammensetzung von Vitaminen, Carotinoide und Aminosäuren sind dem Anhang zu entnehmen.

**Tabelle 9 Anteil der Fettsäuren am Gesamtfettsäuregehalt in der Chlorella lt. Hersteller**

Anteil der Fettsäuren am Gesamtfettsäuregehalt in der Chlorella vulgaris		
Myristinsäure (C14:0)	m%	0,04
Palmitinsäure (C16:0)	m%	1,9
Palmitoleinsäure (C16:1)	m%	0,68
Stearinsäure (C18:0)	m%	0,1
Ölsäure (C18:1)	m%	2,23
Linolsäure (C18:2)	m%	0,65
Linolensäure (C18:3)	m%	3,14

### 3.1.3 Lösungsmittel

Als Lösungsmittel wurden die polaren Alkohole Methanol, Ethanol, Isopropanol und die unpolaren Substanzen Aceton und n-Hexan eingesetzt. Tabelle 10 fasst die wichtigsten Eigenschaften und Stoffwerte der Lösungsmittel zusammen.

Tabelle 10: Eigenschaften und Stoffwerte verwendeter Lösungsmittel [23]

Stoff	Summenformel	Molare Masse [g/mol]	Dichte bei 20°C [g/cm <sup>3</sup> ]	Siedepunkt bei 1,013 bar [°C]	Schmelzpunkt bei 1,013 bar [°C]	Eigenschaften
Methanol	CH <sub>3</sub> OH	32,0	0,79	65	-98	Farblose, entzündliche, leicht flüchtige Flüssigkeit
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46,1	0,79	78	-114	Farblose, leicht entzündliche Flüssigkeit
Isopropanol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	60,1	0,78	82	-88	Farblose, leicht entzündliche Flüssigkeit
Aceton	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	58,1	0,79	56	-95	Farblose, entzündliche Flüssigkeit
n-Hexan	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	86,2	0,66	69	-95	Farblose, flüchtige, entzündliche Flüssigkeit

## 3.2 Geräte und Apparaturen

### 3.2.1 Rotationsverdampfer



Abbildung 19: Rotationsverdampfer

Für das Verdampfen des Lösungsmittels wurde ein Rotationsverdampfer der Firma Janke&Kunkel verwendet (Abbildung 19). Die genaue Bezeichnung des Modells lautet IKA RV 05-ST. Der Rotationsverdampfer besteht aus einem Wasserbad (1), einem Dampfrohr (2) mit Normschliff (NS 29/32), einem Auffangkolben (3) und einem Rückkühler (4). Die einzudampfende Extraktionslösung wird in einen vakuumfesten Rundhalskolben (5) gefüllt und über den Normschliff mit dem Dampfrohr verbunden. Über einen Anschluss am oberen Ende des Kühlers wird mit Hilfe einer Membran-Vakuumpumpe ein Vakuum angelegt, das den Rundkolben, den Auffangkolben und den Kühler umfasst. Durch den



Unterdruck wird der Siedepunkt gesenkt, so dass auch höher siedende Lösungsmittel abgetrennt werden können. Der Kolben mit dem einzudampfenden Gemisch wird in das elektrisch beheizte Wasserbad gesenkt und in Rotation versetzt. Die Flüssigkeit wird vom Wasser von außen gleichmäßig erhitzt, bis das Lösungsmittel verdampft. Anschließend wird es am Kühler wiederum kondensiert, im Auffangkolben gesammelt und nach Beenden des Versuchs entsorgt.

Die Leistung des Rotationsverdampfers wird von mehreren Faktoren wie der Wasserbadtemperatur, der Rotationsgeschwindigkeit, der Rundkolbengröße und dem vorliegenden Druck bestimmt. Die Evaporation des Lösungsmittels während der Versuche wurde bei einem reduzierten Druck von 200 bis 300 mbar durchgeführt.

### 3.2.2 Membran-Vakuumpumpe

Bei der Membran-Vakuumpumpe handelt es sich um ein Modell der Firma Vacuubrand, Typ MZ 2C mit einem maximalen Saugvermögen von 1,7 m<sup>3</sup>/h. An die Pumpe angeschlossen ist ein Vakuumregler, mit dem sich der im Rotationsverdampfer gewünschte Druck regulieren und ablesen lässt.

### 3.2.3 Filternutsche

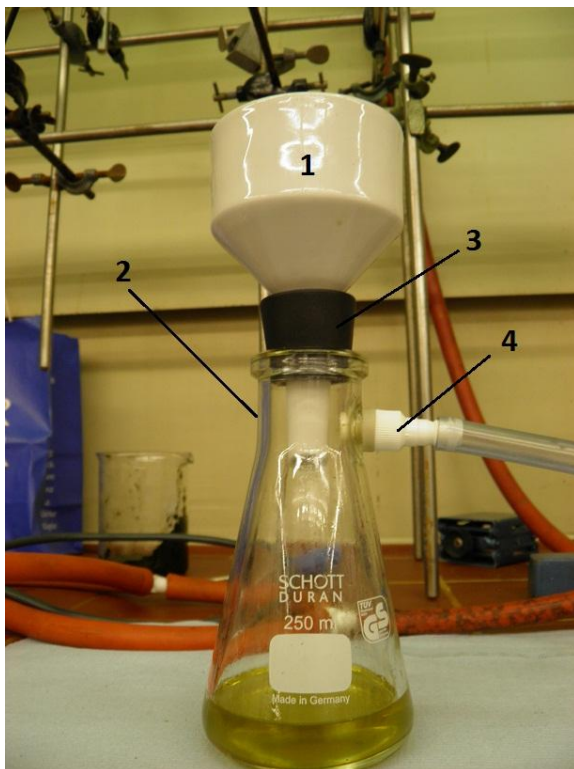


Abbildung 20: Filternutsche

Um Feststoffe aus der Lösung bei den Versuchen mit Mikroalgenbiomasse abzutrennen, wird sie einer Filtration unterworfen, die mit Hilfe einer aus Porzellan gefertigten Filternutsche (1) durchgeführt wird. Die Nutsche wird mit Filterpapier ausgelegt, auf eine Saugflasche (2) aufgesetzt und mit einem Dichtring aus Naturkautschuk (3) abgedichtet, siehe Abbildung 20. Die Druckflasche wird über ihren Schlauchanschluss (4) und einen Gummischlauch mit der Membran-Vakuumpumpe verbunden und das Lösungsmittel vom Feststoff unter Vakuum abfiltriert. Die Flüssigkeit gelangt in die Saugflasche, während der Feststoff auf dem

Filterpapier zurückbleibt und sich ein Filterkuchen aufbaut.

Als Filterpapier wurde ein Produkt der Firma Macherey-Nagel (MN) des Types 640 m mit einem Durchmesser von 15 cm verwendet. Es hat ein Rückhaltevermögen von 4 bis 8  $\mu\text{m}$ .

Bei der Filternutsche wurden zwei verschiedene Typen verwendet, je nachdem ob nur das überstehende Lösungsmittel abdekantiert oder die ganze Biomasse auf dem Trichter platziert wurde. Beide stammten von der Firma Haldenwanger, Typ 127, unterschieden sich aber in ihrer Größe. So hatte die kleinere Nutsche eine Nennggröße von 70 mm und einen Schaleninhalt von ca. 135 ml, die größere Ausführung eine Nennggröße von 110 mm und ca. 585 ml Schaleninhalt.

### 3.3 Versuche mit Fischöl

In dieser Versuchsreihe sollte die Stabilität der Fettsäuren gegenüber Oxidation durch Luftsauerstoff untersucht werden. Dafür wurden Versuche unter atmosphärischen Bedingungen und unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente das Lachsöl.

#### 3.3.1 Vorversuche

In einer Reihe von Vorversuchen wurde die Phasentrennung von Fischöl mit verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Dafür wurden Fischöl und ein Lösungsmittel in unterschiedlichen Volumenverhältnissen in verschließbaren Glasgefäßen mit 30 ml Fassungsvermögen gemischt, geschüttelt und bis zur Phasentrennung so belassen. Folgende Verhältnisse wurden gewählt:

<b>Fischöl: Lösungsmittel (v%:v%)</b>	1:2
	1:1
	2:1

Mit den Lösungsmitteln Ethanol, Methanol und Isopropanol sowie mit Essigsäure tritt eine Phasentrennung für jedes Mischungsverhältnis auf. Als Lösungsmittel für die nachfolgenden Versuche wurden die drei Alkohole gewählt.



### 3.3.2 Versuchsanlage

Die Extraktion der Fettsäuren aus dem Öl wurde mit demselben Lösungsmittel einmal bei Umgebungsbedingungen und einmal unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Aus diesem Grund unterschieden sich auch die Versuchsanlagen im Aufbau. Das Vorgehen nach der Extraktion war bei allen Versuchen gleich.

Die Extraktion mit Kontakt zu Luftsauerstoff wurde in einem 500 ml-Becherglas durchgeführt. Die Substanzen wurden intensiv mit einem Magnetrührer durchmischt.

Der Aufbau der Anlage für die Versuche unter Stickstoffatmosphäre ist in Abbildung 21 zu sehen. Während der Versuchsdurchführung wurde der Stickstoff unter Normaldruck aus einer Vorratsflasche über eine Leitung mit Hilfe einer gläsernen Fritte in den Dreihalskolben geleitet. Diesem war eine Gaswaschflasche vorgeschaltet.

Die Fritte wurde in den mittleren Hals des Kolbens gesteckt, während sich in einem Hals ein Überglucker befand, der zum Druckausgleich diente. Der dritte Hals wurde mit einem Stopfen verschlossen.

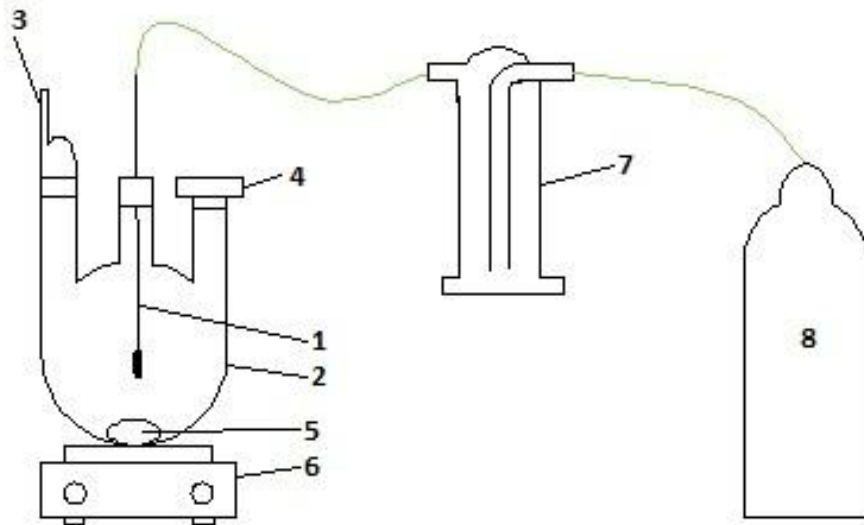


Abbildung 21: Versuchsaufbau zu Stabilitätsuntersuchung von Omega-3-Fettsäuren bei sauerstoffreduzierter Versuchsatmosphäre

- 1 Fritte
- 2 Dreihalskolben
- 3 Überglucker
- 4 Stopfen
- 5 Rührei
- 6 Rührer
- 7 Gaswaschflasche
- 8 Gasflasche mit Stickstoff

### 3.3.3 Versuchsdurchführung

Der erste Schritt bestand aus der Extraktion der im Fischöl vorliegenden Fettsäuren mit dem jeweiligen Lösungsmittel. Dafür wurde ein Volumenverhältnis von 1:2 (Fischöl:Lösungsmittel) gewählt, wobei der Volumenteil 160 ml betrug. Für die Angabe der genauen Einwaagen für alle Versuche, auch jener mit *Chlorella vulgaris* und der mit Fischöl imprägnierten Biomasse, sei auf die Tabellen im Anhang verwiesen. Die beiden Komponenten wurden je nach Versuch entweder in einem Becherglas oder einem Dreihalskolben mit einem Magnetrührer für eine Stunde intensiv durchmischt und danach in einen Scheidetrichter umgefüllt. Nach der Phasentrennung, siehe Abbildung 22, wurde die untere, ölige Phase abgelassen. Die mit Fettsäuren angereicherte Lösungsmittelphase wurde in einen Rundhalskolben gefüllt,



Abbildung 22: Phasentrennung von Fischöl und Lösungsmittel

gewogen und anschließend im Rotationsverdampfer unter Vakuum eingedampft, bis kein Lösungsmittel mehr rückgewonnen werden konnte. Das Wasserbad wurde bis auf max. 72°C erhitzt, da zu hohe Temperaturen die Oxidation und somit die Zersetzung der Fettsäuren begünstigen. [13]

Die Proben wurden am Institut für Organische Chemie an der Karl-Franzens-Universität in Graz auf die Zusammenstellung ihrer Fettsäuren untersucht. Man spricht von einem sogenannten Fettsäuremuster, welches nach C-VI 11a (98) nach den DGF-Einheitmethoden erstellt wurde. Dabei werden die Proben erst verseift und die Seifen danach durch die Zugabe eines Methanol/Bostrifluorid-Komplexes in

Methylester übergeführt. Diese können mit Hilfe des Gaschromatographen, der HPLC oder der IR-Spektroskopie bestimmt werden.

### 3.4 Löslichkeitsversuche von Fischöl mit Algenbiomasse

In dieser Versuchsreihe wurde das Desorptions- und Löslichkeitsverhalten von Lachsöl untersucht. Es wurde in mehreren Schritten vorgegangen. Ausgangsmaterial war immer Mikroalgenbiomasse, die keine Lipide mehr enthielt und mit dem Lachsöl imprägniert wurde. Dieses wurde später mit Hilfe eines Lösungsmittels wieder desorbiert. Zunächst wurden die Versuche mit Methanol, Ethanol, Isopropanol, Aceton und n-Hexan als Lösungsmittel durchgeführt, das Effektivste davon ausgewählt und danach der Einfluss der Verweilzeit untersucht und die Mengenkonzentration an Fischöl zu Beginn verändert.

#### 3.4.1 Wahl des geeigneten Lösungsmittels

Im ersten Teil war das Ziel, ein Lösungsmittel auszuwählen, das das Fischöl möglichst effektiv von der Biomasse löst.

Dafür wurden je Versuch 40 Gramm Algenbiomasse mit 8 Gramm Öl in gläsernen Schottflaschen mit Hilfe eines Spatels gut vermischt und für 24 Stunden verschlossen aufbewahrt. Danach wurden Biomasse und Öl in Erlenmeyerkolben oder Bechergläser umgefüllt, das Lösungsmittel zugeführt und das Gemisch für eine Stunde auf einer Rührplatte durchmischt. Danach wurde die Lösung mit Hilfe der Filternutsche unter Vakuum

abfiltriert. Dabei wurde die überstehende Flüssigkeit aus dem Kolben dekantiert, bis die zurückbleibende Biomasse zwar noch feucht vom Lösungsmittel war, sich jedoch nichts mehr abgießen ließ.

Das auf diesem Weg erhaltene grünliche Filtrat wurde evaporiert und die zurückbleibende Ölmenge zunächst gravimetrisch bestimmt und ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht. Die Wasserbadtemperatur betrug, abhängig vom Siedepunkt des Lösungsmittels, zwischen 50 und 72°C.

### 3.4.2 Einfluss der Versuchsdauer

Nachdem n-Hexan als Extraktionsmittel für die Versuche festgelegt worden war, wurde der Einfluss der Versuchsdauer untersucht. Dafür wurden Zeiträume von 30 Minuten bis zu acht Stunden für die Extraktion gewählt und es wurde stets auf dieselbe Art und Weise verfahren wie bei der Wahl des geeigneten Lösungsmittels. Die Temperatur des Wasserbades betrug beim Evaporieren 60°C.

### 3.4.3 Nachspülversuche

In drei weiteren Versuchen wurde untersucht, ob es durch Nachspülen des Filterkuchens möglich ist, das restliche Öl von der Biomasse zu lösen. Es wurde davon ausgegangen, dass das nach der Filtration noch mit Öl angereichertes Lösungsmittel in den Poren der Biomasse verbleibt. Durch das Nachspülen mit frischem Lösungsmittel soll dieses nun aus den Poren verdrängt werden. Bei diesen Versuchen wurde eine größere Nutsche gewählt, so dass die gesamte Biomasse filtriert werden konnte. Danach wurde der sich in der Nutsche befindende Filterkuchen mit 80 ml frischem Lösungsmittel bedeckt und wiederum abgenutscht. Das dadurch erhaltene Filtrat wurde erneut abgewogen und eingedampft. Dieses Vorgehen wurde insgesamt bis zu fünf Mal wiederholt, bis angenommen werden konnte, dass sich kein beladenes Lösungsmittel mehr im Filterkuchen befindet.

### 3.4.4 Variation der Ölmenge

Im letzten Teil der Versuchsreihe wurde die Ölmenge, mit der die Biomasse imprägniert wurde, variiert. Dafür wurden je 40 Gramm Biomasse mit sechs, zehn oder zwölf Gramm Öl vermischt.

Die Vorgehensweise war dieselbe wie bei den Nachspülversuchen.

### 3.5 Versuche mit *Chlorella Vulgaris*

Nachdem die oben beschriebenen Versuchsreihen abgeschlossen waren, konnte mit den Versuchen mit der Mikroalgenbiomasse gestartet werden. Ausgangsmaterial war dieses Mal die Mikroalge *Chlorella vulgaris*, die in getrockneter Form vorlag und noch sämtliche Lipide und Wertstoffe enthält.

Es wurden wiederum verschiedene Versuchsreihen durchgeführt. Die Algenbiomasse wurde mit Hilfe eines Magnetrührers in Erlenmeyerkolben durchmischt. Die Soxhlet-Extraktion wäre eine mögliche Extraktionsalternative gewesen, allerdings hat eine Studie [24] gezeigt, dass die Lipidmenge, die durch Rühren aus der Biomasse extrahiert werden kann, höher ist als bei der Soxhlet-Extraktion, wenn Methanol als Lösungsmittel eingesetzt wird. Bei n-Hexan ist dies zwar nicht der Fall, jedoch ist die Implementierung einer Soxhlet-Apparatur in eine großtechnische Anlage sehr aufwendig und energieintensiv. Außerdem wurde durch eine weitere Studie gezeigt, dass in den gelösten Lipiden bei der Soxhlet-Extraktion weniger PUFA enthalten sind auf Grund der ständigen Temperaturbelastung durch die wiederholte Destillation. [20,24]

#### 3.5.1 Wahl des geeigneten Extraktionsmittels

Wiederum bestand der erste Teil darin, das effektivste Lösungsmittel für die Extraktion der Lipide aus der Biomasse zu finden. Für die Versuche wurden Methanol, Isopropanol und n-Hexan in unverdünnter Form oder in Kombination miteinander verwendet. Das Volumenverhältnis wurde mit 3:2 (Alkohol:n-Hexan v/v) gewählt.

20 g Biomasse wurden mit 100 ml des Lösungsmittels für eine Stunde in einem Erlenmeyerkolben mit einem Magnetrührer durchmischt und die Feststoffe anschließend aus der Lösung abgenutscht. Das Lösungsmittel wurde bei einer maximalen Wasserbadtemperatur von 72°C eingedampft und die verbleibende Masse wurde gewogen. Bei genügend Extrakt wurde ein Fettsäuremuster von den Proben erstellt.

Es wird angenommen, dass der Fettanteil in der *Chlorella vulgaris* etwa zehn Prozent des Gesamtgewichts der Trockenmasse ausmacht. Unter Annahme einer vollständigen Extraktion waren demnach bei 20 Gramm Biomasse etwa zwei Gramm an Lipiden zu erwarten.

### 3.5.2 Einfluss der Versuchsdauer

Auch die Dauer der Extraktion wurde untersucht. Die Versuche wurden mit denselben Mengen in gleicher Art und Weise wie bei dem Lösungsmittelscreening mit Extraktionszeiten bis zu vier Stunden durchgeführt.

### 3.5.3 Die firmeninterne Rezeptur der BDI-BioEnergy International AG

Bereits gut erforscht und bewährt ist der Einsatz eines Gemisches aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 (v/v) bei der Extraktion von Algenlipiden, da sowohl polare als auch unpolare Bestandteile herausgelöst werden können. Die Anwendung dieser Lösungsmittelmischung ist als Verfahren nach Bligh und Dyer bekannt. Der große Nachteil ist allerdings, dass es sich bei Chloroform um ein Gift handelt, weshalb sein Einsatz heute möglichst umgangen und bei der Gewinnung von konsumierbaren Produkten gänzlich vermieden wird. [20,25] Dennoch sollte die Effizienz dieser Lösungsmittelmischung in dieser Arbeit näher betrachtet werden, allerdings mit einer Erweiterung. Eine firmeninterne Rezeptur der BDI-BioEnergy International AG ändert die Mischverhältnisse und erweitert das Gemisch um eine dritte Komponente.

Es wurden insgesamt drei Versuche mit der firmeninternen Rezeptur durchgeführt. Einmal mit 20 g Chlorella und 100 ml Lösungsmittelgemisch, einmal mit 50 g bzw. 250 ml und einmal mit 100 g und 500 ml. Dieses Vorgehen diente in erster Linie dazu, die Reproduzierbarkeit der Versuche zu untersuchen.

Die Algenbiomasse wurde wiederum in einem Erlenmeyerkolben einer Extraktion unterworfen und anschließend filtriert. Die Lösungsmittel wurden mit Hilfe des Evaporators abgezogen (siehe Abbildung 23) und die Proben auf die Zusammensetzung ihrer Fettsäuren untersucht.



Abbildung 23: Evaporationsvorgang

### 3.5.4 In Situ-Umesterung

Bei der In Situ-Umesterung werden im Grunde zwei Prozessschritte zu einem zusammengezogen. Statt die Lipide erst zu extrahieren und danach umzuestern, erfolgt die Extraktion und Umesterung in einem Schritt.

Die Mengen an Methanol, Biomasse und Katalysator wurden auf Grund vorliegender Literatur gewählt [21,24,26,27]. Es wird angenommen, dass aus der Chlorella nicht wie zuvor angenommen idealerweise zehn Prozent, sondern nur fünf Prozent der Masse davon tatsächlich extrahiert und umgeestert werden können. Bei 100 g Biomasse wären das fünf Gramm.

Die Menge an eingesetztem Methanol betrug insgesamt 300 ml. Wenn angenommen wird, dass das molekulare Gewicht der Chlorella 880 g/mol ist, bedeutet das einen molaren Überschuss von Methanol zu Biomasse von 27,5:1. [21,24]. Als Katalysator wird häufig Schwefelsäure verwendet, allerdings wird in dieser Arbeit Salzsäure als Katalysator bevorzugt, da zuvor durchgeführte Versuche gezeigt hatten, dass diese viel effektiver im Bezug auf die Umesterung ist. Außerdem besitzt sie den Vorteil, dass sie nicht oxidierend wirkt, was im Hinblick auf die Oxidationsanfälligkeit der Fettsäuren sehr wünschenswert ist [27]. Da ein hoher Wassergehalt das Ergebnis negativ beeinflusst [21], Salzsäure aber nur in wässrigen Lösungen mit maximal 37 Prozent erhältlich ist, wurde eine Salzsäurelösung vor dem eigentlichen Versuchsbeginn separat hergestellt. Als Ausgangskomponenten dienten Methanol und Acetylchlorid (Essigsäurechlorid), eine farblose und ätzende Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 50,9°C. [21] Werden diese Substanzen vermischt, reagieren sie zu Essigsäuremethylester und Salzsäure, siehe Abbildung 23. [27]

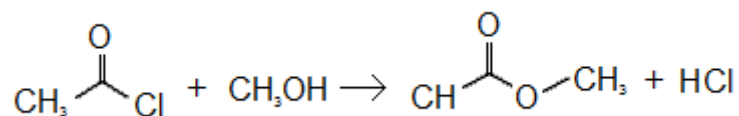


Abbildung 24: Reaktion von Methanol und Acetylchlorid

Die Reaktion ist stark exotherm und wird im Eisbad durchgeführt. 24,56 g (29,4 ml) Acetylchlorid und 150 ml des Methanols wurden unter Rühren langsam vermischt, so dass eine Salzsäurelösung entsteht.



Diese wurde langsam zu der abgewogenen Biomasse in einen 500 ml-Rundkolben gegossen und mit dem restlichen Methanol aufgefüllt. Auf den Rundkolbenhals wurde ein Rückflusskühler aufgesetzt und die Reaktion konnte für vier Stunden bei 40°C in einem Ölbad ablaufen. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 25 zu erkennen.

Danach wurden die festen Bestandteile der Biomasse wiederum durch Filtration abgetrennt und die Lösung mit Kaliumcarbonat neutralisiert. Pro Mol Acetylchlorid wurde ein halbes Mol und zusätzlich 20% Kaliumcarbonat gerechnet. Das entspricht in dem Fall 25,87 g Kaliumcarbonat. Dieses liegt als Feststoff vor und wurde vor der Zugabe zur Lösung separat in Wasser gelöst.

Das Filtrat wurde in einen Schütteltrichter umgefüllt und einige Stunden stehen gelassen. Die Lösung wurde dann noch einmal aufgeschüttelt, in zwei etwa gleich große Teile geteilt und beim ersten Teil das Methanol eingedampft. Der zweite Teil wurde mit n-Hexan in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) ausgeschüttelt, wodurch die unpolaren Ester, die bei der Umesterung entstanden sind, in das n-Hexan übergehen sollten.

Das Gemisch wurde wiederum in einen Schütteltrichter gefüllt und über Nacht stehen gelassen. Die eintretende Phasentrennung war nur schwer mit freiem Auge erkennbar, konnte aber mittels Bestrahlen mit einer Taschenlampe festgestellt werden. Wiederum wurden die Phasen getrennt und danach erst das Methanol und dann das n-Hexan aus den jeweiligen Phasen abgezogen.

Der gleiche Versuch wurde ein zweites Mal durchgeführt, allerdings wurde dabei die Katalysatormenge von 24,6 auf 32,3 g erhöht und auf das Durchmischen während der Extraktion und eine nachfolgende Neutralisation verzichtet.

Es wurde auch ein Versuch mit einem basischen Katalysator durchgeführt. Dabei wurden 40 g der Mikroalgen, 250 ml Methanol und 13 g Natriummethanolat miteinander unter Rühren in einem Erlenmeyerkolben für eine Stunde vermischt und wiederum in zwei Teile geteilt, von denen der erste eingedampft wurde, während der zweite mit n-Hexan im Volumenverhältnis 1:1 geschüttelt und die Phasentrennung abgewartet wurde. Danach wurden beiden Phasen separat eingedampft.



Abbildung 25: Versuchsaufbau bei der In Situ-Umesterung



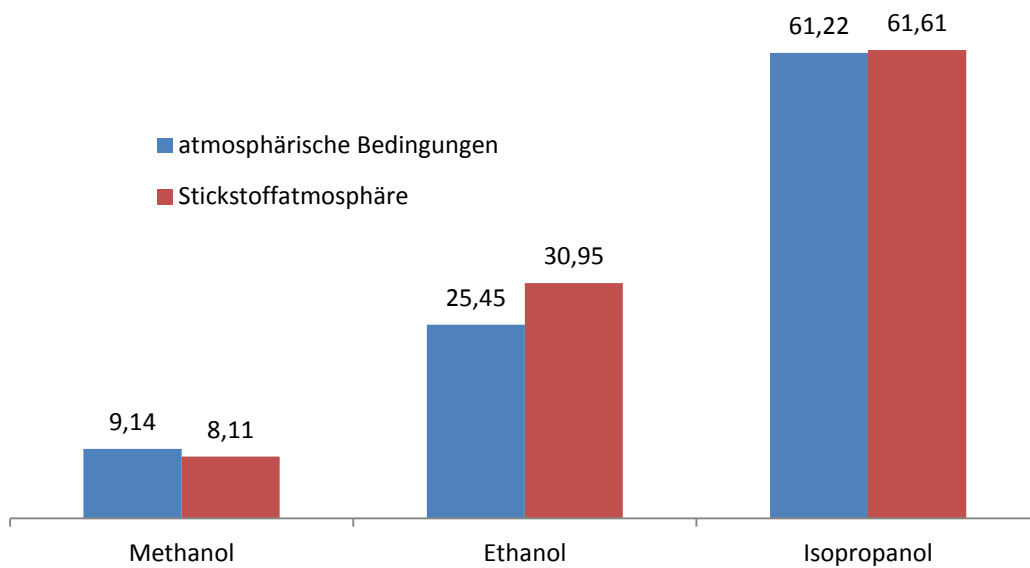
## 4 Ergebnisse und Diskussion

Auch die Ergebnisse werden abhängig vom Ausgangsmaterial wie bei der Durchführung in drei Gruppen zusammengefasst und diskutiert.

### 4.1 Stabilitätsversuche mit Fischöl

Das Ziel dieser Versuchsreihe war es herauszufinden, ob der Sauerstoffanteil in der Atmosphäre, die während der Extraktion vorherrscht, Einfluss auf den Gehalt an Omega-3-Fettsäuren im Extrakt zeigt. In den theoretischen Grundlagen wurde bereits auf die Anfälligkeit der langkettigen, ungesättigten Fettsäuren für Oxidation eingegangen. Es wurde untersucht, ob eine Versuchsführung unter Stickstoffatmosphäre zu einem höheren Anteil an ALA, EPA und DHA in den Proben führt.

Als erster Punkt kann festgehalten werden, dass der Luftsauerstoff die Phasentrennung im Scheidetrichter nach der Extraktion in keiner Weise beeinflusst. Sowohl bei Methanol, Ethanol und Isopropanol war die mit Fettsäuren angereicherte Lösungsmittelphase bei beiden Versuchsführungen gleich. Dasselbe Bild ergab sich nach dem Evaporieren des Lösungsmittels. Es wurde festgestellt, dass Isopropanol am meisten Lachsöl aufgenommen hatte, gefolgt von Ethanol und zum Schluss Methanol. Diese Tatsache ist mit der Hilfe der elutropen Reihe erklärbar, die Methanol als das am meisten polare Lösungsmittel ausweist. Die Fettsäuren liegen im Fischöl in gebundener Form jedoch hauptsächlich als Triglyceride und somit als unpolare Lipide vor, die sich mit steigender Polarität des Extraktionsmittels immer schlechter darin lösen lassen. In Abbildung 26 sind die Ölmengen in Gramm zu sehen, die nach dem Abziehen des Alkohols noch im Kolben verblieben.



**Abbildung 26: Fischölmenge, nachdem das Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, Isopropanol) abgezogen worden war (ausgehend von 148 Gramm Fischöl)**

Die Fettsäuremuster der Proben unterscheiden sich, trotz der unterschiedlichen Umgebungsbedingungen während der Extraktion, so gut wie gar nicht voneinander. Es kann festgehalten werden, dass der Sauerstoff in der Umgebung die Extraktion selbst nicht beeinflusste.

Tabelle 11 fasst den Anteil von ALA, EPA und DHA in Massenprozent an der Gesamtmasse zusammen. Der Gehalt an Fettsäuren ist bei allen drei Lösungsmitteln immer gleich hoch. Auffällig ist der wachsende Wert von EPA mit steigender Polarität des Lösungsmittels, während die Werte von ALA und DHA im Vergleich nur leicht steigen. So ist in den Proben aus der Extraktion mit Methanol mehr EPA enthalten als in den Proben mit Ethanol. Der niedrigste Gehalt an EPA ist bei der Verwendung von Isopropanol als Extraktionsmittel zu verzeichnen.

Tabelle 11: Fettsäuremuster von Fischöl bei Versuchsdurchführung unter Stickstoffatmosphäre und bei normalen Umgebungsbedingungen

Lösungsmittel	$\Sigma$ der gesättigten Fettsäuren [m%]	$\Sigma$ aller Fettsäuren [m%]	ALA 18:3w-3 [m%]	EPA 20:5w-3 [m%]	DHA 22:6w-3 [m%]
<b>Atmosphärische Bedingungen</b>					
Methanol	25,78	88,61	1,98	12,91	7,22
Ethanol	25	87,92	2,01	10,29	7,25
Isopropanol	24,21	88,36	1,96	9,15	7,55
<b>Stickstoffatmosphäre</b>					
Methanol	24,26	88,32	2	12,93	7,19
Ethanol	23,16	88,78	1,91	10,71	7,32
Isopropanol	23,96	88,7	1,91	8,98	7,3
Fischöl			1,85	8,96	7

## 4.2 Löslichkeitsversuche von Fischöl mit Algenbiomasse

Zunächst wurde das Öl durch das Vermischen mit der Biomasse an dessen Oberfläche adsorbiert. Das Herunterlösen durch ein Lösungsmittel kann im Grunde als eine Kombination aus Desorption und Extraktion betrachtet werden, bei der sich die Moleküle wieder von der Oberfläche der Mikroalgenbiomasse lösen müssen (=desorptiv), und von dem Lösungsmittel aufgenommen werden (=extraktiv).

### 4.2.1 Lösungsmittelscreening

Abbildung 27 zeigt das Ergebnis der gravimetrischen Bestimmung des Lösungsmittelscreenings nach der Evaporation des Lösungsmittels. Es ist zu erkennen, dass in n-Hexan mit 2,81 Gramm am meisten Öl gelöst wurde, am wenigsten in Methanol. Der Versuch mit Methanol wurde ein zweites Mal durchgeführt, wobei die Lösungsmittelmenge von 150 ml auf 200 ml erhöht wurde.

Auch dieses Ergebnis lässt sich mit der Polarität der Lösungsmittel erklären, denn die Menge des jeweils gelösten Ölanteils entspricht genau der Stellung des Lösungsmittels in der elutropen Reihe. So löst Methanol am wenigsten Öl, gefolgt von Ethanol, Isopropanol, Aceton und n-Hexan.

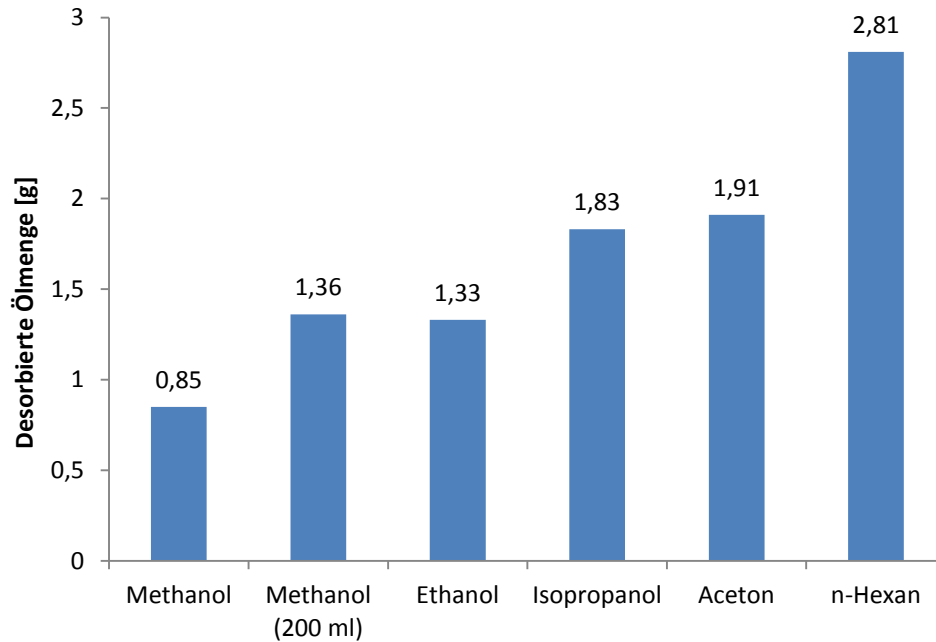


Abbildung 27: Desorbierte Ölmenge beim Lösungsmittelscreening für das Fischöl nach Abzug der verschiedenen Lösungsmittel

In Tabelle 12 sind die Fettsäuremuster der Proben zu sehen. Der Gehalt an ALA und EPA ist in Methanol sehr hoch, während DHA in kleineren Mengen vorhanden ist. Mit der Abnahme der Polarität sinkt der ALA- bzw. EPA- und steigt der DHA-Gehalt an. Das ist darauf zurückzuführen, dass sich die freien Fettsäuren, die auch im Fischöl vorhanden sind und in Form von Omega-3-Fettsäuren vorliegen können, mit zunehmender Kettenlänge immer schwerer in polaren Substanzen lösen. [6]

Genau wie bei den Stabilitätsversuchen mit Fischöl ist eine Anreicherung von EPA bei der Verwendung von Methanol als Lösungsmittel feststellbar. Auch der Gehalt von ALA ist in diesen Proben am höchsten. Weiter kann man sagen, dass Isopropanol, Aceton und n-Hexan in etwa das gleiche Fettsäuremuster aufweisen.

Aus der Tabelle ist zu erkennen, dass Isopropanol zwar den geringsten Anteil an ALA und den höchsten an DHA enthält, allerdings sind die Abweichungen im Verhältnis sehr gering. Unter Berücksichtigung, dass auch der Gehalt an gesättigten Fettsäuren in Isopropanol höher ist und der Tatsache, dass mit n-Hexan in Summe am meisten Öl wieder von den Mikroalgen gelöst werden konnte, wurde n-Hexan als Lösungsmittel für die weiteren Versuche gewählt.

Tabelle 12: Fettsäuremuster des gelösten Fischöls in diversen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	$\Sigma$ gesättigte Fettsäuren [m%]	$\Sigma$ aller Fettsäuren [m%]	ALA 18:3w-3 [m%]	EPA 20:5w-3 [m%]	DHA 22:6w-3 [m%]
Methanol	25,98	86,14	3,85	10,9	5,59
	25,12	85,38	4,18	9,98	5,82
Ethanol	23,75	86,44	2,27	9,4	7,1
Isopropanol	25,58	90,26	2,03	8,89	8,03
Aceton	22,38	88,08	2,13	8,97	7,83
n-Hexan	22,06	88,31	2,14	8,92	7,91
Fischöl			1,85	8,96	7

#### 4.2.2 Einfluss der Versuchsdauer

Abbildung 28 zeigt die Ölmenge nach dem Eindampfen des Lösungsmittels bei variierender Extraktionszeit. Man erkennt, dass bereits nach einer halben Stunde die Hälfte des Öls wieder von der Biomasse desorbiert wurde. In den folgenden Stunden wurde nur mehr wenig Öl wiedergewonnen, bis der Wert nach sechs Stunden bei etwa viereinhalb Gramm stagnierte. Man kann davon ausgehen, dass sich das Gleichgewicht zwischen den Phasen eingestellt hatte und das treibende Konzentrationsgefälle zwischen der Biomasse und dem Lösungsmittel ausgeglichen wurde.

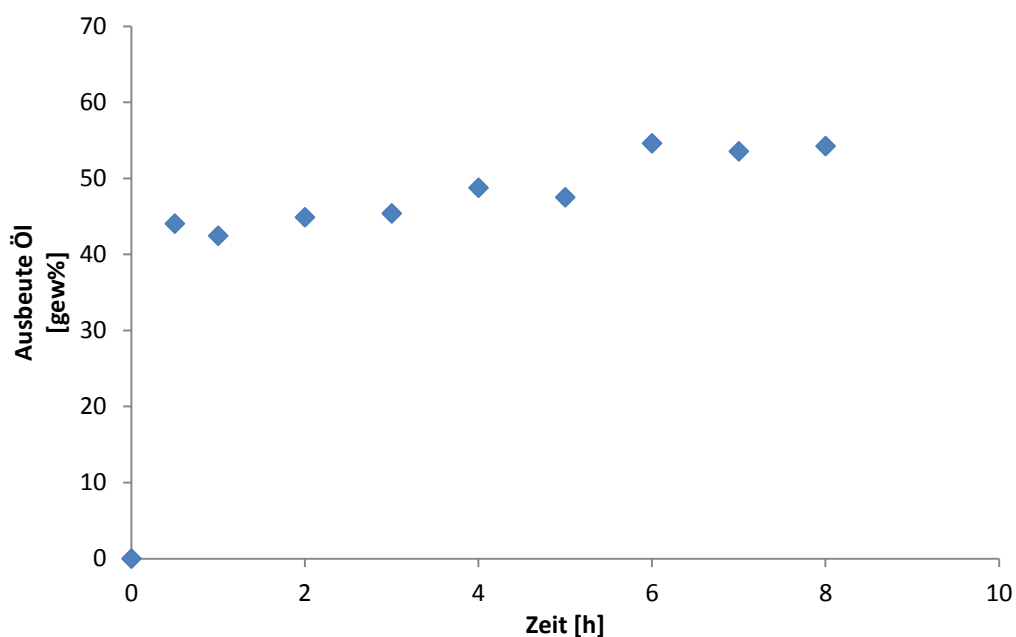


Abbildung 28: Einfluss der Zeit bei der Desorption von Fischöl mit n-Hexan auf die Ausbeute

### 4.2.3 Nachspülversuche

Trotz Abnutschen unter Vakuum wurde der Filterkuchen nie ganz trocken gesaugt, das heißt, es verblieben immer Lösungsmittel- bzw. Ölreste in der Biomasse.

Beim Nachspülen mit frischem Lösungsmittel, das die mit Öl angereicherte Flüssigkeit aus den Poren der Mikroalgen verdrängte, ergab sich folgendes Bild:

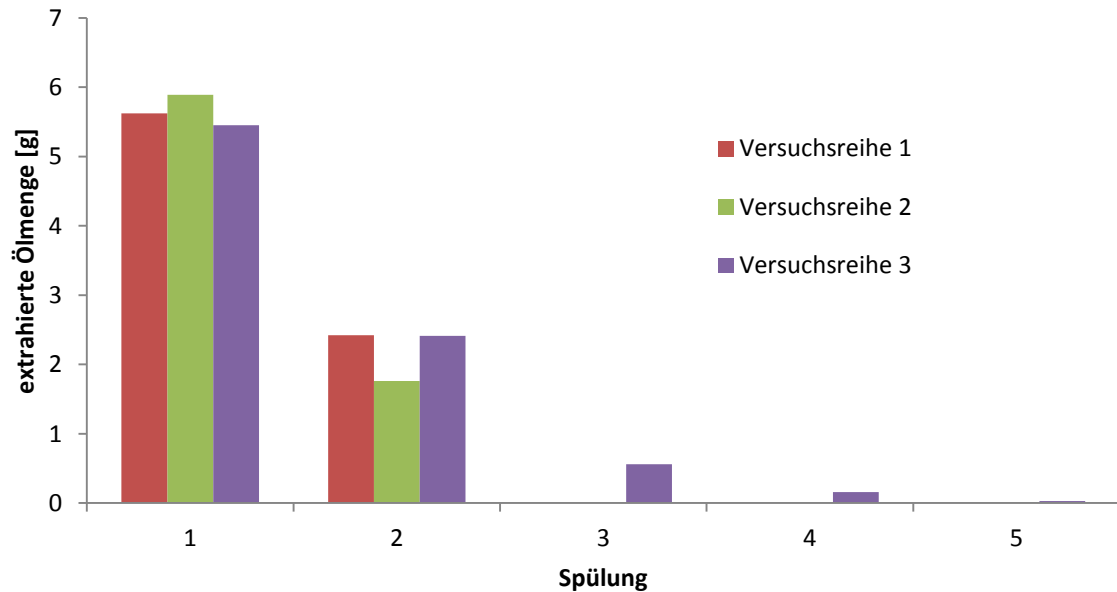


Abbildung 29: Erhaltene Ölmenge bei Nachspülung des Filterkuchens mit n-Hexan nach Abzug des Lösungsmittels

Man erkennt in Abbildung 29, dass bei Versuchsreihen eins und zwei einmal, bei der Versuchsreihe drei fünf Mal nachgespült wurde. Bereits nach vier Mal Spülen war das gesamte Öl von der Biomasse gelöst, so dass die Flüssigkeit, die nach der fünften Spülung vorlag, nur mehr n-Hexan enthielt. Dies wurde nachgewiesen indem die Lösung zur Gänze mit dem Evaporator eingedampft werden konnte.

Die Menge an Öl nach der ersten Spülung war bei den Versuchsreihen eins und drei beinahe identisch, bei Versuchsreihe zwei war sie etwas geringer. Dafür wurde bei dieser Versuchsreihe bereits nach der ersten Filtration und somit vor der ersten Spülung ein höherer Ölgehalt im Filtrat nachgewiesen. Diese Schwankung ist darauf zurückzuführen, dass der Filterkuchen bei dem manuell durchgeführten Prozess nicht immer gleichmäßig abgenutscht werden konnte und somit manchmal etwas mehr Öl am Filterkuchen verblieb. Dieses wurde dann aber mit der ersten Nachspülung gelöst, wodurch sich die zuvor entstandene Differenz aufwiegt. Das Ergebnis spiegelt auch die schwierige Reproduzierbarkeit der Versuche wider. Dadurch, dass die Versuche alle manuell und nie zu 100 Prozent gleich durchgeführt wurden, sind die Ergebnisse immer einer gewissen Schwankungsbreite unterworfen.

Die Abnahme des Ölgehalts mit steigender Anzahl der Spülungen war auch visuell ersichtlich. Wies das Extrakt nach der ersten und zweiten Filtration noch eine dunkelgrüne Färbung auf, war es nach dem letzten Spülvorgang klar.

#### 4.2.4 Variation der Ölmenge

Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der Versuche, bei denen die Ölmenge, mit der die Biomasse zu Beginn imprägniert wurde, variierte. Es hat sich gezeigt, dass mit zunehmender Ölmenge auch der Gehalt an gelöstem Öl steigt. Mit zunehmender Konzentration steigt auch das treibende Konzentrationsgefälle zwischen der Biomasse und dem unbeladenen Lösungsmittel. Dadurch steigt auch die Geschwindigkeit, mit der der Prozess abläuft und es kann mehr Öl im gleichen Zeitraum gelöst werden.

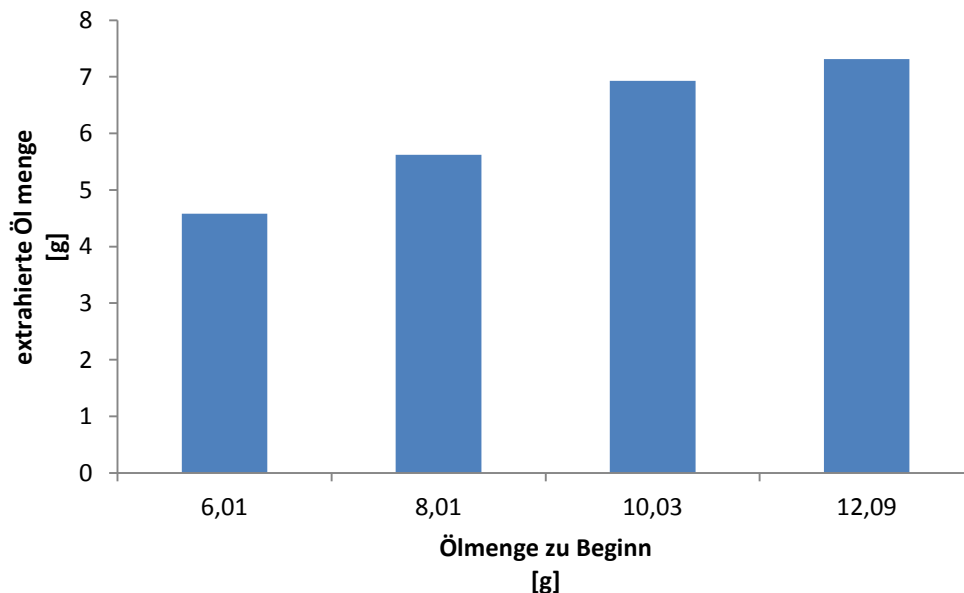


Abbildung 30: Desorbierte Ölmenge in Abhängigkeit der Ölmenge zu Beginn nach Abzug des Lösungsmittels

#### 4.3 Versuche mit *Chlorella vulgaris*

Der Gehalt an Lipiden in der vorliegenden Mikroalge wird mit einem Massenprozentanteil von acht bis 13% vom Gesamtgewicht vom Hersteller beschrieben. Als Mittelwert wird für die Berechnungen ein Anteil von zehn Prozent angenommen.

### 4.3.1 Lösungsmittelscreening

Ähnlich wie bei den Versuchen mit Fischöl wurde untersucht, welches Lösungsmittel am besten für die Extraktion von Lipiden aus der Mikroalge *Chlorella* geeignet ist. Das Ergebnis der Versuche sowie die genauen Werte in Gramm zeigt Abbildung 31.

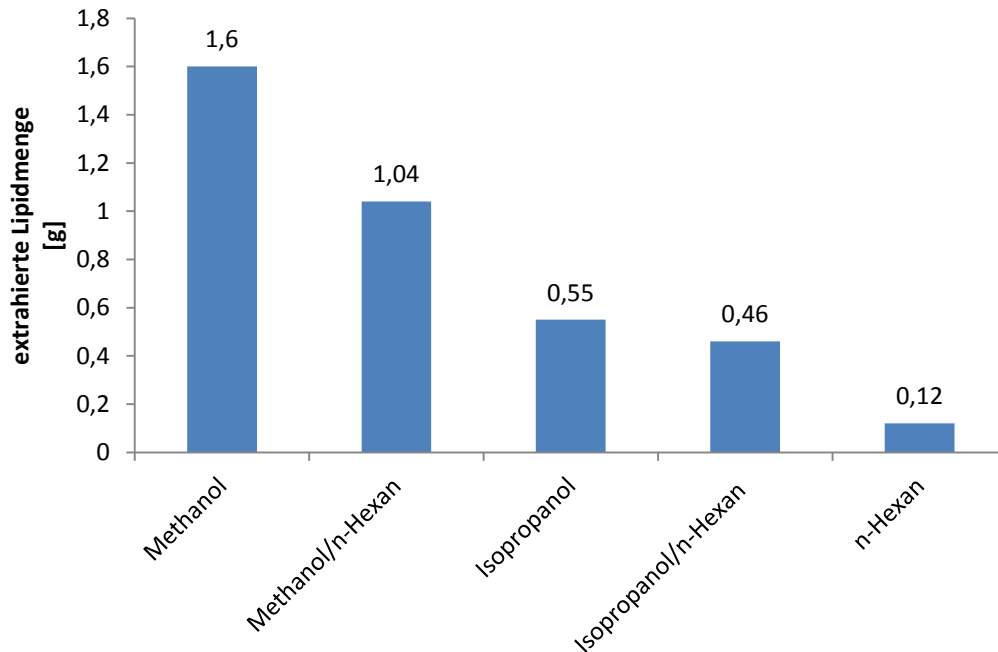


Abbildung 31: Extrahierte Lipidmenge nach Abzug des Lösungsmittels bei dem Lösungsmittelscreenings für *Chlorella vulgaris*

Man erkennt, dass bei der Verwendung von Methanol am meisten Substanz aus der Biomasse gelöst wurde. Das Extrakt, das nach dem Eindampfen übrig blieb, hatte eine dunkelgrüne Farbe und war von zäh-klebriger Konsistenz. Wurde n-Hexan eingesetzt, blieb beinahe nichts mehr übrig, weshalb die extrahierte Menge auch nur gravimetrisch bestimmt und nicht auf die Zusammensetzung analysiert werden konnte.

Demnach steigt das Lösungsvermögen mit der Polarität des Lösungsmittels und es kann daraus geschlossen werden, dass der Großteil der Lipide in der *Chlorella* in polarer Form vorliegt. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen aus vorherigen Studien. [24,28] Bei dem Einsatz von Isopropanol wurden weniger Lipide extrahiert als bei Methanol als Extraktionsmittel, da es in der elutropen Reihe weniger polar eingestuft ist.

Es liegt nahe, ein polares und ein unpolares Lösungsmittel miteinander zu kombinieren, um möglichst viele Lipide aus der Biomasse lösen zu können. Es hat sich gezeigt, dass unter Verwendung der Mischung von n-Hexan mit Methanol 1,04 g an Lipiden extrahiert werden konnten. Das entspricht einer Steigerung von beinahe 900% im Vergleich zur Extraktion mit unverdünntem n-Hexan, bei der nur 0,12 g an gelösten Lipiden vermerkt wurden. Die



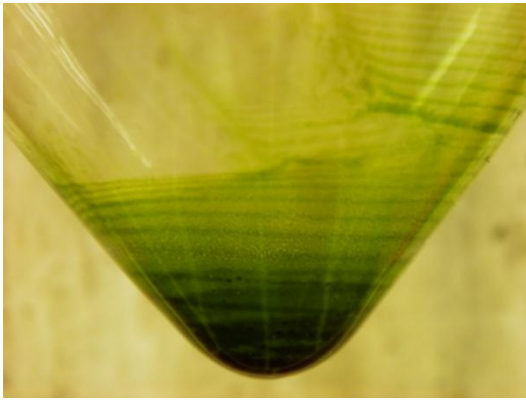


Abbildung 32: Glaskolben nach dem Evaporieren des Lösungsmittels (n-Hexan)

Kombination aus Isopropanol und n-Hexan brachte zum Vergleich eine Steigerung von etwa 400%.

Es konnten lediglich zwei Proben auf ihr Fettsäuremuster untersucht werden, da die Mengen aus den anderen Versuchen zu gering für eine Analyse waren. Tabelle 13 zeigt, dass sich der Anteil an ALA (in hellgrün gekennzeichnet) in diesen beiden Proben nur geringfügig unterscheidet. Diese Erkenntnis deckt sich auch

mit Ergebnissen aus der Literatur [24], bei denen mit unpolaren Lösungsmitteln in der Regel weniger Lipide gelöst werden konnten. Der Anteil an ALA in jenen Proben, die nach dem gleichen Prinzip wie in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, war aber nicht signifikant niedriger. Dafür unterscheidet sich der Wert an Caprinsäure (C10:0). Während in der Probe aus der Extraktion mit der Methanol/n-Hexan-Mischung keine Caprinsäure nachgewiesen wird, ist der Gehalt in der Probe aus der Extraktion mit Isopropanol sogar höher als jener der Ölsäure.

Tabelle 13: Fettsäuremuster beim Lösungsmittelscreening für die Algenlipidextraktion

Fettsäure		Isopropanol	Methanol/ n-Hexan
Caprinsäure (C10:0)	%	5,6	
Laurinsäure (C12:0)	%		
Lauroleinsäure (C12:1)	%		
Myristinsäure (C14:0)	%	0,6	0,6
Myristoleinsäure (C14:1)	%		
Palmitinsäure (C16:0)	%	8,9	11,2
Palmitoleinsäure (C16:1)	%	1,2	1,9
C17:0	%		
C17:1	%		
Stearinsäure (C18:0)	%	0,4	0,3
Ölsäure (C18:1)	%	4,8	4,6
Linolsäure (C18:2)	%	12,8	11,7
Linolensäure (C18:3)	%	17,1	16,1
Arachinsäure (C20:0)	%	0,2	0,2
Gadoleinsäure (C20:1)	%	0,2	0,2
Σ analysierter Fettsäuren	%	51,8	46,8

Allerdings muss das Ergebnis kritisch betrachtet werden, denn mittels der angewandten Analyseverfahren war es nur möglich, die Fettsäuren, die als freie Ester vorliegen, zu bestimmen. Das heißt, es konnte nur die Zusammensetzung der Fettsäuren in den Triglyceriden ermittelt werden, die für die Analyse verseift und so in freie Fettsäureester überführt wurden. Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren, der an polare Lipide gebunden ist, konnte nicht erfasst werden. Es war auch nicht möglich analytisch zu bestimmen, wie groß der Anteil an polaren und nichtpolaren Lipiden in den Proben war, aber es kann davon ausgegangen werden, dass auch polare Lipide extrahiert wurden und diese weitere Omega-3-Fettsäuren enthalten. Demnach könnte der Gesamtanteil an ALA in Isopropanol im Vergleich zu jenem in der Methanol/n-Hexan-Probe steigen.

#### 4.3.2 Einfluss der Versuchsdauer

Die Kurve in Abbildung 33 zeigt die extrahierte Lipidmenge zum jeweiligen Zeitpunkt  $t$ . Die Extraktionskurve deckt sich mit vergleichbaren Extraktionskurven aus der Literatur [20]. Der Großteil der Lipide wird innerhalb der ersten Stunde extrahiert und die Kurve flacht danach ab.

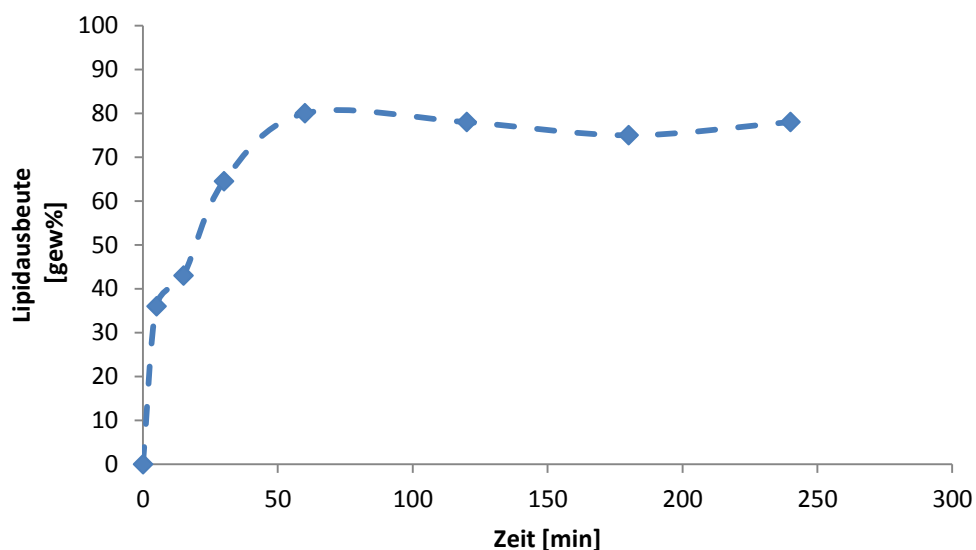


Abbildung 33: Verlauf der Extraktionskurve mit der Zeit bei der Extraktion von Algenlipiden mit Methanol

Der Grund liegt in der Tatsache, dass der zum Zeitpunkt  $t$  vorherrschende Konzentrationsunterschied auch die Extraktionsgeschwindigkeit bestimmt. Dieser Unterschied ist gerade zu Beginn sehr groß, weshalb viele Lipide rasch extrahiert werden können. Später nähern sich die Lipidkonzentration im Extraktionsmittel und in der Biomasse immer mehr aneinander an, weshalb auch die Extraktion immer langsamer abläuft. [20]

Aus der Abbildung ist erkennbar, dass der Wert bereits nach zwei Stunden konstant bleibt, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass der Konzentrationsunterschied ausgeglichen und somit das Gleichgewicht zwischen Biomasse und Methanol erreicht ist. Der leichte Knick nach unten ist darauf zurückzuführen, dass mit sehr kleinen Mengen gearbeitet wird und eine Ungenauigkeit bei der Messung, so gering sie auch sein mag, sofort im Diagramm erkennbar ist. Die zuvor angenommene Menge an extrahierbarer Lipidmenge von zwei Gramm konnte nicht erreicht werden. Der maximal gemessene Wert betrug 1,6 Gramm. Die genauen Ergebnisse sind im Anhang zu finden.

Studien zeigen, dass die Extraktion von Lipiden aus Algenbiomasse durch ein mathematisches Modell erster Ordnung beschrieben werden kann [20]. Das Zeitgesetz erster Ordnung, das dieser Integralform zugrunde liegt, ist charakteristisch für Stofftransportvorgänge.

$$m_e = m_{s,0} * (1 - e^{-kt})$$

$m_e$ ...	extrahierte Lipidmenge zum jeweiligen Zeitpunkt (g Lipid/g getrocknete Biomasse)
$m_{s,0}$ ...	Lipidmenge zu Beginn (g Lipid/g getrocknete Biomasse)
$k$ ...	Geschwindigkeitskoeffizient von den Zellen der Mikroalge in das Lösungsmittel ( $\text{min}^{-1}$ )
$t$ ...	Extraktionszeit (min)

$k$  ist wiederum eine Funktion von verschiedenen Variablen

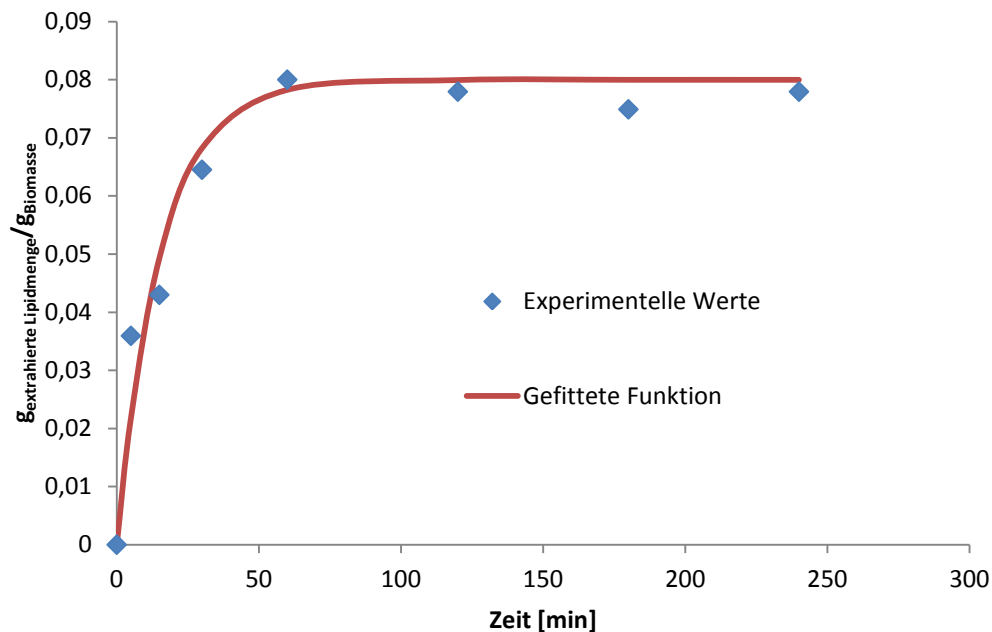
$$k = f\left(ag, \frac{s}{b}, T\right)$$

$ag$ ...	Drehzahl des Rührers (rpm)
$s/b$ ...	Verhältnis von Lösungsmittel zu Biomasse
$T$ ...	Extraktionstemperatur

Bei den durchgeführten Versuchen galten die angeführten Bedingungen:

$ag$ :	300 rpm
$s/b$ :	5 ml Methanol/g Biomasse
$T$ :	22°C
$m_{s,0}$ :	1,6 g Lipid/g Biomasse

$k$  ist die einzige Unbekannte in der Gleichung. Um diesen Wert zu erhalten fittet man die Funktion mit Hilfe von Excel in einem Diagramm (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Modell der Funktion  $m_e = m_0 * (1 - e^{-k*t})$  für die experimentell erhaltenen Extraktionskurve von Algenlipiden mit Methanol**

Der in den Versuchen aufgezeichnete Extraktionsverlauf in Abhängigkeit von der Zeit lässt sich gut durch das Modell beschreiben. Die Anpassung der Gleichung an die mathematische Funktion ergibt ein  $k$  von  $0,0639 \text{ min}^{-1}$ .

Die Proben, die aus den Versuchen mit einer Extraktionsdauer von zwei bzw. vier Stunden stammen, wurden auf ihr Fettsäuremuster untersucht. Der Anteil an ALA ist wiederum beinahe gleich und ist in Tabelle 14 angegeben. Es gilt, dass nur ALA gemessen wurde, das in den unpolaren Triglyceriden oder in der Form von freien Fettsäuren vorkommt.

Auffällig ist der unterschiedliche Gehalt an Caprinsäure in den beiden Proben. Nach zwei Stunden Extraktionszeit war noch gleich viel Caprinsäure wie Ölsäure vorhanden. Nach vier Stunden konnte jedoch keine Caprinsäure mehr in der Probe nachgewiesen werden, während der Gehalt an Ölsäure konstant blieb.

**Tabelle 14: Fettsäuremuster bei der Untersuchung der Versuchsdauer mit Methanol als Extraktionsmittel auf die Ausbeute an Algenlipiden**

Fettsäure		Methanol Zwei Stunden	Methanol Vier Stunden
Caprinsäure (C10:0)	%	5,6	
Myristinsäure (C14:0)	%	0,7	0,6
Palmitinsäure (C16:0)	%	12,5	14
Palmitoleinsäure (C16:1)	%	1,9	1,8
Stearinsäure (C18:0)	%	4	0,5
Ölsäure (C18:1)	%	5,6	6
Linolsäure (C18:2)	%	12,6	12,6
Linolensäure (C18:3)	%	17,2	16,5
Σ analysierter Fettsäuren	%	54,5	52

#### 4.3.3 Die firmeninterne Rezeptur der BDI-BioEnergy International AG

Bei den Versuchen mit 20 bzw. 50 Gramm Biomasse kam es zur Ausbildung einer wässrigen und einer zähflüssigen zweiten Phase. Das im Lösungsmittelgemisch enthaltene Wasser konnte nicht mit dem Evaporator abgezogen werden, da durch zu hohe Erhitzung die Fettsäuren in den Proben Schaden nehmen könnten. Deswegen wurde die obere wässrige Phase abdekantiert und auf ihren Wassergehalt untersucht. Sowohl die wässrige Probe als auch die Probe mit den Lipiden wurden gewogen und mit Hilfe des nun bekannten Wassergehalts konnte die Gesamtlipidmasse berechnet werden. Bei dem Versuch mit 100 Gramm Biomasse war die Phasentrennung zwischen dem wässrigen und lipidhaltigen Teil nicht erkennbar. Dennoch wurde der Wassergehalt bestimmt und auf die Masse rückgerechnet. Das Ergebnis der gravimetrischen Bestimmung bei der firmeninternen Methode ist in Abbildung 35 zu sehen. Die Werte der Versuchsergebnisse mit Wasser sowie die Ergebnisse der Wasserbestimmung sind im Anhang angegeben.

Zum Vergleich wurde das Ergebnis aus dem Versuch mit Methanol und n-Hexan eingetragen. Es ist gut erkennbar, dass der Einsatz der dritten Komponente tatsächlich eine Steigerung bei der extrahierten Lipidmenge bewirkt.

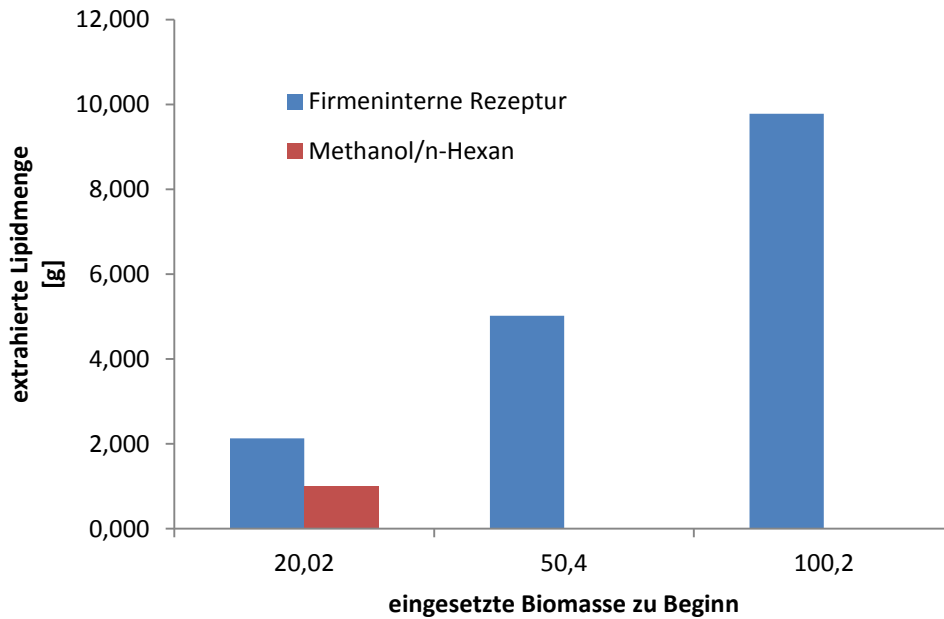


Abbildung 35: Extrahierte Lipidmenge aus *Chlorella vulgaris* bei der Anwendung der firmeninternen Rezeptur der BDI-BioEnergy International AG nach Abzug des Lösungsmittelgemischs

Außerdem lässt die Abbildung darauf schließen, dass mit steigender Biomasse- bzw. Lösungsmittelmenge der extrahierte Lipidgehalt linear ansteigt.

Es konnten bei den Versuchen mit 20 bzw. 50 Gramm Biomasse nur Fettsäuremuster von dem zähflüssigen Teil der Proben erstellt werden. In der wässrigen Phase war der Anteil an Fettsäuren unter der Nachweisgrenze. Das Ergebnis ist in Tabelle 15 zu sehen.

Die Fettsäurezusammensetzung der Versuchsergebnisse mit weniger Mikroalgenbiomasse ist einander, bis auf den Gehalt von Ölsäure, ähnlich. Bei dem Fettsäuremuster der Probe aus dem Versuch mit 100 Gramm Biomasse ist zu erkennen, dass noch zusätzliche länger-kettige Fettsäuren gelöst wurden, allerdings nur in geringen Mengen.

Tabelle 15: Fettsäuremuster der Proben bei der Extraktion von Algenlipiden nach der firmeninternen Methode, ausgehend von 20, 50 und 100 Gramm Biomasse

Fettsäure		Firmeninterne Methode 20 g BM	Firmeninterne Methode 50 g BM	Firmeninterne Methode 100 g BM
Laurinsäure (C12:0)	%	0,1		
Lauroleinsäure (C12:1)	%			
Myristinsäure (C14:0)	%	0,6	0,6	0,6
Myristoleinsäure (C14:1)	%			
Palmitinsäure (C16:0)	%	20,9	19,3	10,8
Palmitoleinsäure (C16:1)	%	1,7	1,7	1,17
Stearinsäure (C18:0)	%	1,7	0,8	0,5
Ölsäure (C18:1)	%	3,2	8	4,3
Linolsäure (C18:2)	%	14,4	16,1	9,9
Linolensäure (C18:3)	%	14,5	16,8	12,6
Arachinsäure (C20:0)	%			0,6
Gadoleinsäure (C20:1)	%			0,6
C20:2	%			1,2
∑ analysierter Fettsäuren	%	57,1	63,6	42,57

Auffallend ist, dass der Anteil der Linolsäure, die zur Gruppe der Omega-6-Fettsäuren gehört bei der 20 Gramm- und bei der 50 Gramm-Probe beinahe gleich ist wie jener der  $\alpha$ -Linolensäure und somit höher als bei jenen Versuchen, bei denen nur reiner Alkohol als Lösungsmittel eingesetzt wurde. Hier und auch bei dem Anteil an Palmitinsäure weicht die 100 Gramm-Probe in ihrem Ergebnis von den anderen beiden Proben ab. Das kommt daher, dass bei der Analyse das Wasser, das in diesem Fall nicht abdekantiert worden war, das Ergebnis beeinflusst. Die Probe wurde sozusagen verdünnt, denn auch der Gehalt an analysierbaren Fettsäuren insgesamt ist geringer.

#### 4.3.4 In Situ-Umesterung

In Abbildung 36 ist das gravimetrische Ergebnis der In Situ-Umesterungsversuche zu sehen. Einer der Unterschiede zwischen den beiden Versuchen mit Salzsäure bestand darin, dass bei dem ersten Versuch eine intensive Durchmischung erfolgte, bei dem zweiten jedoch

nicht. Das wirkte sich schon auf die Filtration der Feststoffe nach der Extraktion aus, denn ohne Durchmischung hatte die Biomasse eine klumpigere Konsistenz und konnte nur schwer aus dem Kolben entnommen und abgenutscht werden. Dadurch wurde auch weniger Filtrat erhalten, das Fettsäureester enthält.

Bei dem ersten sauren Versuch wurde wiederum eine Wasserbestimmung von den Proben durchgeführt. In Abbildung 36 sind die Werte in Gramm zu sehen, von denen bereits das Wasser abgezogen wurde. Die Werte, die das Wasser noch beinhalten und die genauen Angaben der Wasserbestimmung, sind dem Anhang zu entnehmen.

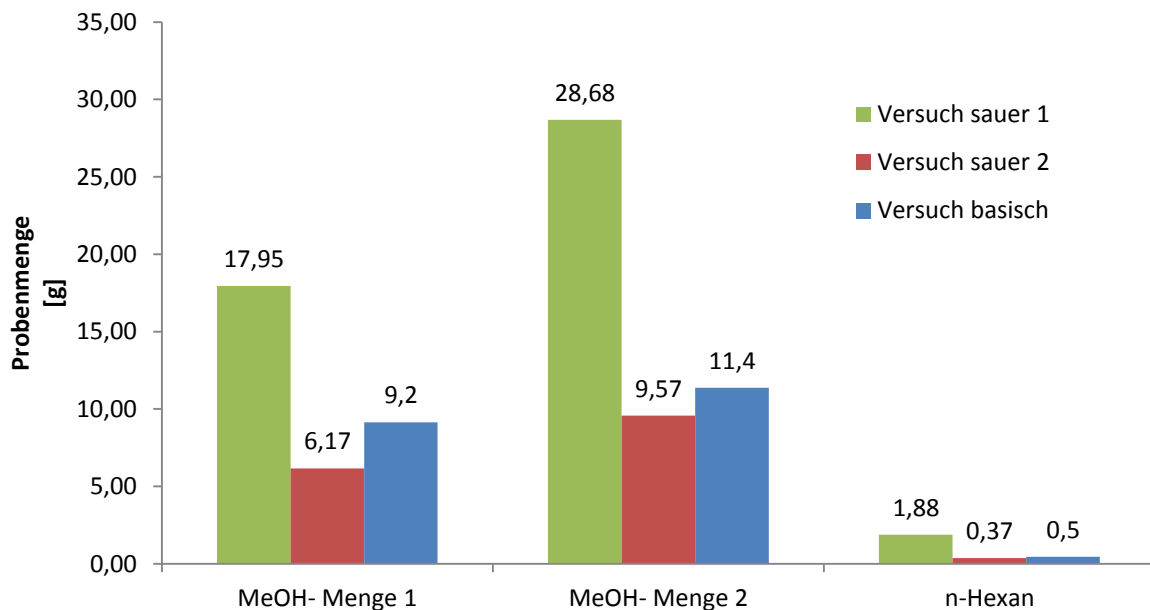


Abbildung 36: Menge an Probe der In Situ-Umesterungsversuche nach Abzug von Methanol

Sieht man von den Gesamtmengen ab, lässt sich bei allen Versuchen eine Tendenz erkennen, was die Lösung von Fettsäuren in n-Hexan betrifft. Dieser Wert war immer niedrig und betrug bei dem zweiten sauren Versuch und bei dem Versuch mit basischem Katalysator nur 1/25 des Wertes von Methanol. Beim ersten sauren Versuch war dieser Wert etwas höher.

Außerdem ist aus der Abbildung erkennbar, dass die Gesamtmenge aus Versuch sauer 1 die der anderen beiden Versuche weit übersteigt. Das ist auf das Kaliumcarbonat zurückzuführen, das dem Versuch zugeführt wurde und das sich immer noch im Gemisch befand. Durch die Zugabe der basischen Lösung wurde das Gemisch neutralisiert, das heißt,  $H^+$ -Ionen der Salzsäure reagierten mit  $OH^-$ -Ionen des Kaliumcarbonats und es entstanden Wasser und ein Salz. [19] Dadurch wurde die Salzsäure in ihrer Funktion als Katalysator für die Umesterungsreaktion eliminiert.



Betrachtet man in Tabelle 16 die Fettsäurezusammensetzung der Proben aus dem ersten Versuch mit saurem Katalysator, ist wiederum erkennbar, dass der Wert in allen drei Proben konstant ist.

**Tabelle 16: Fettsäuremuster des ersten sauren In Situ-Umeesterungsversuchs**

Fettsäure		Methanol 1.Teil	Methanol 2.Teil	n-Hexan
Laurinsäure (C12:0)	%	0,1		0,1
Lauroleinsäure (C12:1)	%			
Myristinsäure (C14:0)	%	0,9	0,8	0,9
Myristoleinsäure (C14:1)	%			
Palmitinsäure (C16:0)	%	18,8	19,5	19,1
Palmitoleinsäure (C16:1)	%	1,5	8,3	8,8
Stearinsäure (C18:0)	%	1,2	1,4	1,2
Ölsäure (C18:1)	%	8,9	9,7	9,2
Linolsäure (C18:2)	%	14,4	15,1	14,5
Linolensäure (C18:3)	%	14,5	14,5	14,2
Arachinsäure (C20:0)	%			0,2
Gadoleinsäure (C20:1)	%	0,1		0,6
$\Sigma$ analysierter Fettsäuren	%	60,9	69,3	69

Auch der Gehalt der anderen Fettsäuren ist konstant, mit Ausnahme der Palmitoleinsäure (C16:1) bei der Probe Methanol 1.Teil. Bei diesem Teil des Lösungsgemisches war das Methanol nach der In Situ-Umeesterung direkt abgezogen worden, während der zweite Teil vor der Evaporation noch mit n-Hexan vermischt und geschüttelt worden war. Die Summe der Fettsäuren, die analysiert wurden, ist bei dieser Probe insgesamt niedriger als bei den anderen beiden Proben.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit lag das Hauptaugenmerk auf der Gewinnung von Omega-3-Fettsäuren aus Fischöl und aus Mikroalgenbiomasse des Typs *Chlorella vulgaris*. Diese enthält aus der Gruppe der Omega-3-Fettsäuren  $\alpha$ -Linolensäure (ALA), jedoch keine Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA). Fettsäuren kommen in freier Form oder gebunden in Lipiden in den Algen vor. Die Lipide können polarer oder unpolarer Natur sein, wodurch auch ihr Extraktionsverhalten mit den verschiedenen Lösungsmitteln variiert.

Zunächst wurde die Stabilität der Omega-3-Fettsäuren gegenüber Luftsauerstoff untersucht. Langkettige, ungesättigte Fettsäuren gelten als anfällig gegenüber Oxidation durch Luftsauerstoff. Aus diesem Grund wurde im Vorfeld untersucht, ob für die folgenden Versuche eine Arbeitsatmosphäre ohne Sauerstoff nötig ist. Dafür wurde Fischöl verwendet, aus dem die darin enthaltenen Omega-3-Fettsäuren mit den Lösungsmitteln Methanol, Ethanol und Isopropanol extrahiert wurden. Die Versuche wurden unter normalen Umgebungsbedingungen sowie unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Die drei Alkohole wurden gewählt, da sie mit Fischöl nicht mischbar sind und eine Phasentrennung nach der Extraktion eintritt. Das mit Lipiden angereicherte Lösungsmittel wurde nach der Phasentrennung abgetrennt und der Alkohol mit Hilfe eines Evaporators abgezogen. Danach wurden die Proben auf ihre Fettsäurezusammensetzung analysiert. Es wurde in den Fettsäuremustern kein Unterschied bei Arbeiten unter normalen Umgebungsbedingungen oder unter Stickstoffatmosphäre festgestellt. Aus diesem Grund konnten die späteren Versuche bei atmosphärischen Umgebungsbedingungen durchgeführt werden.

Zur Untersuchung des Desorptionsverhaltens von Fischöl wurde Algenbiomasse, die keine Lipide mehr enthielt, mit Fischöl imprägniert und anschließend mit den Lösungsmitteln Methanol, Ethanol, Isopropanol, Aceton und n-Hexan behandelt. Am meisten Öl konnte bei der Verwendung des unpolaren Lösungsmittels n-Hexan von der imprägnierten Biomasse desorbiert werden. Entsprechend der Regel: „Ähnliches löst Ähnliches!“ wurde die Menge an gelöstem Öl mit der Polarität der Lösungsmittel geringer und auch der Gehalt an der Omega-3-Fettsäure DHA wurde kleiner. Je länger die Kohlenwasserstoffkette einer Fettsäure ist, desto schwerer ist sie in polaren Substanzen löslich. DHA weist mit 22 Kohlenstoffatomen die längste Kette der in dieser Arbeit untersuchten Omega-3-Fettsäuren auf.

Bei der Untersuchung der Auswirkung der Versuchszeit auf die desorbierte Ölmenge hat sich gezeigt, dass nach einer Stunde 80% der insgesamt wiedergewonnen Ölmenge im Lösungsmittel wiederzufinden war. Verantwortlich dafür ist der Konzentrationsunterschied an Öl zwischen den beiden Phasen, der zu Versuchsbeginn am größten ist und mit der Zeit

abnimmt. Nach etwa sechs Stunden stagnierte der Wert der Ölmenge. Insgesamt wurden 54% des Öls, mit dem die Biomasse zu Beginn imprägniert worden war, im Lösungsmittel wiedergefunden. Durch das Nachspülen des Filterkuchens bei der Filtration der Feststoffe aus der Versuchslösung mit frischem Lösungsmittel konnte das gesamte Öl von der Biomasse desorbiert werden. Mit Fischöl angereichertes Lösungsmittel verbleibt nach der Filtration in den Poren der Feststoffmatrix und wird durch das Nachspülen mit frischem Lösungsmittel daraus verdrängt. Bereits nach einem Spülvorgang waren 90% der Gesamtmenge an Öl im Lösungsmittel wiederzufinden.

Im Gegensatz zu Fischöl, in dem Lipide hauptsächlich in Form von Triglyceriden vorliegen, sind in Algen viele polare Lipide zu finden, die reich an langkettigen, ungesättigten Fettsäuren sind. Die polaren Lipide sind häufig Bestandteile von Zellmembranen und mit Proteinmolekülen über Wasserstoff- oder elektrostatische Bindungen verbunden. Um die Lipide extrahieren zu können, müssen zunächst diese Bindungen gelöst werden. Dies geschieht durch die Zugabe eines polaren Lösungsmittels wie Alkohol. Ein unpolares Lösungsmittel, wie beispielsweise n-Hexan, ist nicht in der Lage, die interzellulären Bindungen zu lösen, weshalb die Menge an extrahierten Lipiden mit n-Hexan bei den Versuchen gering war. Mit polaren Lösungsmitteln wurden hingegen gute Extraktionsergebnisse erzielt. Es ist davon auszugehen, dass neben Lipiden auch andere Zellbestandteile aus der Mikroalge gelöst wurden. Dies wurde in dieser Arbeit jedoch nicht quantitativ bestimmt und es wird davon ausgegangen, dass Lipide einen Großteil der erhaltenen öligen Phase darstellen. Eine weitere Möglichkeit die Bindungen zwischen den Lipiden und Proteinen aufzubrechen ist ein Zellaufschlussverfahren vor der Extraktion. In dieser Arbeit war dies durch mechanischen Aufschluss mit einem Magnetrührer gegeben. Als Lösungsmittel für die Algenlipidextraktion wurden die zwei Alkohole Methanol und Isopropanol und n-Hexan verwendet sowie diese in Kombination untereinander. Weiter wurde ein Lösungsmittelgemisch nach firmeninterner Rezeptur untersucht. Die Extraktionskurve über Zeit zeigte, dass der Großteil an Lipiden gleich zu Versuchsbeginn aus der Biomasse extrahiert wird. Zu Beginn war der Konzentrationsgradient zwischen dem Lösungsmittel und der Biomasse am größten. Nach einer Stunde wurden konstante Werte verzeichnet.

Abschließend wurde die Möglichkeit untersucht, Omega-3-Fettsäuren mit reaktiven Verfahren zu isolieren. Bei der In Situ-Umesterung wurde versucht, Algenlipide mit Methanol gleichzeitig zu extrahieren und zu Fettsäuremethylestern umzuestern. Durch das nachfolgende Ausschütteln mit n-Hexan sollten diese nach der Phasentrennung in dem unpolaren Lösungsmittel angereichert werden. Es wurden jedoch lediglich 0,5 m% bezogen auf das Trockengewicht der eingesetzten Biomasse in der n-Hexan-Phase wiedergefunden.

Der Anteil an ALA bezogen auf den Gesamtfettanteil war in allen Proben, auch bei jenen der In Situ-Umesterung und unabhängig von der Wahl des Extraktionsmittels ähnlich. Allerdings wurden bei der Erstellung der Fettsäuremuster nur die freien Fettsäuren und die Fettsäuren der Triglyceride erfasst. Man kann davon ausgehen, dass auch Phospho-, Glyco- und andere polare Lipide mit dem Lösungsmittel extrahiert wurden, die weitere Omega-3-Fettsäuren enthalten. Die quantitative Bestimmung dieser polaren Lipide war nicht Teil dieser Arbeit.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., de Diego, S. M. (2010): Production of omega- 3 polyunsaturated fatty acids: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 1-12
- [2] Graham, L. E., Graham, J. M., Wilcox, L. W. (2009): *Algae. Zweite Auflage*. San Francisco: Pearson
- [3] Brennan, L., Owende, P. (2009): Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Suitable Energy Reviews*, 14, 557-577
- [4] Milledge, J. M. (2010): Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 10, 31-41
- [5] Goshina, I. A., Harwood, J. L. (2009): Algal Lipids and Effect of the Environment on their biochemistry. In M. T. Arts, M. T. Brett, M. J. Kainz: *Lipids in Aquatic Systems* (S. 1-24). New York: Springer
- [6] Belitz., H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2008): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 6. auflage*. Berlin, Heidelberg: Springer
- [7] Czihak, G., Langer, H., Ziegler, H. [Hrsg.] (1996): *Biologie*. Berlin, Heidelberg: Springer
- [8] Markl, J. [Hrsg.] (2011): *Purves, Biologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- [9] Kamel, B.S., Kakuda, Y. [Hsg.] (1994): *Technical Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids*. Glasgow: Chapman & Hall
- [10] Jakube, H.D., Karcher, R. (1996): *Lexikon der Chemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- [11] Kralovec, J. A., Zhang, S., Zhang, W., Barrow, C. J. (2012): A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. *Food Chemistry*, 131, 639-644

- 
- [12] Ahlgren, G., Vrede, T., Goedkoop, W. (2009): Fatty Acid Ratios in Freshwater Fish, Zooplankton and Zoobenthos- Are there Specific Optima? In M. T. Arts, M. T. Brett, M. J. Kainz: *Lipids in Aquatic Systems* (S. 147-178). New York: Springer
- [13] Tehrany, E. A., Jacquot, M. Gaiani, C., Imran, M, Desorby, S., Linder, M. (2011): Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Trends in Food science and Technology, in Press, accepted manuscript*
- [14] Hahn, A., Ströhle, A. (2004): Prävention degenerativer Erkrankungen,  $\omega$ -3- Fettsäuren. *Chemie unserer Zeit*, 38, 310-318
- [15] Sattler, K., Feindt, H. J. (1995): *Thermal Separation Processes*. Weinheim: WILEY-VCH Verlagsgesellschaft
- [16] Mersmann, A., Kind, M., Stichlmair, J. (2005): *Thermische Verfahrenstechnik-Grundlagen und Methoden*. Berlin, Heidelberg: Springer
- [17] Siebenhofer, M. (2008): *Extraktion*. Skriptum aus Thermische Verfahrenstechnik I VO. Graz: Technische Universität, Institut für Chemische Verfahrenstechnik und Umwelttechnik
- [18] Meyer, V. R. (2009): *Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie (10. Auflage)*. Weinheim: WILEY-VHC Verlagsgesellschaft
- [19] Mortimer, C. E., Müller, U. (2003): *Das Basiswissen der Chemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- [20] Halim, R., Danquah, M. K., Webley, P.A. (2012): Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. *Biotechnology Advances*30, 709-732
- [21] Ehimen, E.A., Sun, Z.F., Carrington, C.G. (2010): Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel*, 89, 677-684
- [22] Stach, S. (2005): *Polysaccharide aus marinen Bakterien und der Mikroalge Chlorella vulgaris*. Göttingen: Cuvillier

- 
- [23] Elvers, B., Hawkins, S., Schulz, G. (1990): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: WILEY-VHC Verlagsgesellschaft
- [24] Montes D'Oca, M.G., Viegas, C.V., Lemões, J.S., Miyasaki, E.K., Morón-Villarreyes, J.A., Primel, E.G., Abreu, P.C. (2011): Production of FAMES from several microalgal lipidic extract and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and Bioenergy*, 35, 1533-1538
- [25] Bligh EG, Dyer WJ. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917
- [26] Halim, R., Gladman, B., Danquah, M.K., Webley, P.A. (2011): Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102, 178-185
- [27] Raffler, F. (2010): *Veresterung von Algenextrakten und gaschromatographische Analyse von Algenbiomasse*. Bachelorarbeit in Zusammenarbeit mit der BDI-BioEnergy International AG und dem Institut für Thermische Verfahrenstechnik und Umwelttechnik, Technische Universität Graz.
- [28] Gürlich, A. (2010): *Experimentelle Untersuchung zur Verfahrensauslegung für die Gewinnung von Ölen aus Algenbiomasse*. Diplomarbeit in Zusammenarbeit mit der BDI-BioEnergy International AG und der FH JOANNEUM Graz.

## 7 Anhang

Tabelle 17: Stabilitätsversuche von Omega-3-Fettsäuren mit Fischöl

Lösungsmittel	Rundkolben						
	LM	Öl	leer	mit LM	nach Evaporation	extrahierte Menge an Öl	Menge an angereichertem LM
	g	g	g	g	g	g	g
Atmosphärische Umweltbedingungen							
Methanol	255,17	149,5	169,12	404,73	178,26	9,14	235,61
Ethanol	247,26	146,56	167,82	407,03	193,27	25,45	239,21
Isopropanol	247,26	146,56	155,86	413,95	217,08	61,22	258,09
Stickstoffatmosphäre							
Metanol	254,1	148,3	167,84	404,21	175,95	8,11	236,37
Ethanol	250,30	149,19	171,82	411,21	202,77	30,95	239,39
Isopropanol			155,87	399,62	217,48	61,61	243,75

Tabelle 18: Lösungsmittelscreening der mit Fischöl imprägnierten Mikroalgenbiomasse

Lösungsmittel	Biomasse	Fischöl	Menge LM	Menge LM nach Filtration	Menge Substrat nach Evaporation
	g	g	g	g	g
Methanol	40,02	8,01	106,69	29,49	0,85
Methanol (200 ml)	40	8,33	147,42	61,22	1,36
Ethanol	40,02	8,02	115,22	42,88	1,33
Isopropanol	40,04	8	116,79	36,09	1,83
Aceton	40,01	8,01	115,45	11,01	1,91
n-Hexan	40	8,01	96,5	13,43	2,81



Tabelle 19: Zusammenfassung des Lösungsmittelscreenings für die imprägnierte Biomasse und der Einflussfaktors Zeit auf die wieder gelöste Ölmenge

Lösungsmittelscreening der Löslichkeitsversuche mit Biomasse und Fischöl												
Dauer: 1 h				Becherglas			Filtrat					
Lösungsmittel	BM	ÖL	LM	leer	mit BM	mit BM und LM	Kolben leer	nach Filtration	nach Evaporation	Menge LM	Menge LM nach Filtration	Menge Substrat nach Evaporation
	g	g	ml	g	g	g	g	g	g	g	g	g
Methanol	40,02	8,01	150	267,48	315,29	421,98	169,91	199,4	170,76	106,69	29,49	0,85
Methanol (200 ml)	40	8,33	200	200,45	248,53	395,95	155,86	217,08	157,22	147,42	61,22	1,36
Ethanol	40,02	8,02	150	268,49	316,3	431,52	172,19	215,07	173,52	115,22	42,88	1,33
Isopropanol	40,04	8	150	142,86	190,64	307,43	172,4	208,49	174,23	116,79	36,09	1,83
Aceton	40,01	8,01	150	265,06	312,73	428,18	171,82	182,83	173,73	115,45	11,01	1,91
n-Hexan	40	8,01	150	197,81	245,6	342,1	169,94	183,37	172,75	96,5	13,43	2,81
Lösen von Fischöl mit n-Hexan mit der Zeit als Einflussfaktor												
Dauer				Becherglas			Filtrat					
	BM	ÖL	LM	leer	mit BM	mit BM und LM	Kolben leer	nach Filtration	nach Evaporation	Menge LM	Menge LM nach Filtration	Menge Substrat nach Evaporation
h	g	g	ml	g	g	g	g	g	g	g	g	g
0,5	40,01	8,06	150	141,83	189,45	287,78	170	200,07	173,55	98,33	30,07	3,55
1	40,03	8,01	150	143,8	191,46	288,48	155,83	187,64	159,23	97,02	31,81	3,4
2	40,02	8,02	150	127,01	174,06	271,68	171,78	193,46	175,38	97,62	21,68	3,6
3	40,01	8,02	150	143,01	189,13	287,11	171,83	192,64	175,47	97,98	20,81	3,64
4	40,03	8,06	150	141,7	189,38	287,21	172,43	197,02	176,36	97,83	24,59	3,93
5	40,03	8,02	150	144,88	192,61	290,7	165,73	189,49	169,54	98,09	23,76	3,81
6	40,02	8,04	150	143,77	191,34	289,31	169,9	198,48	174,29	97,97	28,58	4,39
7	40,03	8,03	150	143,43	191,04	288,26	169,95	199,76	174,25	97,22	29,81	4,3
8	40,03	8,02	150	143,83	191,48	288,91	172,18	196,42	176,53	97,43	24,24	4,35

Tabelle 20: Zusammenfassung der Nachspülversuche und der Variation der Ölmenge

Nachspülen des Filterkuchens												
Lösungsmittel: n-Hexan				Becherglas			Filtrat					
Dauer	BM	Öl	LM	leer	mit BM	mit BM und LM	Kolben leer	nach Filtration	nach Evaporation	Menge LM	Menge LM nach Filtration	Menge Substrat nach Evaporation
h	g	g	ml	g	g	g	g	g	g	g	g	g
<b>Versuchsreihe 1</b>												
3	40,02	8,01	150	149,95	197,77	296,11	167,82	210,94	173,44	98,34	43,12	5,62
3			100				155,86	199,32	158,28		43,46	2,42
<b>Versuchsreihe 2</b>												
3	40,02	8,02	150	143	190,57	288,68	165,72	222,87	171,61	98,11	57,15	5,89
3			80				167,81	210,5	169,57		42,69	1,76
<b>Versuchsreihe 3</b>												
3	40,04	8,07	150	141,93	189,74	287,02	169,9	212,56	175,35	97,28	42,66	5,45
3							169,15	212,77	171,56		43,62	2,41
3							155,84	194,25	156,4		38,41	0,56
3							169,98	212,51	170,14		42,53	0,16
3							171,82	211,36	171,85		39,54	0,03
<b>Einfluss der Ölmenge</b>												
Lösungsmittel: n-Hexan				Becherglas			Filtrat					
Dauer	BM	Öl	LM	leer	mit BM	mit BM und LM	Kolben leer	nach Filtration	nach Evaporation	Menge LM	Menge LM nach Filtration	Menge Substrat nach Evaporation
h	g	g	ml	g	g	g	g	g	g	g	g	g
3	40,02	6,01	150	148,71	194,4	291,69	169,87	218,8	174,45	97,29	48,93	4,58
3	40,02	8,01	150	149,95	197,77	296,11	167,82	210,94	173,44	98,34	43,12	5,62
3	40,03	10,03	150	143,74	193,56	291,05	165,72	215,58	172,65	97,49	49,86	6,93
3	40,02	12,09	150	144,89	196,57	294,09	169,12	202,72	176,43	97,52	33,6	7,31

Tabelle 21: Zusammenfassung des Lösungsmittelscreening für die Chlorella vulgaris und der Untersuchung der Zeit als Einflussfaktor auf die extrahierte Lipidmenge

Lösungsmittelscreening für die Lipidextraktion aus Mikroalgen								
Dauer: 1 h, 100 ml Lösungsmittel			Filtrat					
Lösungsmittel	BM	LM	Ev.Kolben	Filtrat	nach Ev.	Filtratmenge	extrahierte Ölmenge	
	g	g	g	g	g	g	g	
Methanol	20	78,11	169,9	234,7	171,5	64,8	1,6	
Isopropanol	20,01	76,23	155,84	217,25	156,39	61,41	0,55	
Methanol/n-Hexan	20,01	72,08	172,92	214,17	173,96	41,25	1,04	
Isopropanol/n-Hexan	20	71,96	169,94	204,2	170,4	34,26	0,46	
n-Hexan	20,03	64,12	171,81	217,07	171,93	45,26	0,12	
Firmeninterne Methode	20,02	100,292	172,17	215,17	177,77	43	5,6	
Firmeninterne Methode	50,4	244,37	169,9	262,6	179,84	92,7	9,94	
Firmeninterne Methode	100,2	521,07	163,17	434,83	184,76	271,66	21,59	
Zeitverlauf der Extraktion mit 100 ml Methanol								
			Filtrat					
Dauer	BM	LM	Evaporationskolben	Filtrat	nach Evaporation	Filtratmenge	extrahierte Lipidmenge	Verhältnis
min	g	g	g	g	g	G	g	%
5	20,04	76,9	172,17	225,35	172,89	52,52	0,72	35,9
15	20,01	76,82	167,84	230,83	168,7	62,13	0,86	43,0
30	20	77,17	172,94	223,9	174,23	49,67	1,29	64,5
60	20	78,11	169,9	234,7	171,5	63,2	1,6	80,0
120	20,02	78,68	167,81	218,82	169,37	49,45	1,56	77,9
180	20,03	78,42	169,95	219,77	171,45	48,32	1,5	74,9
240	20,02	78,35	172,18	223,01	173,74	49,27	1,56	77,9

Tabelle 22: Zusammenfassung der In Situ-Umesterungsversuche

<b>Versuch sauer 1</b>					
Biomasse:	100,4 g				
Lösungsmittel:	236,06 g				
Acethylchlorid:	24,46 g				
Kaliumcarbonat:	25,87 g				
Bezeichnung	Evaporationskolben				extrahierte Substanz
	leer	mit Lsg.	Menge Lsg.	nach Evaporation	
	g	g	g	g	g
MeOH- Menge 1	165,33	268,12	102,79	214,05	48,72
MeOH- Menge 2	168,01	250,86	82,85	231,36	63,35
n-Hexan	159,77	191,95	32,18	161,69	1,92
<b>Versuch sauer 2</b>					
Biomasse:	100,8 g				
Lösungsmittel:	236,06 g				
Acethylchlorid:	32,29 g				
Bezeichnung	Evaporationskolben				extrahierte Substanz
	leer	mit Lsg.	Menge Lsg.	nach Evaporation	
	g	g	g	g	g
MeOH- Menge 1	167,41	197,94	30,53	173,58	6,17
MeOH- Menge 2	172,39	223,97	51,58	181,96	9,57
n-Hexan	169,83	209,78	39,95	170,2	0,37
<b>Versuch basisch</b>					
Biomasse:	40,02 g				
Lösungsmittel:	208,36 g				
Natriummethanolat:	13 g				
Bezeichnung	Evaporationskolben				extrahierte Substanz
	leer	mit Lsg.	Menge Lsg.	nach Evaporation	
	g	g	g	g	g
MeOH- Menge 1	165,72	230,1	64,38	174,87	9,2
MeOH- Menge 2	163,19	248,3	85,11	174,574	11,4
n-Hexan	172,38	219,84	47,46	172,83	0,5

Tabelle 23: Ergebnisse der Wasserbestimmung

<b>Bestimmung des Wassergehalts</b>			
<b>Firmeninterne Extraktionsmethode</b>			
<b>Probenbezeichnung</b>	<b>extrahierte Substanzmenge</b>	<b>Wassergehalt</b>	<b>Ergebnis ohne Wasseranteil</b>
	g	mg/100g	g
Firmenintern 20 g BM	5,6		2,13
Firmenintern 50 g BM	9,94		5,02
Firmenintern 100 g BM	21,59		9,78
<b>In Situ-Umesterungsversuch 1, sauer</b>			
<b>Probenbezeichnung</b>	<b>extrahierte Substanzmenge</b>	<b>Wassergehalt</b>	<b>Ergebnis ohne Wasseranteil</b>
	g	mg/100g	g
MeOH- Menge 1	48,72	63,15	17,95
MeOH- Menge 2	63,35	54,73	28,68
n-Hexan	1,92	2,15	1,88

## 1. Material Safety Data Sheet

### 1. Health Hazard Information

#### Acute effects

Eye	Contact with the eyes may cause irritation.
Skin	No effects.
Inhaled	Inhalation may irritate the mucous membrane and respiratory tract.
Swallowed	Ingestion may cause nausea.

#### First Aid

Eye	Immediately irrigate the eyes continuously with water.
Swallowed	In the event of accidental ingestion, rinse mouth and drink water
Toxicity Data	No data

### 2 Precautions for Use

Exposure Standards	Threshold Limit Value (TLV) is unknown. OSHA Permissible Exposure Limit is unknown.
Personal Protection	When using <i>Chlorella vulgaris</i> , wear protective gloves and mask. Always wash skin and hands thoroughly after handling any chemical and before eating, drinking or smoking.
Flammability	Non flammable.

### 3 Safe Handling Information

Storage and Transport	Plastic bag. Protect from high temperature and intense light Store away from ignition sources and protect from physical damage.
Spills and Disposal	Empty plastic bags may be recycled.
Fire/Explosion Hazard	When involved in a fire, cool the containers using water spray. Use CO <sub>2</sub> , dry chemical or foam to extinguish.

## 2. Specifications

### 1) Product identification

Product name	<i>Chlo</i>
Use	<i>Chlorella vulgaris</i> is a dark green microalgae powder used for several applications such as fish feed and cosmetics.

### 2) Classification

*Chlo* is a spray drying powder of pure *Chlorella vulgaris* microalgae.

*Chlorella* is an unicellular green microalga species classified as follows:

Phylum:	Chlorophyta
Order:	Chlorococcales
Family:	Chlorococcaceae
Genus:	<i>Chlorella vulgaris</i>

### 3) Ingredients

Microalgal biomass (*Chlorella vulgaris*) - 97 %

### 4) Physical Properties

Colour	dark green
Appearance	fine powder
Aroma	Typical, like algae, grass/hay - like
Taste	Typical, aromatic, mild
Boiling Point	Not applicable
Melting Point	Not applicable
Solubility	
Water	Miscible
Oils	Not soluble
Specific density	0,5 - 0,8 g/ml
pH	6-7



### 3. Typical Analysis

#### General Composition (% DWT)

Fat	8-13
Protein	45-55
Minerals	6-9
Carbohydrates	30-35

#### Fatty Acids (% DWT)

Alpha Linoleic acid <sup>a</sup>	1,24
Linolenic acid	0,93
Omega 3 fatty acids	3,22
Myristic acid (C 14:0)	0,04
Palmitic acid (C 16:0)	1,90
Palmitoleic acid (C 16:1w7c)	0,27
Palmitoleic acid (C 16:1w7t)	0,01
Palmitoleic acid (C 16 1w9c)	0,40
Linoleic acid (C 18:2w6cc)	2,23
Linoleic acid (C 18:3w3c)	3,14
Oleic acid cis isomer (C 18:1)	2,23
Oleic acid (C 18:1w9c)	0,65
Stearic acid (C 18:0)	0,10

#### Aminoacids (g/kg)

Methionine	5-9
Proline	15-30
Lysine	25-35
Tyrosine	13-18
Phenylalanine	22-25
Serine	14-20
Histidine	8-9
Icyine	25-40
Threonine	18-22
Arginine	27-30
Alanine	33-40
Valine	25-28
Isoleucine	18-20
Leucine	36-50

#### Carotenoids / Chlorophyll (mg/100g)

Carotenoids (total)	50-200
Lutein	70-120
Chlorophyll	2,5-4,5 g/100g

#### Vitamins (mg/100g)

Vitamin B <sub>12</sub>	100-260 ug/100g
Vitamin K	0,3-0,5
Vitamin E	8-11
Vitamin C	10-30

**necton**

3 / 3