

Productie van zoutwateralgen voor toepassingen in food (en feed) Deelrapport I

Werkpakketten 1&2 van project Foodgrade productie van zoutwateralgen
Deelrapport I: Achtergrondinformatie zoutwateralgen: selectie van soorten en omgevingsomstandigheden

Auteurs: H.J.H. Elissen & R.Y. van der Weide



Productie van zoutwatalgen voor toepassingen in food (en feed) Deelrapport I

Werkpakketten 1&2 van project **Foodgrade productie van zoutwatalgen**
Deelrapport I: Achtergrondinformatie zoutwatalgen: selectie van soorten en omgevingsomstandigheden

Auteurs: H.J.H. Elissen & R.Y. van der Weide

Dit onderzoek is in opdracht van SNN/EU- Fryslân Fernijt uitgevoerd door Stichting Wageningen Research, onderzoeksinstituut Wageningen Plant Research, Business unit Praktijkonderzoek AGV, team ACRRES.

WR is een onderdeel van Wageningen University & Research, samenwerkingsverband tussen Wageningen University en de Stichting Wageningen Research.

Lelystad, januari 2018

Rapport-749

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/440356>

© 2018 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Akkerbouw en Vollegrondsgroenteteelt, Postbus 430, 6700 AK Lelystad; T 0320 29 11 11; www.wur.nl/plant-research

KvK: 09098104 te Arnhem
VAT NL no. 8113.83.696.B07

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

Stichting Wageningen Research is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit project werd medegefinancierd door het ministerie van Economische Zaken, het Samenwerkingsverband Noord Nederland en de provincie Fryslân



Ministerie van Economische Zaken



provinsje fryslân
provincie fryslân 

Inhoudsopgave

Samenvatting	5
Summary	6
Afkortingen	7
1 Inleiding	8
2 Commercieel interessante soorten	9
3 Inhoudsstoffen	12
3.1 Pigmenten	12
3.2 Vetten	16
3.3 Koolhydraten	17
3.4 Andere	18
4 Wetgeving	19
4.1 Voeding (food)	19
4.2 Diervoeder (feed)	19
4.3 Zoutwatalgen	20
5 Kweekmethodes en invloed van procesparameters	21
5.1 Knelpunten bij grootschalige kweek	21
5.2 Kweekmedia	21
5.3 Invloed van licht, nutriënten, zout, druk en mutaties op groei en inhoudsstoffen van zoutwatalgen	22
5.3.1 Licht	22
5.3.2 Nutriënten	24
5.3.3 Zout	25
5.3.4 Druk en mutaties	25
5.4 Soortbeschrijvingen	25
5.4.1 <i>Dunaliella salina</i> & <i>Dunaliella tertiolecta</i>	26
5.4.2 <i>Arthrospira platensis</i>	27
5.4.3 <i>Nannochloropsis gaditana</i> en sp.	29
5.4.4 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	33
5.4.5 <i>Porphyridium purpureum</i>	35
5.4.6 <i>Tetraselmis chuii</i>	36
5.4.7 <i>Odontella aurita</i> en <i>sinensis</i>	37
5.4.8 Andere algen	39
6 Conclusie	41
7 Literatuur	42
Appendix I	45

Samenvatting

De commerciële kweek van microalgen voor foodtoepassingen staat sterk in de belangstelling. Het kweken van zoutwateralgen in reactoren met LED lampen heeft verschillende voordelen. Zoutwateralgen bevatten waardevolle inhoudsstoffen, zoals antioxidanten, die in dit rapport beschreven worden. Verder kan de hoge saliniteit in kweeksystemen leiden tot minder contaminatie. Door ze te kweken in gesloten systemen bij verschillende LED lichtgolflengtes (kleuren) kunnen hoge biomassaconcentraties behaald worden en kan de productie van biomassa en waardevolle inhoudsstoffen gestuurd worden.

Dit rapport bevat informatie over interessante inhoudsstoffen (o.a. pigmenten, vetten, koolhydraten) uit zoutwateralgen evenals de algemene effecten van licht, nutriënten, zout, druk en mutaties op algengroei. Verder wordt de invloed van diverse parameters op biomassagroei en pigmentvorming van een aantal commercieel interessante mariene algensoorten beschreven. Dit gaat o.a. om de effecten van lichtsterkte, golflengte, lichtpadlengte, stikstofbron en concentratie, mutagenen, verdunnings/ verversingssnelheden, mengcondities, temperatuur, zoutgehalte, flashing (wisselende L/D cycli), mixotrofe/fototrofe omstandigheden, alternatieve nutriëntenbronnen, mengcultures en Si additie worden beschreven.

De soorten die nader beschreven worden zijn: *Dunaliella salina* en *tertiolecta*, *Arthrospira platensis*, *Nannochloropsis gaditana* en sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium purpureum*, *Tetraselmis chuii*, *Odontella aurita* en *Odontella sinensis*.

Summary

The commercial production of microalgae for food applications has been the focus of much attention lately. Culturing marine microalgae in reactors with LED lamps has several advantages. Marine algae contain valuable components such as antioxidants, which are described in this report, and high salinities in production systems can lead to less contamination. By producing them in closed systems at different LED light wavelengths (colours) high biomass concentrations can be obtained and production of biomass and valuable components can be increased.

This report summarizes interesting components (i.e. pigments, lipids, carbohydrates) from marine microalgae in addition to general effects of light, nutrients, salt, pressure and mutations on algae growth. The influence of several parameters on biomass growth and pigment formation of several commercially interesting marine algae species is described. These parameters include light intensity, wavelength, light path length, nitrogen source and concentration, mutagens, dilution/refreshment rates, mixing conditions, temperature, salt concentration, flashing (alternating L/D cycles), mixotrophic/phototrophic conditions, alternative nutrient sources, mixed cultures and Si addition.

Species that are described in detail include *Dunaliella salina* and *tertiolecta*, *Arthrospira platensis*, *Nannochloropsis gaditana* and sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium purpureum*, *Tetraselmis chuii*, *Odontella aurita* and *Odontella sinensis*.

Afkortingen

ALE:	Adaptive Laboratory Evolution
APC:	Allophycocyanine
Belichtingssterktes:	Kunnen uitgedrukt worden als Lux, fotonfluxdichtheid (PPD in $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) en lichtintensiteit in W/m^2 . Er zijn geen omrekenfactoren tussen Lux en W/m^2 en $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, omdat deze variëren met golflengte. PPD kan omgerekend worden naar lichtintensiteit (mW/cm^2) door te vermenigvuldigen met 43.6 in het geval van witte LED (Xue et al, 2011). Omrekenvoorbeelden worden beschreven door Skye Instruments
(C-)PC:	(C-)phycocyanine
Chl:	Chlorofyl (Chla=chlorofyl a, Chlc ₂ = chlorofyl c2 etc.)
Cyanophyta:	Cyanobacteriën of blauwwieren, bacteriën die, net als planten, in staat zijn tot fotosynthese
Cryptophyta:	Klasse eencellige, microscopisch kleine algen die in zoet en zout water voorkomen
DHA:	Docosahexaeenzuur of 22:6(ω -3)
DS:	Droge stof
EFC doek:	Electrostatic flocking cloth
EFSA:	European Food Safety Authority (EU)
EMS:	Ethyl Methaan Sulfonaat
EPA:	Eicosapentaeeenzuur of 20:5(ω -3)
FAs:	Vetzuren
FDA:	Food and Drug Administration (VS)
Fototroof:	Een fototroof organisme is in staat om met behulp van licht als energiebron en de opname van anorganische stoffen te leven
GMP+:	Good Manufacturing Practice, procedure voor voercertificering, geïntegreerd met HACCP: 'Hazards Analysis and Critical Control Points'
GRAS:	Generally recognized as safe
Heterotroof:	Een heterotroof organisme heeft organische bestanddelen nodig als C bron voor zijn opbouw en groei
LED:	Licht-emitterende diode
MAE:	Micro-wave assisted extraction
Microalgen:	In dit rapport verwijst deze term zowel naar cyanobacteriën, diatomeeën als rode, bruine, groene algen etc.
Mixotroof:	Een mixotroof organisme kan zowel haar energie uit anorganische (autotroof) als organische (heterotroof) stoffen halen
MUFA:	Enkelvoudig onverzadigde vetzuren
N _m :	Stikstof mineraal
N _{org} :	Stikstof organisch
NT:	No toxins known
NTG:	nitrosoguanidine
N _{tot} :	Stikstof totaal
NVWA:	Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit
OS:	Organische stof
PAR:	Photosynthetically Active Radiation, het type licht dat nodig is voor fotosynthese
PB:	Phycobiliproteïnen of phycobilines
PE:	Phycocerythrine
PFD:	Fotofluxdichtheid in $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
PLE:	Pressure liquid extraction
PPF:	Photosynthetic Photon Flux, het totale licht (fotonen) die uitgestraald worden door een lichtbron per seconde in $\mu\text{mol}/\text{s}$
PPFD:	Photosynthetic Photon Flux Density, het licht dat een bepaald oppervlak elke seconde bereikt, $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
PPM:	Parts per million (1 PPM= 1 mg/L ~ 2 $\mu\text{S}/\text{cm}$)
PPT:	Parts per thousand (1 PPT = 1000 PPM)
PUFA:	Meervoudig onverzadigde vetzuren
Rhodophyta:	Roodalgen of roodwieren zijn een belangrijke groep algen, waarvan meer dan 5000 soorten bekend zijn. De meeste roodalgen zijn meercellig en marien, o.a. bepaalde groepen zeewier
ROS:	Reactieve zuurstofvormen
SFA:	Verzadigde vetzuren
SFE:	Supercritical fluid extraction
<i>Spirulina</i> :	Heet tegenwoordig <i>Arthrospira</i> , maar genus naam wordt nog steeds veelvuldig gebruikt
SSP:	Single superfosfaat
TAG:	Triacylglycerolen
v.e.:	Vervuilingseenheid, de gemiddelde hoeveelheid vervuiling van water die één persoon per jaar veroorzaakt
vvm:	Volume per volume per minuut (gas flow in vloeistof)

1 Inleiding

Dit rapport is onderdeel van een gezamenlijk project van consortiumpartners Kelstein Algen B.V., AF&F B.V. en Wageningen UR ACRRES. Het doel is het ontwikkelen van nieuwe innovatieve kweektechnologie voor de commerciële foodgrade productie van zoutwatalgen.

Zoutwatalgen kunnen, net als zoetwatalgen, gekweekt worden in open vijvers/'raceway vijvers', plaat- of buizenreactoren. Reactoren hebben als voordeel dat ze minder gevoelig zijn voor contaminatie dan open systemen (Hohenadler, 2010). Plaat- en buisreactoren hebben een kortere lichtweg, wat biomassa productie bevordert, doordat het licht beter de algen bereikt (Chen et al, 2013). Daarnaast kan de biomassa concentratie in fotobioreactoren veel hoger worden waardoor de oogstkosten dalen. Nadelen zijn hoge overige productiekosten, algengroei op de wanden, te hoge zuurstofconcentraties en gevoeligheid voor opwarming. Door gestuurde belichting in de vorm van (gekleurde) LEDs kan de productie van biomassa en waardevolle inhoudsstoffen verhoogd worden.

Het vernieuwende van dit project is dat er gebruik wordt gemaakt van reststromen of laagwaardige grondstoffen (bijv. brak grondwater of industriële zoute reststromen) om op een gecontroleerde wijze zoutwatalgen te laten groeien in gesloten reactorsystemen voor de productie van waardevolle inhoudsstoffen. Binnen het projectconsortium verricht Wageningen UR ACRRES vooral onderzoek naar verschillende combinaties van zoutwatalgen/ reststromen en het optimaliseren van procesparameters en inhoudsstoffen, terwijl AF&F B.V. en Kelstein Algen B.V. zich met name richten op de reactortechnologie, waterbesparing en vertaling naar praktijkschaal voor de meest veelbelovende algensoorten.

Dit eerste deelrapport richt zich op het beschrijven van commercieel gekweekte zoutwatalgen en hun inhoudsstoffen. Daarnaast wordt voor een aantal belangrijke soorten de invloed van diverse kweekparameters ((kunst)licht, nutriënten) verder uitgewerkt. In het tweede deelrapport worden een aantal reststromen beschreven die interessant zijn voor grootschalige kweeksystemen. Het rapport eindigt met de uitwerking van een aantal batchexperimenten, waarin verschillende combinaties van algen en reststromen getest zijn.

2 Commercieel interessante soorten

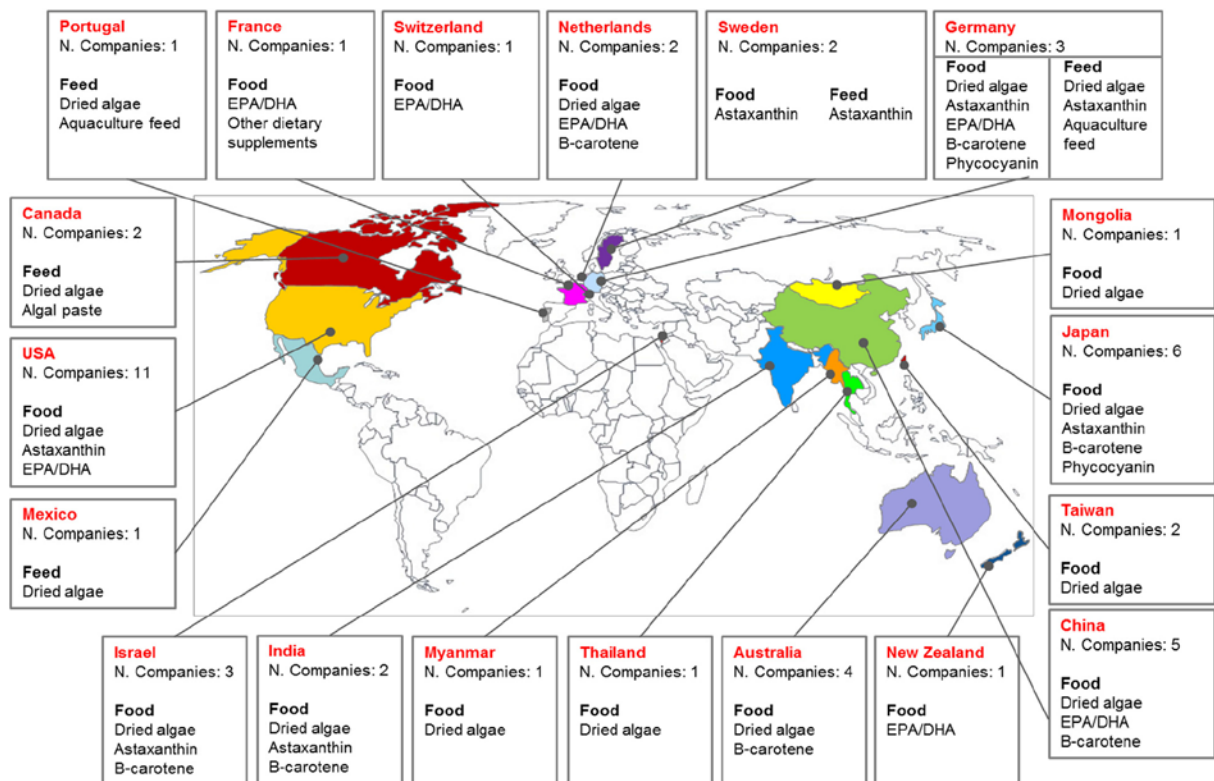
Er wordt geschat dat er in totaal tussen 200.000 en 800.000 soorten zoet- en zoutwateralgen bestaan. De verschillende schattingen lopen echter ver uiteen (Guiry, 2012). 40.000 soorten zijn geïdentificeerd en een veelvoud hiervan is dat nog niet (Mooij et al, 2013). Voor algenonderzoek worden ongeveer 50 algenstammen frequent gebruikt. Een klein deel van alle algen kan heterotroof groeien, de meeste algengroei is echter fototroof of mixotroof. Slechts een select groepje micro-algen wordt voor commerciële doeleinden gekweekt, dit zijn o.a. *Spirulina* (*Arthrospira*), *Chlorella*, *Dunaliella* en *Haematococcus* (Hohenadler, 2010). Zoutwateralgen zijn in te delen naar hun habitat: lichtbrak, brak, marien, hoog salien en hypersalien (CCAP, 2016). Ook zijn soorten vaak in staat om zowel op zoute (hoge geleidbaarheid) als niet-zoute media te groeien. Dit rapport richt zich uitsluitend op soorten die van nature voorkomen in zoute milieus. Het is ook mogelijk om een mix van soorten te gebruiken voor uiteindelijke toepassingen. Deze zog. polycultures, vooral van fotoautotrofen, worden vaak gebruikt voor aquacultuursystemen als voer voor vis en kreeftachtigen en in bioremediatieprocessen (Kent et al, 2015). De belangrijkste commercieel gekweekte zoutwatersoorten worden weergegeven in onderstaande tabel met selectie van bijbehorende producten per soort (Enzing et al, 2014). Producten uit algen omvatten o.a. pigmenten, vetten en hele algen.

Tabel 1 Belangrijkste commercieel gekweekte zoutwateralgen en hun producten

Soort	Product
<i>Spirulina</i> *	Voedingssupplementen Phycocyanine
<i>Dunaliella salina</i>	β-caroteen Xantofyl
<i>Porphyridium</i>	Phycocyanine Voedingssupplementen
<i>Nannochloropsis</i>	EPA/DHA Algenpasta Aquacultuurvoeder β-caroteen
<i>Phaeodactylum</i>	EPA/DHA Aquacultuurvoeder
<i>Nitzschia laevis</i>	EPA
<i>Schizochytrium</i>	EPA/DHA β-caroteen
<i>Crypthecodinium</i>	EPA/DHA
<i>Odontella</i>	EPA/DHA
<i>Ulkenia</i>	EPA/DHA
<i>Isochrysis galbana</i>	Algenpasta Aquacultuurvoeder
<i>Pavlova lutheri</i>	Aquacultuurvoeder
<i>Chaetoceros</i>	Aquacultuurvoeder
<i>Skeletonema</i>	Aquacultuurvoeder
<i>Thalassiosira</i>	Aquacultuurvoeder
<i>Tetraselmis suecica</i>	Aquacultuurvoeder

**Arthrospira platensis/maxima*

In de volgende hoofdstukken wordt ingegaan op de specifieke producten uit algen. Binnen de aquacultuursector worden verschillende zoutwateralgen gekweekt als voer voor schelpdieren. *Chaetoceros*, *Isochrysis* en *P. tricornutum* zijn hiervoor geschikt maar zijn tegelijkertijd kwetsbare soorten of hebben beperkte voedingswaarde voor schelpdieren. Daarentegen zijn *Skeletonema costatum*, *Thallasiosira pseudonana* en *Tetraselmis suecica* veel robuustere soorten met een hoge voedingswaarde voor schelpdieren (Hohenadler, 2010). Spruijt et al (2014) geven de jaarlijkse productiecijfers van een aantal belangrijke algen en producten uit zoutwateralgen: *Spirulina* 3000 ton algen(producten)/jaar, *D. salina* 1200 ton algen(producten)/jaar, *Cryptocodinium cohnii* 240 ton DHA olie/jaar en *Schizochytrium* sp. 10 ton DHA olie/jaar. Vigani et al (2015) noemen globale productie volumes van 5000 en 2000 ton DS/jaar voor respectievelijk *Spirulina* en *Chlorella* met elk een productiewaarde van 40 miljoen dollar per jaar. Ook noemen zij productie volumes (in ton DS/jaar) voor astaxanthine (300), omegavetzuren (240) en beta-caroteen (1200). Figuur 1 laat wereldwijd de belangrijkste bedrijven zien die commerciële food en feed producten maken uit micro-algen.



Figuur 1 Globaal overzicht van aantal bedrijven per land en hun commerciële food en feed producten uit micro-algen. Data uit interviews met experts en literatuur. De kaart geeft de hoofdkantoren weer. Aantal en exacte locaties van de productielocaties zijn onbekend (uit: Vigani et al, 2015)

Tabel 2. Overzicht van de meest frequent genoemde zoutwateralgen in dit rapport en kweekcondities genoemd in de literatuur (bronnen staan in de paragrafen over individuele soorten)

Soort	Fylum	T opt	pH
<i>Arthrospira platensis</i>	Cyanobacteria	28-33°C	9-12
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> *	Heterokonta	21°C	7-9
<i>Dunaliella salina</i>	Chlorophyta	25°C	6.5-7.5
<i>Nannochloropsis</i>	Heterokonta	25°C	8.2
<i>Tetraselmis chuii</i>	Chlorophyta	20-23°C	7.8
<i>Odontella aurita</i>	Heterokonta	25°C	
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Chlorophyta	30°C	7.8
<i>Porphyridium purpureum</i>	Rhodophyta	20-26°C	6.5-8.0

<i>Diacronema vlkianum</i>	Haptophyta	18°C	
<i>Isochrysis galbana</i>	Haptophyta	18°C	7.3
<i>Tetraselmis chuii</i>	Chlorophyta	18°C	

*kweekmethode in Hohenadler (2010)

3 Inhoudsstoffen

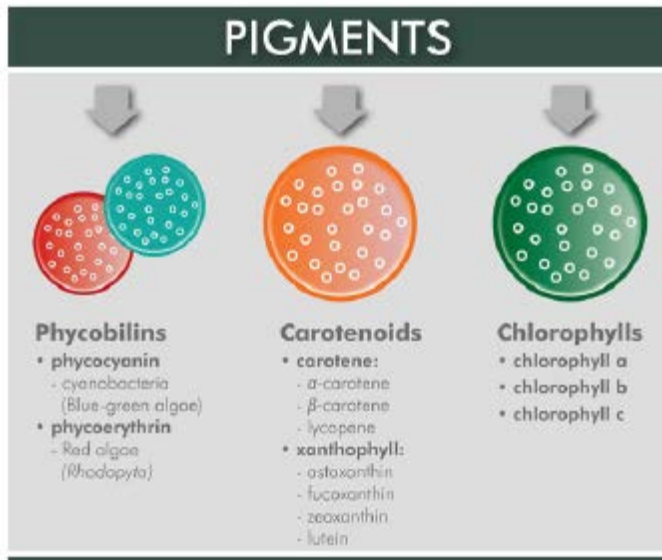
Algenextracten bevatten koolhydraten, eiwitten, mineralen, oliën, vetten, meervoudig onverzadigde vetzuren (PUFAs) maar ook bioactieve componenten zoals antioxidanten (polyfenolen, tocoferolen (vitamine E), vitamine C, mycosporine-achtige aminozuren) en pigmenten zoals carotenoïden (caroteen, xanthofyl), chlorofyllen en phycobilines (phycocyanine, phycoerythrine), die bijvoorbeeld antibacteriële of antioxidatieve eigenschappen hebben (Michalak & Chojnacka (2015)). Concentraties van deze stoffen variëren met type alg en groeiomstandigheden. Diatomeeën hebben bijvoorbeeld vaak hogere vetgehaltes dan andere algenklassen. Na analyse van 51 mariene diatomeeën bleek dat ze allemaal de volgende pigmenten bevatten: chlorofyl a (Chla), chlorofyl c₂ (Chlc₂), β-caroteen, fucoxanthine, diatoxanthine en diadinoxanthine. Het is een bekend verschijnsel dat microalgen reservestoffen produceren in de afwezigheid van essentiële groeifactoren (Mooij et al, 2013). N en P deficiëntie leiden bijvoorbeeld tot hogere vetgehaltes.

De focus van dit rapport ligt met name op pigmenten en in mindere mate op PUFAs en koolhydraten. Gele, oranje en rode pigmenten uit algen hebben industriële toepassingen in voedingsproducten en cosmetica als vitaminesupplementen en gezonde voedingsproducten en als voeradditieven voor pluimvee, vee, vis en kreeftachtigen. Prijzen voor een aantal inhoudsstoffen uit algen in de chemische industrie bedragen: β-caroteen 0,22-2,15 €/g, DHA 43 €/g, astaxanthine 7.000 €/g en phycobiliproteïnen 11.000-50.000 €/g (Batista et al, 2013). De voorspelde mondiale marktwaarde voor carotenoïden was in 2007 1 miljard dollar (Del Campo, 2007). De mondiale marktwaarden voor individuele carotenoïden (luteïne, astaxanthine, β-caroteen) liggen op enkele honderden miljoen dollars. Momenteel wordt de markt voor astaxanthine in de VS geschat op 200 miljoen dollar per jaar (Liu et al, 2014). β-caroteen is het eerste product dat commercieel geproduceerd werd uit de micro-alg *D. salina* en is ongeveer een factor twee duurder dan de synthetische equivalent (die 500 dollar per kg kost). De natuurlijke variant is populairder omdat het een mix van cis en trans isomeren is (Mary Leema et al, 2010). Van der Voort et al (2015a) beschrijven macro-economische aspecten van algen met data over volumes en prijzen van diverse algen en hun afgeleiden. Kent et al (2015) geven een overzicht van de pigmenten en andere inhoudsstoffen in microalgen (*Nannochloropsis* sp. en *Dunaliella* sp.) en commerciële microalgenproducten (*Spirulina* en *Chlorella*). De algen en producten verschillen vooral in astaxanthine en ω3 vetzuur gehalte. Michalak & Chojnacka (2015) beschrijven een aantal extractiemethoden voor microalgen, die de biologische actieve componenten niet afbreken, zoals extractie met enzymen, met een magnetron (MAE), vloeibare extractie onder druk (PLE), superkritische vloeistofextractie en extractie met ultrasoon geluid. Eén van de meest veelbelovende technieken is superkritische vloeistofextractie (SFE, bijvoorbeeld met CO₂) waarbij weinig tot geen organische oplosmiddelen verbruikt worden. PLE laat goede resultaten zien voor carotenoïden uit *D. salina* in vergelijking met traditionele extractiemethodes. MAE is zeer geschikt voor het extraheren van pigmenten uit zoutwateralgen. Onderstaand worden de belangrijkste pigmenten, vetten, koolhydraten en andere inhoudsstoffen uit micro-algen nader beschreven.

3.1 Pigmenten

Microalgen foto-acclimatiseren aan het beschikbare licht om hun lichtverzamelende efficiëntie aan te passen (Combe et al, 2015). Dit gebeurt door fysieke aanpassingen van het fotosynthese systeem binnen 1 celgroeicyclus. De aanpassingen omvatten

veranderingen in celpigmentatie of aantal/grootte van lichtverzamelende 'antennes'. Onder lage lichtintensiteiten nemen bepaalde pigmenten (zoals chlorofyl) vaak toe. Omgedraaid, nemen deze pigmenten af onder hoge lichtintensiteit om de cel te beschermen tegen foto-oxidatie. Voor andere pigmenten (zoals carotenoïden) geldt het omgedraaide: deze pigmenten beschermen juist tegen oxidatieve stress. Figuur 2 geeft een overzicht van de verschillende groepen pigmenten uit microalgen.



Figuur 2 Overzicht van de verschillende pigmenten in algen (overgenomen uit Michalak & Chojnacka, 2015)

1. Phycobilines

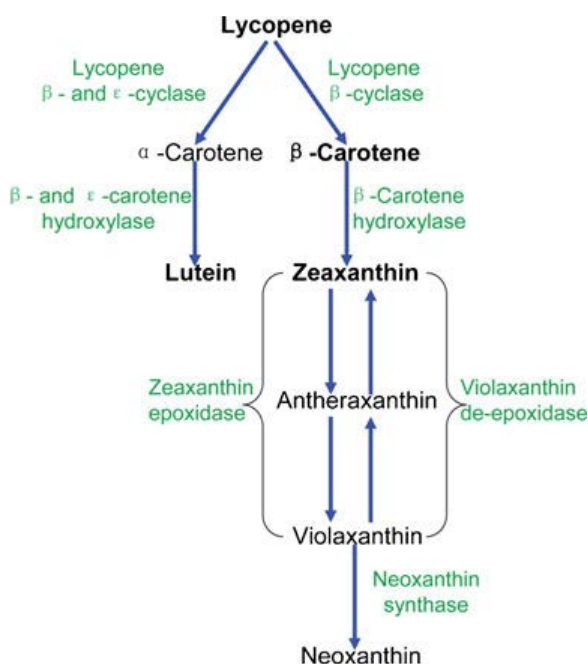
Phycobilines (PBs) zijn complexe lichtverzamelende pigmenten en kunnen o.a. gebruikt worden als kleurstoffen, fluorescente stoffen, antioxidanten en ontstekingsremmers. De pigmenten kunnen efficiënt bepaalde golflengtes opvangen die niet goed verwerkt kunnen worden door chlorofyl. Op die manier verhogen ze de fotosynthetische efficiëntie van microalgen. Phycobilines (chromoforen) zijn gebonden aan eiwitten in phycobiliproteïnen. Deze laatste zijn het belangrijkste onderdeel van phycobilisoomcomplexen. Guihéneuf & Stengel (2015) beschrijven dat PB's de belangrijkste secundaire lichtverzamelende pigmenten zijn in de algenstammen Cyanophyta, Cryptophyta en Rhodophyta en worden geclassificeerd op basis van hun spectroscopische eigenschappen (Tabel 5). PB's worden commercieel geproduceerd uit cyanobacteriën zoals *A. platensis* en uit rode microalgen zoals *Porphyridium* en *Rhodella*.

- a. Phycocyanines (phycoerythrocyanine, R-phycocyanine en C-phycocyanine (PC)) zijn paarse tot felblauwe wateroplosbare eiwitcomponenten, die als natuurlijk voorkomend lichtverzamelend pigment voorkomen in de antennecomplexen van o.a. cyanobacteriën, rode algen en cryptomonaden (Chen et al, 2013). C-PC is de meest bekende en het meest voorkomende pigment in microalgen. Het absorbeert efficiënt delen van golflengtes die juist slechter geabsorbeerd worden door chlorofyl. Deze eiwitten verbeteren dus de fotosynthetische efficiëntie van microalgen. De belangrijkste bron is *A. maxima* (*Spirulina*) (Batista et al, 2013) en het wordt gebruikt als natuurlijke voedings- en cosmetica kleurstof en als tracer in immunoassays. Het kan toxische synthetische pigmenten vervangen. Phycocyanine is een reservebron van stikstof in algen die in een stikstofarm medium leven. Phycocyanine-concentratie wordt bepaald door kweekcondities en kan wel 30% van de aanwezige droge stof vormen (Mary Leema et al, 2010).
- b. Allophycocyanines (APC) zijn blauw/groene eiwitpigmenten en komen veel voor in cyanobacteriën en rode algen. Ze hebben o.a. toepassingen in

immuno-assays. APC (allophycocyanine) komt in veel lagere gehalten voor dan C-PC.

- c. Phycoerythrines (PE) zijn rode eiwit-pigmenten en komen voor in rode algen en cryptomonaden. Ze vangen blauw/groen/geelachtig licht in (het absorptiemaximum ligt rond 565 nm) en geven het meestal door aan reactiecentra van chlorofyl via PC en APC. PE hebben diverse laboratoriumtoepassingen zoals immunofluorescentie.
2. Chlorofyllen zijn een aantal nauw verwante groene pigmenten die voorkomen in cyanobacteriën en in de chloroplasten van algen en planten. Het zijn zog. chlorinepigmenten met magnesium in het centrum van de chlorinering. Chlorofyl is een zeer belangrijk biomolecuul aangezien het in planten zorgt voor energieproductie uit licht. Het absorbeert voornamelijk blauw licht, gevolgd door rood licht. Verschillende (structuur)vormen zijn chlorofyl a, b, c1, c2, d en f. Hiervan is chlorofyl a de meest voorkomende. Chlorofyl kan gebruikt worden als voedingskleurstof (E140). Chlorofyllen zijn essentieel voor lichtopvang, terwijl carotenoïden fundamenteel zijn voor bescherming tegen oxidatieve stress.
3. Carotenoïden

Carotenoïden omvatten carotenen (die alleen bij planten voorkomen) en xanthofylle kleurstoffen (die zowel bij planten als bij dieren voorkomen). Carotenoïden spelen meerdere essentiële rollen in fotosynthese. Ze dragen bij aan lichtopname, behouden structuur en functie van fotosynthesecomplexen, doven chlorofyl triplet toestanden, vangen reactieve zuurstofsoorten in en stralen overvloedige energie uit. Bètacaroteen en de xanthofyllen astaxanthine, cantaxanthine en luteïne zijn de belangrijkste carotenoïden met commerciële relevantie (Del Campo et al, 2007; Guihéneuf & Stengel, 2015). Xia et al (2013a) algencellen reageren op stress condities (zoals hoge lichtintensiteit en nutriëntdepletie) door het aanmaken van secundaire carotenoïden (bijv. β -caroteen, astaxanthine, luteïne), die dienen als lichtbeschermende stoffen. De carotenoïde samenstelling van microalgen hangt af van omgevingsfactoren zoals T, pH, nutriënt concentraties, lichtintensiteiten, cel dichtheid, beluchting en fysiologische staat van de cultuur (Gómez-Loredo et al, 2015).



Figuur 3 Voorgestelde route voor het carotenoïde metabolisme in *Dunaliella salina* gebaseerd op *C. reinhardtii* in KEGG database (Overgenomen uit Fu et al, 2013)

a. Carotenen

- i. β -caroteen is de belangrijkste primaire bron van vitamine A en noodzakelijk voor het functioneren van het oog. *A. platensis* is de rijkste bron voor deze stof, maar de belangrijkste productie-alg hiervoor is *D. salina* met gehalten die oplopen tot 16% van de droge stof (Kovač et al, 2013). Het is een pigment waar toenemende vraag naar is en kent een breed spectrum aan toepassingen: als voedingskleurstof (belangrijkste toepassing), als provitamine A (retinol) in voeding en diervoeder, als toevoeging aan cosmetica en multivitaminepreparaten en als gezond voedingsproduct met antioxidatieve werking (Del Campo et al, 2007).

b. Xanthofylle kleurstoffen

- i. Fucoxanthine wordt meestal gewonnen uit eetbare bruine zeewieren (Fu et al, 2015) maar dit proces is nog niet commercieel haalbaar. Diatomeeën kunnen echter ook rijk zijn aan dit carotenoïde en hebben daarnaast lage jodiumconcentraties. Gómez-Loredo et al (2015) beschrijven dat de concentratie in microalgen tussen 2 en 18 mg/g DS (in *I. galbana*) varieert en dit is drie keer hoger dan in macroalgen. Samen met chlorofyl a, c en een apoproteïne vormt het een belangrijk lichtverzamelend complex (Xia et al, 2013a). Fucoxanthine is een primair carotenoïde (i.t.t secundaire carotenoïden die beschermen tegen overmatig licht), dat zorgt voor transport van lichtenergie naar de fotosynthetische reactiecentra (Xia et al, 2013a). Onder stressomstandigheden zoals hoge lichtintensiteiten nemen secundaire carotenoïden dus toe, terwijl chlorofyl en andere pigmenten die betrokken zijn bij fotosynthese afnemen. Fucoxanthine heeft sterk antioxidatieve eigenschappen en is geschikt voor toepassingen in humane voeding. Er wordt onderzoek gedaan naar verschillende gezondheidsbevorderende effecten van deze stof. Het kan ook als een diervoederadditief gebruikt worden in de pluimvee- en aquacultuursector.
- ii. Luteïne wordt toegepast voor de preventie en behandeling van een verscheidenheid aan ziektes. Het is een van de belangrijkste carotenoïden in voeding en menselijk serum en is samen met zeaxanthine een essentiële component van het pigment in de gele vlek van ogen en in de ooglenzen. Het wordt gebruikt als voedingskleurstof en vooral als voeradditief in de pluimvee- en aquacultuursector (Del Campo et al, 2007). De meeste bekende luteïne-producerende alg is *Scenedesmus almeriensis* en concentraties van 0.5 % van het drooggewicht worden genoemd, wat ca. 10x zo hoog is als in goudsbloemen, de traditionele bron van luteïne.
- iii. Zeaxanthine is de eerste downstream metaboliet van β -caroteen en wordt toegepast voor aandoeningen van het oog. Zowel voor deze stof als voor luteïne moeten de effecten nog wetenschappelijk onderbouwd worden.
- iv. Astaxanthine wordt vooral gewonnen uit *Haematococcus pluvialis*, maar kan ook geproduceerd worden uit *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis*, *Coelastrella striolata* var. *multistriata*, *Chlorococcum* spp., en *Botryococcus braunii*. In deze soorten zijn de concentraties echter veel lager dan in *H. pluvialis*. Het is een hoogwaardige keto-carotenoïde met een breed spectrum aan toepassingen in voedings-, voeder-, nutraceutische en farmaceutische industrieën (Liu et al,

2014). De belangrijkste toepassing is kleurstof in de aquacultuursector, voornamelijk in zalm, forel, en rode zeebrasem (Del Campo et al, 2007). De astaxanthine markt in de VS wordt geschat op 200 miljoen US\$ per jaar. *H. pluvialis* wordt in grootschalige gesloten fotobioreactoren of buitensystemen gekweekt in een tweetraps proces. Eerst wordt er biomassa geaccumuleerd, vervolgens wordt astaxanthine productie geïnduceerd (bijv. door zoutstress). De verwachting is dat natuurlijke astaxanthine uiteindelijk de van aardolie afgeleide synthetische variant van de markt zal verdrijven als productiekosten lager worden en consumenten voordelen van het natuurlijke product zien. Antioxiderende carotenoïden en met name astaxanthine worden in de alg geproduceerd om de cellen tegen ROS te beschermen.

3.2 Vetten

Vetten uit algen hebben drie toepassingen: biobrandstoffen, aquacultuurvoeders en menselijke voedingssupplementen. Voor deze laatste twee toepassingen zijn langketenige PUFAs relevant terwijl voor biobrandstofproductie de focus vooral ligt op kortketenige vetzuren met weinig dubbele bindingen (Chauton et al, 2013). Naast neutrale vetten (TAGs) als precursors voor de productie van biodiesel is zetmeel uit algen de belangrijkste precursor voor bioethanol, CH₄ en H₂ productie (Mooij et al, 2013). De neutrale vetfractie is belangrijk voor biodieselproductie aangezien deze gemakkelijk omgezet kunnen worden in methyl esters van vetzuren (FAMES) door omestering (San Pedro et al, 2013). PUFAs kunnen geoxideerd worden tijdens transport en opslag en mogen daarom niet meer dan 1% van de biodiesel vormen. Naast neutrale vetten bevatten algen polaire vetten (Xia et al, 2013b). Polaire vetten bevatten meer PUFAs. Ze zijn vooral geassocieerd met chloroplasten en andere membranen en algen bevatten voornamelijk deze vetten onder optimale groeiomstandigheden. Onder stressomstandigheden (nutrientdeficiënties en foto-oxidatieve stress) en bij toenemende levensduur stopt de groei en maken algen vaak neutrale vetten (SFAs en MUFAs) aan die ze opslaan in vetbolletjes. Deze dienen als C en energieopslag voor gebruik tijdens verhongering. Bij oxidatie van neutrale vetten komt er meer energie vrij dan bij de oxidatie van PUFAs.

De drie belangrijke PUFAs zijn DHA, EPA en GLA.

- DHA (docosahexaeenzuur) of C22:6 ω 3 is een omega 3-vetzuur dat vooral voorkomt in vette zeevis en/via micro-algen. Het komt voor in de klassen Dinophyceae, Prymnesiophyceae en Euglenophyceae. Voorbeelden van DHA gehalten in commercieel beschikbare oliën uit microalgen zijn 35-45% in *Cryptothecodinium cohnii*, 35-40% in *Ulkenia* sp. en 35-40% in *Schizochytrium* sp. Martins et al (2013) geven in tabelvorm een overzicht van DHA producerende mariene algen. De heterotrofe microalgen *Cryptothecodinium cohnii*, *Schizochytrium* sp. en *Ulkenia* sp. zijn goede bronnen van DHA. Bij sommige algensoorten kan de biomassa tot wel 50% bestaan uit vetten, waarvan tot 70% kan bestaan uit DHA.
- EPA (eicosapentaeenzuur) of C20:5 ω 3 is een omega 3-vetzuur dat ook met name voorkomt in vette zeevis en/via micro-algen. Het wordt geproduceerd in de klassen Cryptophyceae, Prasinophyceae, Rhodophyceae, Xanthophyceae, Glaucophyceae en Eustigmatophyceae. Commercieel beschikbare olie uit *Nannochloropsis oculata* bevat bijvoorbeeld 25-30% EPA. Martins et al (2013) geven in tabelvorm een overzicht van EPA producerende mariene algen.

- GLA (gamma-linoleenzuur) of C18:3 ω 6 is omega 6-vetzuur, waarvan bewezen is dat het gezondheidsbevorderende effecten heeft (Kovač et al, 2013). *A. platensis* bevat relatief veel van dit vetzuur in vergelijking met andere soorten.

Deze vetten uit algen worden in toenemende mate verwerkt in menselijke voeding(supplementen). Ze lijken goed verdragen te worden en er worden geen negatieve bijwerkingen gemeld, behalve het optreden van een vismaak bij het gebruik van hoge doses DHA (Martins et al, 2013).

De inductie van vetbiosynthese kan door verschillende omgevingsstressfactoren gestimuleerd worden, zoals nutriëntenstress (N of P limitatie), osmotische en zoutstress, bestralingsintensiteit, UV, pH, T, C-bron en de aanwezigheid van metalen (Pasquet et al, 2014). Onder optimale groeiomstandigheden neemt de biomassa vaak sterk toe, maar blijft het vetgehalte laag. Temperatuurstress kan verschillende effecten hebben op groei, fotosynthetische activiteit en ook op de biochemische samenstelling van algen. In diatomeeën zijn stijgende temperaturen vaak geassocieerd met lagere vetgehalten. In de meeste soorten nemen PUFA concentraties, zoals EPA, af als er nutriëntlimitatie optreedt en dit gaat meestal samen met een toename van het aandeel SFAs en/of MUFAs. Als de omgevingstemperatuur afneemt verhogen vrijwel alle poikilotherme organismen hun concentratie onverzadigde vetzuren (vooral PUFAs) om de membraanlipiden voldoende vloeibaar te houden (Hazel, 1995; Zhao et al, 2014). Ondanks dat N limitatie de meest succesvolle manier is om intracellulaire vetten op te hopen, hebben cellen onder deze omstandigheden sterke stressverschijnselen door het extreme nutriëntgebrek waaronder zwaar achteruitgaande celgroei. Dit heeft een negatief effect op de totale biomassa- en vetproductie (Kim et al, 2014). Over het algemeen leidt N limitatie tot beperkingen in eiwitsynthese en celcyclusvoortgang in een vroeg stadium, terwijl P limitatie vaak leidt tot het stoppen van de celcyclus in de G2 en M fase, als de cellen groot zijn en zich voorbereiden op deling (Chauton et al, 2013).

Mooij et al (2013) passen een cyclische kweekmethode toe ('survival of the fattest') waarbij er gedurende de lichte periode (12 uur) CO₂ zonder stikstofbron gedoseerd wordt. Gedurende de donkere periode (12 uur) wordt de culture wel van een stikstof bron (NH₄⁺) voorzien. Deze stikstofbron is uiteindelijk na het doorlopen van een aantal licht/donker cycli volledig uitgeput aan het einde van elke donkere periode. Door deze cyclus vele malen te herhalen wordt geselecteerd op reservestof-accumulerende (bijv. polyglucose) algen en worden algen die dit niet doen uitgespoeld. *Nitzschia frustulum*, een zout/zoetwater alg die vetten bevat, werd op deze manier opgehoopt. Er wordt dus niet geselecteerd op een bepaalde soort, maar op een bepaalde reservestof uit een natuurlijke populatie microalgen.

3.3 Koolhydraten

Polysachariden (agar, alginaten en carrageenananen) zijn wereldwijd belangrijke producten uit algen, meestal macroalgen (Kovač et al, 2013). Ook micro-algen kunnen deze componenten maken: de micro-alg *P. purpureum* synthetiseert en scheidt waardevolle polysachariden uit die als substituuut kunnen dienen voor carrageenan. Deze gesulfateerde polysachariden hebben diverse gezondheidsbevorderende effecten (Guihéneuf & Stengel, 2015). De cellulaire koolhydraten (57% van het DS), kunnen daarnaast de C bron vormen voor eerdergenoemde bioethanolproductie d.m.v. fermentatie. Celwand polysachariden en zetmeel kunnen vaak opgehoopt worden door NO₃-depletie.

3.4 Andere

α -tocoferol, is de meest biologisch actieve vorm van vitamine E (Kovač et al, 2013). Deze stof wordt o.a. geproduceerd door *T. suecica* die in aanmerking komt voor commerciële productie.

4 Wetgeving

De wetgeving op het vlak van algentoepassingen in menselijke voeding en diervoeders is voortdurend in beweging. Per mei 2016 is er een nieuwe Novel Food wet aangenomen en binnen twee jaar zal duidelijk worden wat hiervan de gevolgen zijn (Kroon, 2016).

4.1 Voeding (food)

Om toegelaten te worden in menselijke voeding moeten algen en hun producten een foodgrade status hebben. *Spirulina* werd al toegepast voor 1997 en is daarom toegestaan (Novel Food Catalogue, 2016). Dit geldt ook voor *Odontella aurita* en *Chlorella vulgaris* (Kroon, 2016). Bij nieuwe soorten (of toepassingen) dient er een procedure doorlopen te worden en deze procedure kan op nationaal niveau variëren. Van bepaalde soorten wordt alleen de (EPA en/of DHA bevattende) olie gebruikt (bijv. *Schizochytrium*) i.p.v. de hele cel. Dit product valt dan onder Novel Food Ingredients.

4.2 Diervoeder (feed)

Voor diervoedertoepassingen van algen in de EU zijn geen soortdefinities gegeven (Kroon, 2016). In de Catalogus van voedermiddelen (EU verordening 68/2013) worden allerlei varianten van hele algen of algencomponenten beschreven onder 7. *Overige planten, algen en daarvan afgeleide producten*. Hierdoor kunnen soortenmixen door de NVWA (Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit) ook erkend worden voor diervoedertoepassingen. In Spruijt et al (2014, hoofdstuk 3) wordt een overzicht gegeven van relevante wetgeving omtrent algen als veevoeringrediënt. Van der Voort (2015b) bespreekt de wetgeving omtrent het gebruik van algen in diervoeders en menselijke voeding. Enzing et al (2014, hoofdstuk 5) geven een overzicht van de EU wetgeving op dit gebied. Ook geeft Tabel 3 een overzicht van algen die relevant zijn voor food/feed toepassingen met bijbehorende veiligheidsstatus bepaald door de FDA (VS) (Enzing et al, 2014). De diervoedersoorten die in de tabel genoemd worden, zijn vooral in gebruik in de aquacultuursector voor de opkweek van vislarven (Kroon, 2016). Deze soorten bevatten essentiële omega-vetzuren en vitamines en zijn relatief gemakkelijk te kweken in monoculturen.

Tabel 3 Overzicht van algen die relevant zijn voor feed/food toepassingen met hun veiligheidsstatus vastgesteld door de FDA (VS) (GRAS= generally recognized as safe, NT= no toxins known)

Organisme	Soort	Status	Organisme	Soort	Status
Cyanobacteria	<i>Spirulina /Arthrospira</i>	GRAS		<i>Schizochytrium</i>	GRAS
	<i>sp****.</i>				
Heterokontophyta	<i>Synechococcus sp</i>	NT	Chlorophyta	<i>Tetraselmis sp*</i>	NT
	<i>Navicula sp.</i>	NT		<i>Chlorella sp</i>	GRAS
	<i>Phaeodactylum</i>	NT		<i>Dunaliella sp</i>	NT
	<i>tricornutum</i>		Haptophyta	<i>Isochrysis sp</i>	NT
	<i>Odontella aurita</i>	NT		<i>Pavlova sp3</i>	NT
	<i>Skeletonema sp**</i>	NT		<i>Porphyridium</i>	GRAS
	<i>Nannochloropsis sp.</i>	NT	Rhodophyta	<i>cruentum</i>	
				<i>(purpureum)</i>	
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	NT		<i>Cryptocodinium cohnii</i>	GRAS

*chuii, subcordiformis, **costatum, ***gaditana, ****platensis/maxima

4.3 Zoutwatalgen

Wat zoutwatalgen betreft zijn β -caroteen uit *Dunaliella* en DHA uit *Cryptocodinium cohnii* goedgekeurd als voedingsingrediënten door de EFSA en wordt *Spirulina* algemeen als voedingssupplement verkocht in de VS en de EU (Enzing et al, 2014). Ook staat olie uit *Schizochytrium* in het Europese Feed Materials Register (<http://www.feedmaterialsregister.eu>) Recent toegelaten als Novel Foods zijn *Tetraselmis chuii*, EPA en DHA uit *Schizochytrium sp.* en *Nannochloropsis gaditana*. Ook *Odontella aurita* is toegelaten als een Novel Food (Buono et al, 2014). Ook staat 'Waterig of alcoholhoudend algenextract dat hoofdzakelijk koolhydraten bevat' op de lijst van toegestane producten voor GMP+.

5 Kweekmethodes en invloed van procesparameters

5.1 Knelpunten bij grootschalige kweek

Zonder waterhergebruik is er voor de productie van 1 kg droge algenbiomassa 700 liter water nodig in buisfotobioreactoren en tot 4000 liter in raceway vijvers (San Pedro et al, 2013). Het kweken van mariene algen voorkomt dit hoge zoetwaterverbruik. Door de onevenwichtige verdeling van algen in fotobioreactoren en vijvers wordt de fotosynthetische productiviteit van algen verlaagd en is veel lager dan wat onder laboratoriumcondities bereikt wordt. De belangrijkste knelpunten bij grootschalige kweek zijn dan ook onder te verdelen in 'hoge kosten' en 'lage efficiëntie' (Zhang et al, 2016). Oplossingen worden verwacht door kweek op afvalwater, hergebruik van water en nutriënten, gebruik van de complete biomassa, selectie van inheemse stammen, kweken van gemengde soorten, doseren van goedkope organische nutriënten, verticale menging in de reactor en optimalisatie van het metabolisme en groei op drager systemen.

5.2 Kweekmedia

Er zijn verschillende soorten cultuurmedia voor zoutwateralgen (Andersen, 2005). Onderstaand wordt een selectie weergegeven voor niet-specifieke media.

Kunstmatig zeewater media

1. Aquil medium (improved)
2. ASP-2 medium + NTA
3. ESAW medium
4. CCAP artificial seawater
5. ASN-III medium

Verrijkte kunstmatig zeewater media

1. ES medium
2. West and McBride's modified ES medium
3. ESNW medium
4. f/2 medium
5. L1 medium
6. MNK medium
7. PC medium

Grond-water verrijkte natuurlijk zeewater media

1. Plymouth Erd-schreiber medium (PE)

Bacterie en schimmel test media voor zeewater

1. f/2 peptone test medium
2. f/2 methylamine test medium
3. f/2 peptone-methylamine test medium
4. Malt medium in seawater (fungi)

Algenbanken verstrekken alle bijbehorende media recepten bij de algen die zij in hun collectie hebben. Appendix I geeft een overzicht van de media die in de literatuur voor dit rapport toegepast worden.

5.3 Invloed van licht, nutriënten, zout, druk en mutaties op groei en inhoudsstoffen van zoutwatalgen

5.3.1 Licht

Lichtstraling kan gevaarlijk zijn omdat het tot de vorming van ROS (reactieve zuurstofsoorten, bijv. $^1\text{O}_2$, O_2^- en $-\text{OH}$) en oxidatieve stress kan leiden. Hydroxyl radicalen zijn de meest schadelijke vrije radicalen (Xia et al, 2014). De PSII component van het fotosynthese systeem wordt continu beschadigd en geïnactiveerd tijdens fotoinhibitie. Dit complex moet dus continu gerepareerd worden door herstel van beschadigde componenten. Fotosynthetische organismes hebben mechanismes ontwikkeld om lichtopvang-efficiëntie te optimaliseren. Een van deze mechanismes is lichtaanpassing, waar de samenstelling van het fotosynthese systeem geoptimaliseerd wordt in verhouding tot de stralingsintensiteit. Tijdens aanpassing aan verschillende lichtintensiteiten kunnen fotosynthetische organismes twee strategieën gebruiken om hun lichtopvang-efficiëntie en pigmentinhoud te veranderen (Simionato et al, 2011): de eerste is een toename van de antennegrootte, i.e. het aantal chlorofyl/eiwitten van elk reactiecentrum van het lichtopvangsysteem. De tweede is een toename van het aantal reactiecentra.

Fotoreceptoren van algen zijn zeer rijk in structuur en functie. Fotosynthese complexen zijn opgebouwd uit chlorofylachtige moleculen waaronder chlorofyl a, b, c, d, en e, bacteriochlorofyllen, feofytine a en b en andere pigment moleculen zoals carotenoïde α en β en xanthofyllen (Parlevliet & Moheimani, 2014). Energie wordt verzameld door de antennecomplexen en overgebracht via een soort trechter naar beneden naar lager liggende chlorofyl bevattende reactie centra pigment complexen. Het aantal reactiecentra in fotosynthetische organismes is aanzienlijk kleiner dan het aantal pigment moleculen en de meeste pigmenten functioneren als antenne. Fotosynthetisch actieve straling (PAR, zie verderop in deze paragraaf) maakt slechts 45-48% van het licht uit. De theoretisch maximale efficiëntie van zonne-energie omzettingen is tussen 11 en 12% (110 W/m^2 - 120 W/m^2), maar de gemiddelde huidige fotosynthetische efficiëntie ligt maar tussen 2 en 5%. Dit verschil kan verklaard worden doordat 1. Niet alle licht ingevangen kan worden door de pigmenten 2. Alleen maar een deel van PAR omgezet kan worden en 3. Omdat licht en donker respiratie de totale efficiëntie kunnen verlagen. Overvloedig licht verdwijnt als hitte of fluorescentie om beschadiging van het fotosynthese apparaat te voorkomen. Fotosynthese benut aldus 25% van het zonnenspectrum (meestal blauwe en rode golflengtes) en de rest wordt gereflecteerd of verwarmt het kweekmedium. Golflengtes van 400-700 nm zijn actief voor fotosynthese (PAR= fotosynthetisch actieve straling). Natuurlijk zonlicht is niet optimaal voor algencelgroei, omdat het o.a. UV en IR stralen omvat die cellen kunnen beschadigen (Michael et al, 2015). Deze schade is vooral zwaar wanneer de lichtintensiteit hoog is ($\text{PAR} > 750 \mu\text{mol/s/m}^2$) wat vaak voorkomt op een zonnige dag in open buitenvijvers of in fotobioreactoren waar de lichtintensiteit op kan lopen tot $2000 \mu\text{mol/s/m}^2$. Toch kunnen in sommige specifieke gevallen hoge lichtintensiteiten en daglengte de productie van specifieke componenten zoals eiwit of β -caroteen verhogen. Sommige cyanobacteriën kunnen hun pigmentconcentraties aanpassen naar lichtkwaliteit en – kwantiteit (Markou, 2014). Sommigen veranderen bijv. hun phycoerythrine gehalte en anderen zowel phycoerythrine als phycocyanine.

In vergelijking met groene algen hopen diatomeeën mogelijk meer carotenoïden op als gevolg van veranderingen in lichtintensiteit (Fu et al, 2015). Dit wordt veroorzaakt doordat ze geen chlorofyl b bezitten, dat primair blauw licht absorbeert, en hun lage concentratie chlorofyl c, dat aanwezig is als een bijkomende chlorofylsoort in de

lichtverzamelende antennes van fotosysteem II. Een hoger aandeel hoogfrequente groene golflengtes zou gunstig kunnen zijn voor hoge dichtheden groene algen in fotobioreactoren met een lange lichtweg omdat groene licht grotere afstanden kan afleggen in een culture met lagere fotonabsorptie aan het oppervlak.

Celgroei in grootte en in aantal heeft grote invloed op lichtabsorptie (Lamers et al, 2012). Groeisnelheden worden op hun beurt weer beïnvloed door de mengintensiteit van het medium, daar dit bepaalt hoeveel licht de cellen ter beschikking hebben (Cohen, 1999). Een voorbeeld voor *S. platensis* is te vinden in tabel 15.2 in voorgaand boek. Des te hoger de lichtintensiteit, des te hoger de celdichtheid en des te groter is de invloed die de mengintensiteit heeft op de productie. Dit is tegelijkertijd ook soortafhankelijk: bij *N. salina* is de invloed van mengintensiteit veel kleiner omdat de cellen kleiner zijn. De optimale mengintensiteit bij deze soort vereist veel minder energie t.o.v. de zeer grote filamenteuze cel-aggregaten van *S. platensis*. De groeisnelheid van deze laatste soort kan daarnaast 5x zo hoog worden door deze mixotroof te kweken met glucose (Kovač et al, 2013).

Fototroof kweken is voor het produceren van pigmenten waarschijnlijk het gunstigst doordat er geen organische substraten of verontreinigingen aanwezig zijn en omdat het positief is voor het afvangen van CO₂ (Xie et al, 2015). LEDs zijn een veelbelovende lichtbron. Ze hebben een lange levensduur (tot 50.000 u), lage warmteproductie en hoge omzettingsefficiënties. Ze kunnen specifieke golflengtes genereren, zijn goedkoop en flexibel in hun design en werken bij lage voltages (<4V) en stroom (<700 mA) (Markou, 2014). Natuurlijk licht kan gecombineerd worden met LED licht in outdoor fotobioreactoren (Fu et al, 2015). Onderstaande Tabel 5 geeft een overzicht van golflengtes die uitgezonden worden door verschillende kleuren LEDs en de absorptiepieken van een aantal bekende inhoudsstoffen en algen. Metingen bij hogere golflengtes (750 nm) worden vaak gedaan omdat dit een betere indruk geeft van de celdichtheid zonder beïnvloeding door pigmenten.

Tabel 5 Overzicht van golflengtes behorende bij verschillende kleuren LEDs en piek lichtabsorpties van microalgen en hun inhoudsstoffen

LED kleur (monochromatisch)	Uitgezonden golflengte (nm)
Groen	525/550
Rood	660/680
Blauw	470/475
Geel	590
Roze (dichromatisch)	440 en 620
Inhoudsstof	Piek lichtabsorptie (nm)
<i>A. platensis</i> phycocyanine	620
<i>A. platensis</i> chlorofyllen	435 en 676
<i>A. platensis</i> carotenoiden	500
<i>C. protothecoides</i> carotenoiden	450-470
<i>O. aurita</i> fucoxanthine	448
Phycoerythrine	540-570 (roze/rode kleur)
Phycocyanine	610-620 (blauwe kleur)
Allophycocyanine	650-655 (blauw/groene kleur)
Fucoxanthine	490
Alg	Piek lichtabsorptie (nm)
<i>P. tricornutum</i>	730
<i>P. tricornutum</i>	750
<i>S. maxima</i> , <i>I. galbana</i> , <i>D. vlkianum</i>	540
<i>A. platensis</i>	680
<i>A. platensis</i>	560
<i>N. gaditana</i>	750
<i>O. aurita</i>	750
<i>T. chuii</i>	750
<i>T. suecica</i>	750

Het gebruik van rood licht i.p.v. PAR verbetert de fotosynthese en leidt tot verbeterde microalgengroei (Das et al, 2011a). Lichte blootstelling aan blauw licht kan daarentegen de schade die veroorzaakt wordt door rood licht herstellen. In hun proeven wordt de lichtintensiteit langzaam opgevoerd, omdat dit fotoinhibitie voorkomt (ILI=incremental light intensity). Dit leidt tot een energiebesparing van 19%. Dit zou nog verbeterd kunnen worden door de monsterfrequentie op te voeren en de stapjes waarmee de lichtintensiteit omhoog gaat, kleiner te maken (i.e. 10-20 lux). De golflengte van licht kan, naast het gebruik van speciale LEDs, ook gestuurd worden door filters (gemaakt van dunne film nano-materiaal) te gebruiken die specifieke golflengtes doorlaten (Michael et al, 2015). Rode filters (620-710 nm) en blauwe filters (450-495 nm) werden onderzocht op hun effecten op groei van *C. vulgaris*. Biomassaopbrengst in plaatreactoren en biomassaproductie in roterende algenbiofilmreactoren namen significant toe door het gebruik van deze filters. Dit zou te maken kunnen hebben met het wegvangen van UV straling door de filters. De biomassasamenstelling veranderde niet door toepassing van de filters. Parlevliet & Moheimani (2014) beschrijven een theoretisch systeem waarin zowel de productiviteit van algenkweeksystemen als de energie-efficiëntie verhoogd wordt. Dit doen ze door filters te gebruiken die een deel van het spectrum doorlaten voor algengroei (blauw en rood licht) en het andere deel omzetten in elektriciteit. Mogelijk voorbeelden voor dit soort filters zijn speciaal gemaakte semitransparante dunne film zonnepanelen, luminescente zonneconcentrators of andere geavanceerde energie-invangende glazen platen, die overeenkomen met het spectrum dat niet gebruikt wordt door de algen. De elektriciteit kan dan weer gebruikt worden om de productiviteit van de algenkweek te verhogen (ondersteunende processen of extra belichting). Het toepassen van flitsen sterk licht (flashing) kan leiden tot hogere productiviteit door de vorming van gereduceerde elektronen transporters, die verwerkt kunnen worden in de volgende donkere periode (Perin et al, 2014). Het optimaliseren van mengsnelheden kan dus leiden tot een efficiënte afwisseling van lichte en donkere fases in een fotobioreactor en een verbetering van de fotosynthetische efficiëntie van de hele culture. Algemeen leidt een hoge L/D frequentie tot hogere groeisnelheden, wat erop wijst dat te lang verblijf van algen in het donker onrendabel is uit commercieel oogpunt, omdat het leidt tot verminderde biomassa (Xue et al, 2011). Een hoge L/D frequentie kan in reactoren aangehouden worden door hoge graad van turbulentie/menging. Het is niet zo dat maximale lichtconcentraties automatisch leiden tot hoge concentraties inhoudsstoffen ter bescherming. Lage lichtintensiteiten en schaduwprocessen tussen de cellen zelf door celgroei zijn aantoonbaar verantwoordelijk voor een vijfvoudige toename van carotenoïde productie (Gómez-Loredo et al, 2015). Ook verlengde blootstelling aan niet-verzadigende lichtintensiteiten leidt tot hogere carotenoïde concentraties.

5.3.2 Nutriënten

De kosten van nutriënten vormen 15-20% van de totale kosten voor productie van microalgen op grote schaal (Mary Leema et al, 2010). De optimale N:P ratio voor mariene biomassa (Redfield ratio) is 16:1. Voor diatomeeën is de optimale Si:N:P ratio 15:16:1 (Redfield-Brzezinski ratio). Razaghi et al (2014) beschrijven dat optimale N:P ratios soortspecifiek zijn en variëren van 8.2-45. Chauton et al (2013) geven een mediane C:N waarde voor de meeste mariene microalgen onder niet-limiterende condities van 7, maar deze varieert tussen 3 en 17. Guihéneuf & Stengel (2015) beschrijven dat de cellulaire N concentratie van de meeste microalgensoorten rond de 7-10% van het DS is gedurende gebalanceerde groeiomstandigheden. Daarom kan de biomassa van sommige soorten met een factor acht toenemen nadat N volledig uitgeput is. NO₃ is een belangrijke component van groeimedia, en heeft direct invloed op groei en samenstelling van microalgen, omdat het synthese van eiwit en chlorofyl beïnvloedt. Stikstof depletie is een gangbare manier om vetten op te hopen in microalgen voor de productie van biodiesel. Xia et al (2013b) vermelden dat

verschillende soorten een andere P vraag hebben voor optimale groei. Zo leidt P limitatie in *P. tricornutum*, *Chaetoceros* sp. en *Pavlova lutheri* tot verhoogde vetophoping, maar in *Nannochloris atomus* en *Tetraselmis* sp. juist tot een verlaging. Campenni et al (2013) beschrijven dat N en P limitatie leiden tot vetten/TAG (triacylglyceriden) accumulatie. Voor een stikstofvrij medium kan KNO_3 vervangen worden door KCl (Lamers et al, 2012).

Chen et al (2013) melden dat de maximale C-phycoyanine productie meestal wordt bereikt vlak voordat N-depletie optreedt en drastisch afneemt nadat NO_3 uitgeput is. Op dat moment beginnen de microalgen waarschijnlijk de phycobiliproteinen te gebruiken als N-bron. Het tijdstip van oogsten is dus cruciaal voor de commerciële productie van C-phycoyanine en moet afgestemd worden op biomassagroei en de hoeveelheid overgebleven N.

5.3.3 Zout

Zoutstress kan bij de zoetwateralgen *Chlorella zofingiensis* en *H. pluvialis*) astaxanthine productie induceren (Liu et al, 2014). *C. zofingiensis* kan 0.1M NaCl (6 g/L, komt overeen met een EC van ~ 9 mS/cm) verdragen met een kleine impact op groei, maar bij een verdere toename tot 0.2 en 0.4 M vermindert de uiteindelijke celdichtheid significant met respectievelijk 30 en 50%. 0.2 M resulteert echter ook in de hoogste astaxanthine opbrengst, die 60% hoger is dan in zoutvrije cultures.

Typische concentraties astaxanthine liggen bij deze alg tussen 1 en 7 mg/kg drooggewicht. Een andere studie geeft 0.08 M NaCl als de optimale concentratie voor astaxanthine productie, maar de omstandigheden waren mogelijk anders in deze studie. Een mogelijke verklaring voor de inductie is dat hoge lichtintensiteiten en zoutstress leiden tot de vorming van diverse vormen van ROS, wat leidt tot hogere astaxanthine productie, als overlevingsstrategie tegen foto-oxidatie en andere stressfactoren. Volgens Martins et al (2013) leiden hoge zoutconcentraties tot hogere vetgehaltes in *Nannochloropsis*, maar bij lagere zoutgehaltes neemt het EPA gehalte toe.

5.3.4 Druk en mutaties

Onder druk kunnen er veranderingen optreden in de pigmenten van algen (Brody and Stelzig, 1983). De lichtabsorptie van chlorofyl, phycoerythrine en phycocyanine nam toe door verhoogde druk (250 bar) toe te passen op *P. purpureum*. De lichtdistributie in een fotobioreactor kan verbeterd worden door het gebruik van gemuteerde algen met een gereduceerde antennegrootte. Deze gereduceerde antennegrootte leidt tot lagere celdichtheden, en een betere lichtinbreng (Perin et al, 2014). Er zijn 2 soorten mutagenen: fysische (UV, gamma en röntgen) en chemische (bijv. EMS (Ethyl Methaan Sulfonaat) of NTG (nitrosoguanidine)). EMS wordt gebruikt om de overproductie te induceren van o.a. EPA, astaxanthine, carotenoïden en waterstof (Doan & Obbard, 2012). Ook kan het gebruikt worden om stammen te kweken die geen EPA bevatten. Toegepaste concentraties EMS liggen tussen 0.1 en 1.2 M. Ook H_2O_2 kan toegepast worden om pigmentproductie te stimuleren.

5.4 Soortbeschrijvingen

Voor een aantal soorten (*Dunaliella salina* en *tertiolecta*, *A. platensis*, *Nannochloropsis* sp. en *gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium purpureum*, *Tetraselmis chuii*, *Odontella aurita* en *Odontella sinensis* en een aantal minder bekende soorten) wordt in onderstaande paragrafen beschreven hoe biomassagroei en pigmentvorming gestuurd kunnen worden door o.a. lichtsterkte, golflengte, lichtpad, stikstofbron en concentratie, mutagenen, verdunnings/verversingssnelheden, mengcondities, temperatuur, zoutgehalte, flashing (wisselende L/D cycli), mixotrofe/fototrofe omstandigheden, alternatieve nutriëntenbronnen, mengcultures en Si additie.

5.4.1 *Dunaliella salina* & *Dunaliella tertiolecta*

Dunaliella salina is één van de rijkste bronnen van β -caroteen en 12% van de DS van deze alg kan uit dit pigment bestaan onder stresscondities zoals hoge saliniteit, hoge lichtintensiteit, nutriënttekorten (m.n. N) en extreme temperaturen (Del Campo et al, 2007; Lamers et al, 2012). *D. salina* kan een volumetrische β -caroteen concentratie tot 150 mg/L ophopen (Xia et al, 2013a). Aangezien de alg relatief gevoelig is voor licht, moet een kweek bij voorkeur opgestart worden bij lage lichtintensiteiten (Anoniem, 2015).

Fu et al (2013) hebben ontdekt dat een combinatie van rode LED (75%) en blauwe LED (25%) verlichting leidt tot hogere groei. Het toepassen van 100% rood licht leidt waarschijnlijk tot lichtschade, maar het toevoegen van blauw licht leidde tot verhoogde β -caroteen en luteïne gehalten. Door het toepassen van dit extra blauw licht kan de lichtintensiteit van het systeem omhoog zonder dat er lichtschade veroorzaakt wordt. Ook kan er ALE (Adaptive Laboratory Evolution) toegepast worden voor verhoogde carotenoïden concentraties. Wit licht gecombineerd met UV-A leidt tot verhoogde β -caroteen accumulatie in vergelijking met wit licht alleen. LED verlichting leidt eerder tot lichtstress bij lagere lichtintensiteiten dan conventionele verlichting. De meest efficiënte invallende fotonflux was 128 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. De eerder genoemde fotonflux leidde tot de hoogste gehalten carotenoïden, die nog hoger werden na N limitatie onder rode LEDs. Chlorofyl a en b gehalten veranderen overeenkomstig met de belangrijkste carotenoïden (all-trans β -caroteen en luteïne).

Lamers et al (2012) beschrijven dat een gebrek aan bepaalde nutriënten, inclusief NO_3 , de expressie activeert van diverse genen die bij carotenoïde biosynthese betrokken zijn in *D. salina*. Ook lijkt de vorming van vetbolletjes (i.e. de novo vetzuursynthese), waarin β -caroteen opgeslagen wordt een rol te spelen. Hoge lichtintensiteit al dan niet in combinatie met N-depletie leidt tot hogere β -caroteen en vetzuurconcentraties. Ook vond er een afname plaats in de verhouding onverzadigde/verzadigde vetzuren, maar de totale hoeveelheid vetzuren veranderde niet. Acht tot twaalf uur na het ontstaan van de N-depletie nam de β -caroteen productie sterk toe tot 2.7% van de asvrije DS. De celgrootte van de algen neemt af na N depletie, waardoor celdeling toeneemt, i.e. er wordt eerder gedeeld bij kleinere celgrootte. Ook zwellen de cellen van *D. salina* op onder extreme condities zoals hoge lichtintensiteit en/of lage temperaturen. De biomassa opbrengst per eenheid licht nam een factor twee toe onder N depletie door toegenomen celdeling, swelling van de cellen en toegenomen celdichtheid. Dit laatste geeft aan dat er hogere concentraties componenten binnen de cel opgehoopt werden. Algemeen gesteld lijkt een hoge lichtintensiteit meer effect te hebben, maar N-depletie is een energiezuiniger mechanisme.

Volgens Zijffers et al (2010) kunnen hoge biomassadichtheden en opbrengsten van *D. tertiolecta* alleen bereikt worden in plaatbioreactoren met een kort lichtpad (in deze studie 1.25 en 2.15 cm). Hoge biomassaconcentraties maken een makkelijker bewerking van de biomassa in industriële toepassingen mogelijk. De maximale biomassaconcentratie in continue cultures was 18 g/L en er werd een biomassaopbrengst van 0.65 g/mol fotonen bereikt bij lichtintensiteiten van 13-35 $\mu\text{mol fotonen}/\text{g}/\text{s}$. *D. tertiolecta* heeft een hoge onderhoudsenergievraag (die toeneemt bij hoge dichtheden) wat ervoor zorgt dat een deel van de lichtenergie (bijna 50%) niet wordt gebruikt voor biomassavorming, maar voor onderhoudsprocessen. Dit zorgt ervoor dat de opbrengst van deze alg snel afneemt bij hoge biomassadichtheden. Om de algenopbrengst op licht te kunnen optimaliseren in combinatie met hoge volumetrische productiviteiten, moeten hoge groeisnelheden gecombineerd worden met hoge biomassadichtheden. Er zou dus meer onderzoek moeten plaatsvinden naar het verkleinen van de lichtweg in reactoren.

Dunaliella (en *Arthrospira*) kan relatief gemakkelijk en schoon gekweekt worden door de bijzondere groeiomstandigheden (Del Campo et al, 2007). De meest gebruikte kweekmethode zijn open vijvers met weinig of geen processturing. De ideale omstandigheden zijn maximale zonnestraling, minimale bewolking, een warm klimaat en hypersalien water. In extensieve systemen zonder menging en CO_2 en met minimale controle kan

in Australië het hele jaar geproduceerd worden maar zijn de opbrengsten laag met een concentratie in de celsuspensie van minder dan 0.1 g β -caroteen per m³. Alternatief kan er in twee fases gekweekt worden: De eerste fase is optimale biomassaproductie met een lage β -caroteen/chlorofyl ratio, in de tweede fase wordt de kweek verdund tot ongeveer één derde om de lichtintensiteit te laten toenemen en wordt de carotenogenese verder bevorderd door N depletie. Hogere caroteengehaltes zijn goedkoper tijdens latere verwerkingsstappen. De auteurs beschrijven verder een buizenreactor in de buitenlucht onder semi continue omstandigheden met hoge celdichtheden waarbij een NO₃ gehalte aangehouden werd tussen 0.5 en 3 mM. In deze experimenten nam het caroteengehalte toe tot 14% en kon het gehalte luteïne in de cellen ook verhoogd worden.

Andere inhoudsstoffen uit *D. salina* (PUFAs, indol afgeleiden, β -ionon en neophytadien) kunnen door sub- en superkritische CO₂ extractie verkregen worden (Michalak & Chojnacka, 2015). Deze stoffen hebben een antibacteriële werking tegen *E. coli* en *S. aureus*.

Cho et al (1999) beschrijven verhoogde groei van *D. salina* na het toevoegen van zeewierextracten (zie onder 'Andere algensoorten')

5.4.2 *Arthrospira platensis*

A. platensis wordt o.a. vermarkt vanwege eiwit, vetzuren (GLA= γ -linoleenzuur) en pigmenten (phycocyanine en chlorofyl a) (Markou, 2014; Kent et al, 2015). Antioxidanten/ carotenoïden kunnen door versnelde extractie met oplosmiddelen geïsoleerd worden uit *A. platensis* (Michalak & Chojnacka, 2015). Voor deze procedure werden hexaan, petroleum ether en ethanol gebruikt bij 60, 115 en 170°C en verschillende extractietijden (3, 9 en 15 min).

De DS van *A. platensis* bevat 15-25% koolhydraten waarvan het grootste deel een vertakte polysacharide is die op glycogeen lijkt (Marrez et al, 2014). Een deel van de polysachariden heeft gezondheidsbevorderende effecten. Verhogen van het N-gehalte leidt tot meer biomassa en een hoger eiwitgehalte en het toedienen van ureum i.p.v. NO₃, NO₂ of NH₄ leidt tot hogere aminozuurgehalten. Het vetgehalte zou afnemen als natrium bicarbonaat aan het medium toegevoegd wordt. Het verhogen van de saliniteit van het medium van 10 naar 30‰ zou kunnen leiden tot hogere gehalten oliezuur, α - en γ -linoleenzuur.

Markou (2014) vond de hoogste biomassaproductie met rode en roze LEDs. De totale hoeveelheid carotenoïden was de enige component die niet beïnvloed werd door de verschillende kleuren LEDs. De hoogste concentratie phycocyanine werd gevonden bij blauw licht (17.6%) en de laagste bij roze licht. Chlorofyl was het laagst bij rood licht, en net als phycocyanine het hoogst bij blauw licht (1.42%). De verklaring is dat groen en blauw licht 'donkere' omstandigheden nabootsen (met als gevolg te weinig licht voor biomassaproductie), waardoor de phycocyanine- en chlorofylconcentraties toenamen.

Volgens Chen et al (2010) zijn rode LEDs het beste voor de groei van *A. platensis*. Geel licht geeft de beste chlorofyl a productie bij 750-1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, blauw licht de beste chlorofyl a en phycocyanineproductie bij 3000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Hoge lichtintensiteiten leiden tot hoge chlorofyl a en biomassa producties, maar dit leidt tot een lagere phycocyanine productie. Alleen bij blauw licht met een hoge intensiteit is er een positief effect op zowel chlorofyl a en phycocyanine, maar dit leidt tot de laagste biomassagroei. Rood licht leidt, door hogere biomassagroei, netto tot de hoogste productie van chlorofyl a en phycocyanine.

Ook Wang et al (2007) vonden de hoogste biomassaproductie bij rood licht (620-645 nm) bij alle intensiteiten (0.4/d bij 3000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Geel licht vertoont een grote overlap met rood licht. Zij verklaren de lage productie bij blauw licht (460-475 nm) doordat het chlorofyl van *A. platensis* het blauwe licht niet op kan nemen. Het voordeel van rode en witte LEDs is dat zij de minste energie verbruiken bij dezelfde lichtintensiteit. Bij rood licht van 1500-3000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ is de 'economische efficiëntie'

70-110 g/L/US\$. Groei bij rood licht was overigens ook beter dan bij wit kunstlicht (380-760 nm).

Chen et al (2013) hebben in een plaatfotobioreactor de productiviteit van C-phycocyanine verhoogd naar 0.13 g/L/d bij een optimale N concentratie van 0.045 M en belichting van 700 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Dit komt overeen met een maximale C-phycocyanine concentratie van 12%. Bij hogere lichtintensiteiten ($>900 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) nam de biomassaproductie niet meer toe, evenals de phycocyanineproductie bij lichtintensiteiten $> 700 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Met de plaatreactor werd een betere biomassaproductie bereikt dan met een conventionele flesreactor.

Xie et al (2015) hebben de lichtintensiteit en initiële biomassaconcentratie aangepast om celgroei en phycocyanineconcentratie te verbeteren. Lage lichtintensiteit (300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) en hoge initiële biomassa (0.24 g/L) leidden tot verhoogde phycocyanine accumulatie. Fed-batch productie blijkt een effectieve strategie om de biomassa- en phycocyanineproductie verder te verhogen met respectievelijk 30-40% en 98% t.o.v. batchproductie. De hoogste concentratie (16.1%, 1034 mg/l) en productiviteit (94.8 mg/L/d) werden bereikt met 5mM voedingsmedium (i.t.t. met alleen NO_3), wat aangaf dat voor phycocyanine productie ook andere nutriënten dan N nodig zijn. De volumetrische productie van gesloten fotobioreactoren is dan ook 5-20x hoger dan in open vijvers. In de fed-batch strategie werd er na uitputting van NO_3 een 100 x geconcentreerde NO_3 -oplossing (of ander geconcentreerd medium) toegevoegd tot een NO_3 concentratie van 5-10 mM. Een goede indicator voor lichtinhibitie is kleurverandering van de algen van groen naar wit (bleaching) in de eerste drie dagen. Het afnemen van C-PC bij hogere lichtintensiteit kan veroorzaakt worden doordat lichtenergie volkomen geabsorbeerd wordt door een groeiend aantal cellen en de cellen minder C-PC in hun cellen nodig hebben. Toepassen van een hoge initiële biomassa in een kweekstelsel leidt tot hogere kosten, maar bij een beginconcentratie van 0.24g/L werd de afname in biomassaproductie gecompenseerd door hogere C-PC concentraties. Als N in lage maar niet limiterende concentraties aanwezig is zal het als eerste gebruikt worden voor de synthese van lichtgerelateerde moleculen en lichtverzamelende eiwitten. Relatief lage N-concentraties leiden bijvoorbeeld ook tot ophoping van luteïne in een fed-batch cultuur.

Xue et al (2011) hebben de groei van *A. platensis* vergeleken bij continue en onderbroken belichting door witte LEDs. De lichtintensiteit varieerde van 1-77.16 mW/cm^2 en onderbroken licht werd gedoseerd in frequenties van 0.01-20 Hz. De hoogste lichtintensiteit is te vergelijken met direct zonlicht op het middaguur. Er konden vier 'zones' onderscheiden worden als functie van de lichtintensiteit: de lichtgelimiteerde zone (0-3.5 mW/cm^2), de intermediaire zone (3.5-10 mW/cm^2), de lichtverzadigde zone (10-30 mW/cm^2) en de lichtinhibitie zone ($>30 \text{ mW}/\text{cm}^2$). Des te hoger de lichtintensiteit, des te meer werden groeisnelheid en lichtefficiëntie verbeterd als de licht/donker frequentie toenam van 0.01 tot 20 Hz. Des te hoger de lichtintensiteit in de lichtgelimiteerde zone, des te minder licht is nodig om een lichtefficiëntie in stand te houden vergelijkbaar met die onder continue belichting. Een hoge L/D frequentie is zeker nodig bij hoge lichtintensiteit aangezien *A. platensis* niet langer dan 10 seconden blootgesteld mag worden aan de eerder genoemde hoogste lichtintensiteit. Ook is het niet rendabel om de algen te laten groeien bij lange L/D cycli onder lage lichtintensiteiten zelfs al is de lichtefficiëntie het hoogst bij lage lichtintensiteiten. Concluderend kan algenkweek het meest efficiënt zijn als de lichtintensiteit minder dan 3.5 mW/cm^2 is en de L/D frequentie hoog genoeg zodat alle lichtenergie geabsorbeerd wordt om omgezet te worden in biomassa. Op die manier gaat er geen energie verloren aan warmte of fluorescentie. Verhoogde mengingssnelheden leiden uiteraard wel tot hogere kosten.

Mary Leema et al (2010) bestudeerden de groei van *A. platensis* op verschillende zeewatermedia (onverdund of verdund met zoet water). Met een aantal van deze media was het mogelijk dezelfde biomassa- ($\sim 3\text{g}/\text{L}/\text{d}$, groeisnelheid 0.26/d en verdubbelingstijd 2.7 d) en phycocyanineproductie te bereiken als met het controlemedium. Ook namen luteïneconcentratie en de ratio's van phycocyanine/Chla en betacaroteen/Chla toe t.o.v. de controle. Andere studies laten ook goede resultaten

zien met zeewater aangevuld met PO_4 en NO_3 . Er werd een negatief verband gevonden tussen zoutgehalte en Chla. De hoogst gemeten concentraties luteïne en phycocyanine waren respectievelijk 48 en 2.28 mg/g DS. De verhouding phycocyanine/Chla is in deze en andere studies positief gecorreleerd aan toenemende zoutconcentraties. Voor de extractie van phycocyanine uit *S. platensis* op zeewater zijn echter meer zuiveringsstappen nodig dan bij het controlemedium. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door koolhydraten met een laag molecuulgewicht die opgehoopt worden voor osmotische bescherming. Een toename van saliniteit kan de groei van de helixvorm van *A. platensis* remmen, maar niet de groei van de rechte vorm. Ook kan hierdoor de vorm van helix naar recht veranderen.

Madkour et al (2012) vervingen ingrediënten uit het Zarrouk medium door goedkopere varianten aangezien de kosten van nutriënten na arbeid de grootste posten zijn bij de productie van *Arthrospira*. Het medium bestond uit SSP (single superfosfaat), commercieel verkrijgbaar NaHCO_3 , MOP (muriate of potash = kaliummeststof) en ruw zeezout (Syhat zout). SSP is een bron van P (16% P_2O_5), EDTA en enkele essentiële micronutriënten. Ook het ruwe zeezout bevat macro- en micronutriënten. N werd toegevoegd in de vorm van NH_4NO_3 of ureum. Ureum leidde tot lagere groeisnelheden maar NH_4NO_3 werd efficiënt benut: Algengroei nam toe met toenemende concentraties ammoniumconcentraat tot een maximale biomassa van 0.353 g/L. Boven een concentratie van 40% van de Zarrouk medium concentratie (100% = 29.42 mM-N) werd groei gelimiteerd. Aangezien ammonium en ureum toxisch zijn voor *Arthrospira* bij concentraties > 2 mM maar NO_3 te gebruiken is in hogere concentraties, kan een combinatie van NO_3 en NH_4 beter werken. Een effect van ureumtoxiciteit (adaptatie) is de ophoping van koolhydraten en vetten ten koste van eiwit. De resultaten laten zien dat dit alternatieve medium winstgevend gebruikt kan worden voor grootschalige *Arthrospira* productie met vergelijkbare prestaties als die op Zarrouk medium. Echter, de exponentiële fase en verdubbelingstijd duurden met het alternatieve medium langer.

Zhang et al (2015) hebben gekeken naar de productie van *Arthrospira* op een vast substraat (EFC doek = electrostatic flocking cloth). EFC is een hydrofiel materiaal met kleine poriegrootte en een hoog vermogen om vocht vast te houden. De optimale condities waren 25 g inoculum/ m^2 , een lichtintensiteit < 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, CO_2 -verrijkte lucht (0.5%) bij een oppervlaktebeluchtungssterkte van 0.0056 m/s in een NaHCO_3 -vrij Zarrouk medium. De CO_2 werd gebruikt ter vervanging van de bicarbonaat die meestal in vijvers toegepast wordt. De experimenten werden uitgevoerd met witte fluorescerende lampen of natuurlijk licht. Er werd een productiviteit bereikt van 60 g/ m^2/d wat veel hoger is dan in open vijvers (<15 g/ m^2/d) of in fotobioreactoren. De voeding was hetzelfde als bij conventionele kweek in vloeistof, maar bij vloeistofkweek kunnen de cellen makkelijker beschadigen t.o.v. de hier beschreven methode (oogst d.m.v. schrapen).

Zijffers et al (2010) bereikten maximale productiviteit in plaatreactoren met korte lichtpaden van 1.3 en 2.8 cm. Omgerekend was de fotosynthetische efficiëntie ongeveer 1.5 g biomassa (DS) per mol fotonen bij invallende lichtintensiteiten tot 2000 μmol fotonen/ m^2/s . Deze hoge efficiëntie wordt veroorzaakt door korte blootstellingstijden aan (over)verzadigde lichtintensiteiten aan het reactoroppervlak als gevolg van turbulente menging.

5.4.3 *Nannochloropsis gaditana* en sp.

Nannochloropsis sp. heeft een relatief hoog vetgehalte in vergelijking met andere soorten (22% DS) en hoge EPA en astaxanthine concentraties (Kent et al, 2015). Deze microalg groeit het best bij blauw licht (470 nm) (Das et al, 2011a). De μ_{max} (met een hoogste waarde van 0.64 d^{-1} onder fototrofe condities) neemt af in de volgorde: blauw > wit > groen > rood (680 nm). Blauw licht heeft meer energie en is efficiënter voor fotosynthese aangezien licht met kortere golflengtes resulteert in hogere fotosynthetische efficiënties. De EPA opbrengst is het hoogst wanneer *Nannochloropsis*

bij wit licht groeit. Overigens werden zowel deze studie als die van Wang et al (2007) uitgevoerd met TL achtergrondverlichting.

Zijffers et al (2010) noemt een maximum opbrengst van 0.6 g/mol fotonen voor *Nannochloropsis* sp. bij een lichtintensiteit van 2000 $\mu\text{mol fotonen/m}^2/\text{s}$.

Volgens Kim et al (2014) leidt kweken van *Nannochloropsis gaditana* onder blauw en rood licht tot verbeterde productiviteit en eigenschappen van biodiesel die uit deze algen gewonnen kan worden. De vetzuuropbrengst was twee keer zo hoog bij rood licht als bij wit licht zonder significante verschillen in groeisnelheden. Rood licht had meer effect dan blauw licht. N depletie is de meest succesvolle manier om intracellulaire vetten op te hopen, maar dit leidt wel tot zware stress door extreme nutriëntgebreken, grote achteruitgang in celgroei en negatieve effecten op biomassagroei en totale vetproductie. Licht lijkt een makkelijkere manier te zijn om vetproductie te induceren dan nutriëntdepletie. *Nannochloropsis* bevat naast vet ook violaxanthine (dat blauw licht absorbeert) en vaucheriaxanthine esters, xanthofyllen en carotenen. Chlorofyl a is in deze alg het belangrijkste fotopigment, dat rood licht absorbeert, waardoor deze soort zich kan aanpassen aan diverse lichtcondities. Rood licht verbeterde de fotosynthetische activiteit, biomassa-accumulatie, vetkwaliteit en -kwantiteit. Deze resultaten zijn tegengesteld aan die van Das et al (2011a), die betere resultaten vond bij blauw licht. Van rood licht is ook voor andere soorten bekend dat het een hogere productiviteit stimuleert (*A. platensis*, *B. braunii*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp.) dan blauw of wit licht. Veranderde lichtcondities leiden tot meer veranderingen in chlorofylsamenstelling dan in de hoeveelheid carotenoïden. Blootstelling aan UVA (320-400 nm) naast ander licht leidt tot veranderingen in vetzuursamenstelling. Rood licht leidt tot lagere hoeveelheden onverzadigde vetzuren, wat de oxidatiestabiliteit ten goede komt, maar de groeisnelheden waren gelijk onder rood of wit licht.

N. gaditana combineert een hoge groeisnelheid onder verschillende belichtingsintensiteiten met een sterke ophoping van vetten, met name in afwezigheid van N (Perin et al, 2014). In dit onderzoek werd EMS toegepast om de samenstelling en sturing van het fotosynthetische systeem te veranderen, waardoor licht efficiënter gebruikt zou kunnen worden. EMS kan o.a. gebruikt worden voor de ophoping van astaxanthine, carotenoïden en EPA. De mutanten hadden significant andere eigenschappen dan het wildtype, wat aantoont dat het fotosynthetische systeem aangepast kan worden. Doan and Obbard (2012) vonden dat behandeling met EMS gevolgd door flowcytometrie leidde tot een viervoudige verhoging van de totale vetzuurconcentratie met 30% meer C16:1 en 45% minder EPA, wat gunstig is voor biodieseltoepassingen.

N. gaditana kan zich aanpassen aan verschillende lichtintensiteiten om op die manier zijn fotosynthesesysteem te optimaliseren (Simionato et al, 2011). Hierdoor is de groeisnelheid gelijk bij uiteenlopende lichtintensiteiten. Er lijkt geen verband te zijn tussen lichtintensiteit en vetophoping. Sterke belichting kan echter wel indirect vetophoping beïnvloeden i.c.m. met ander stressfactoren in aanwezigheid van een overmaat CO_2 . Tot 65-70% van de DS van deze alg kan uit vet bestaan. Dergelijke hoge concentraties kunnen geactiveerd worden tijdens de stationaire groeifase als reactie op stressfactoren zoals N of P depletie. Bij *Nannochloropsis* leiden hogere lichtintensiteiten indirect tot hogere vetophoping. De toegepaste lichtintensiteiten lagen tussen 5 en 2100 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$. Cultures die blootgesteld werden aan zeer lage lichtintensiteiten vertoonden langzame groei. De cultures blootgesteld aan zeer sterk licht bereikten de stationaire fase eerder en het uiteindelijke aantal cellen was lager. Bij tussenliggende intensiteiten vertoonden de groeisnelheden echter weinig verschillen. In de experimenten werd geen externe CO_2 bron gebruikt behalve die uit de lucht, wat mogelijk limiterende effecten heeft gehad. Als maat voor het functioneren van het fotosynthese systeem is er gekeken naar de fluorescentieparameter F_v/F_m . F_v/F_m is een maat voor de maximale kwantumopbrengst van PSII en is een gevoelige indicator voor de fotosynthetische prestaties van planten (Zhao et al, 2014). Bij alle lichtintensiteiten was deze factor stabiel, behalve bij de hoogste lichtintensiteit, wat duidt op gedeeltelijke PSII

fotoinhibitie. Deze lichtintensiteit komt overeen met de maximale intensiteit die gevonden kan worden onder natuurlijke omstandigheden. Gedurende de exponentiële fase kan de alg zich dus aan een breed spectrum van lichtintensiteiten aanpassen, maar in de stationaire fase lijken de cellen gevoeliger te zijn voor fotoinhibitie. In deze fase wordt lichtenergie niet meer gebruikt voor toename van het aantal cellen. De afname van fotochemische activiteit was bij hoge lichtintensiteiten sneller. Dit heeft waarschijnlijk te maken met nutriëntlimitatie wat herstel van het fotosynthese systeem d.m.v. eiwitsynthese verhindert. Voor kweektoepassingen op grote schaal is het dus belangrijk dat de cellen in een actieve delingsfase zitten. Door het onder 'Pigmenten' beschreven mechanisme dat chlorofyl zich ophoopt bij lage lichtintensiteiten en carotenoïden bij hogere lichtintensiteiten, kan *N. gaditana* zich aanpassen aan verschillende lichtintensiteiten. *N. gaditana* doet dit waarschijnlijk door een toename van het aantal reactiecentra in het lichtopvangsysteem. $f/2$ is een relatief arm substraat voor de groei van *N. gaditana*, en hierdoor worden veel vetten opgehoopt. Dit gebeurt vooral in de stationaire fase. Bij de laagste lichtintensiteiten bestond uiteindelijk 50% van de DS uit vet. Bij verschillende intensiteiten is het begin van de ophoping gelijk, maar het eindresultaat is dat niet. Het lijkt erop dat vooral nutriëntdepletie gedurende de stationaire fase van invloed is op de vetophoping. Ook al is er mogelijk sprake van CO₂ limitatie, dan geeft de studie nog steeds aan dat lichtintensiteit niet de enige factor is die vetophoping reguleert. Nutriëntlimitatie lijkt een grotere invloed te hebben. Lichtintensiteit kan echter ook leiden tot nutriëntlimitatie aangezien het fotosysteem gerepareerd moet worden. De beste strategie voor vetophoping is weinig licht in de exponentiële fase gevolgd door veel licht met bijbehorende nutriëntlimitatie in de stationaire fase (in deze fase zijn de cellen gevoeliger voor fotoinhibitie). Deze studie komt niet helemaal overeen met andere studies waarin er geen CO₂ limitatie was en de cellen niet aangepast waren aan verschillende lichtintensiteiten.

N. gaditana is in staat TAGs op te hopen tot 38% van de DS tijdens N limitatie (Simionato et al, 2013). Deze TAGs zijn voornamelijk afkomstig van nieuw gesynthetiseerde vetzuren met een klein deel dat uit gerecyclede membraan glycerolipiden bestaat. N-limitatie heeft effect op fotosynthese door het verminderen van de efficiëntie van lichtinvang en het fotochemisch gebruik van de geabsorbeerde energie door een afname van chlorofyl en fotosynthetische complexen. Dit leidt tot veranderde C stromen en tot ophoping van TAGs. *Nannochloropsis* heeft een kenmerkende pigmentsamenstelling, met alleen chlorofyl a, maar geen b en c. In de cellen zijn violaxanthine en vaucherixanthine de meest voorkomende carotenoïden. Ondanks N limitatie blijkt fotosynthese operationeel te blijven door veranderende metabolische processen zoals een toegenomen efficiëntie van alternatieve elektronroutes. Celdeling en vetophoping lijkt in N-vrije cultures compleet afhankelijk te zijn van fotosynthese en niet van de consumptie van energiereserves zoals koolhydraten. Zonder N neemt de chlorofylconcentratie af en de chlorofyl/carotenoïden verhouding ook, wat op de ophoping van carotenoïden duidt, vaak het gevolg van (oxidatieve) stress. N afwezigheid heeft dus een groot effect op de chloroplasten. Das et al (2011b) kweekten *Nannochloropsis* sp. in twee fasen: De eerste zeven dagen autotroof en vervolgens drie dagen mixotroof op glycerol, glucose of sucrose. Dit leidde tot hogere biomassaproductiviteiten en een toename van 72% in de vetzuurproductie met glycerol. Deze alg kan groeien in hypersalinen water maar de biomassaopbrengst nam af als de saliniteit hoger was dan 50 PPT (ter vergelijking: zeewater = 35 PPT). Vervolgens werd deze tweefasenopzet getest in een open raceway vijver met een autotrofe fase van acht dagen gevolgd door vier dagen groei in aanwezigheid van glycerol. In afwezigheid van N kunnen vastgelegde C bronnen niet gebruikt worden voor eiwitsynthese, wat resulteert in vetophoping. Echter, dit heeft tijd nodig en leidt uiteindelijk ook tot verlaagde biomassaproductiviteit. Mixotrofe groei kan resulteren in hogere vetconcentraties dan fotoautotrofe groei. Dit geldt bijvoorbeeld voor *P. tricornutum* of *Nannochloropsis* sp. op glycerol. Grotere hoeveelheden vet worden uiteraard ook veroorzaakt door toegenomen biomassaproductie. Het toevoegen van dergelijke substraten aan open systemen zal waarschijnlijk tot de ingroei van

heterotrofe bacteriën leiden met een lage algenopbrengst tot gevolg. Een hogere saliniteit van het medium door verdamping zou dit mogelijk kunnen voorkomen. Het belangrijkste vetzuur in de fotoautotrofe logfase in het gesloten systeem was EPA (43% van de totale vetzuren). Glycerol had het beste effect, gevolgd door sucrose en glucose. De vetzuurconcentratie door toevoegen van glycerol nam toe tot 19% van de DS, een toename van 30% t.o.v. fotoautotrofe condities. Buitencultures van *Nannochloropsis* kunnen vervuild worden door cyanobacteriën, diatomeeën en bentische algen. Dit kan met chemische stoffen opgelost worden maar hogere saliniteit is een betere optie. Op deze manier hoeft er geen vers zoetwater toegevoegd te worden, maar heeft de toegenomen saliniteit juist een selectie-effect. Ook is er competitie door de microalgen om de glycerol, waarbij ze door hun toegenomen biomassa (in de fotoautotrofe fase) een voordeel hebben t.o.v. andere organismen. In de open vijver verdampte in 12 dagen 24% van het water, wat leidde tot een verhoging van de saliniteit met 31%. Organisch materiaal zou ook stapsgewijs toegevoegd kunnen worden, waarna gecontroleerd kan worden op bacteriële contaminatie en de culture indien gewenst geoogst kan worden.

San Pedro et al (2013) vergeleken de groei van de vier vaakst beschreven zeewateralgen. *N. gaditana* haalde de hoogste biomassaproductie t.o.v. *T. chuii*, *T. suecica* en *P. tricornutum* bij verschillende verdunningssnelheden en media in continue cultures. De maximale biomassaproductiviteit was 0.49 g/L/d bij een verdunningssnelheid van 0.42/d. In continue culturen haalde *A. gaditana* maximale biomassa productiviteiten bij 8 mM NO₃ en verdunningssnelheden tussen 0.3 en 0.4/d. Een tweefasenkweek werd opgezet met in fase 1 een overmaat NO₃ en in fase 2 een NO₃-loze fase. De geaccumuleerde productiviteit van vetzuren was hierdoor 51 mg/L/d. Het vetzuurprofiel veranderde door een toename van de neutrale vetten (73% van de totale vetten). De combinatie van stikstofdeficiëntie en lichtstress droegen bij aan vetproductie voor biodiesel. Verder werden een aantal media vergeleken: f/2 medium, Mann & Myers medium, Algal medium en Arnon medium met toegevoegd NaNO₃. De beste groei voor de *Tetraselmis* soorten werd gevonden met Arnon medium, terwijl voor *P. tricornutum* en *N. gaditana* vergelijkbare resultaten werden geboekt met Arnon en Algal media. f/2 medium leidde voor alle soorten tot lagere biomassaproductiviteit. Het gebruik van Arnon medium kan leiden tot operationele problemen omdat er zoutneerslag en turbiditeit optreedt. In de tweefasen kweek nam de vetzuurconcentratie geleidelijk toe van 10% DS tot 38% DS. *N. gaditana* haalt niet de hoogste maximale groeisnelheid maar groeit wel efficiënter op licht dan andere soorten. Het sturen van de stikstofconcentratie in grootschalige kweeksystemen is gemakkelijker en goedkoper dan het sturen van andere factoren. In ander onderzoek wordt beschreven dat met toenemende NO₃ concentratie de fotosynthetische efficiëntie van *Nannochloropsis* sp. afneemt en dat de affiniteit voor opgeloste anorganische C afneemt in een medium met 2.2 mM NO₃. De specifieke NO₃ input voor deze soort zou lager moeten zijn dan 1-1.5 mmol/g/d om vet en vetzuur accumulatie te veroorzaken. De vetproductie van *N. gaditana* in deze proef is bijna een factor drie hoger dan de productie van *T. suecica* in een vergelijkbare proefopzet. Onder hogere lichtintensiteiten en kleinere lichtpaden kan de vetzuurproductiviteit van *N. oculata* zelfs oplopen tot 170 mg/L/d. Stikstoflimitatie stimuleert bepaalde enzymen die de TAG productie doet toenemen. Zeer hoge lichtintensiteiten gecombineerd met de afwezigheid van NO₃ leidt tot vergeling van de cellen en celdood doordat het chlorofyl wordt afgebroken. Om de vetten en vetzuurconcentraties in toekomstige experimenten te laten stijgen raden de auteurs aan om NO₃ reductie te combineren met lichttoename. In de praktijk kan deze kweekmethode gebruikt worden door in fotobioreactoren met een overmaat N biomassa te kweken en deze vervolgens over te brengen naar batchreactoren met N deficiëntie om accumulatie van gunstige vetzuren te stimuleren.

5.4.4 *Phaeodactylum tricornutum*

Fu et al (2015) beschrijven de biotechnologische potentie van diatomeeën voor productie van hoogwaardige componenten zoals carotenoïden. Groeiprestaties en accumulatie van waardevolle componenten worden bepaald door intensiteit en kwaliteit van invallend licht, door nutriënttekorten en Si uitputting. Si heeft een cruciale rol in de structuur van de celwand en is een vermarktbaar product. Si uitputting leidt tot de vorming van meer vet i.p.v. koolhydraten in de biomassa, maar het mechanisme is niet duidelijk. Diatomeeën hebben hogere vetgehaltes dan andere algen en onder N en P tekorten worden hogere concentraties onverzadigde vetzuren gevormd. Door P depletie worden 1.65 maal zoveel TAGs gevormd in *P. tricornutum* omdat dit o.a. leidt tot een toename in aantal en grootte van de vetbolletjes in deze algen. Ijzerdepletie beperkt de groei en productiviteit van diatomeeën bij lage lichtintensiteiten.

Fotooxidatieve stress als het gevolg van korte blootstelling aan hoge lichtintensiteiten leidt tot een toename van diatoxanthine maar de concentratie van het belangrijkste carotenoïde pigment fucoxanthine werd niet beïnvloed. Blauw licht is essentieel voor deze foto-aanpassing aan hoge lichtintensiteiten in *P. tricornutum*. Abiotische omgevingsstress zoals gemengde rode en blauwe lichten en Si limitatie kunnen gecombineerd worden voor toekomstige stress-gestuurde ALE experimenten gericht op hoge carotenoïden productiviteit in diatomeeën. Een 50:50 mix van rode en blauwe LED verlichting leidt in *P. tricornutum* tot een fotosynthetische efficiëntie van 3.3%. In vergelijking met hogere planten, groene algen etc. is de fotosynthetische efficiëntie van diatomeeën echter nog laag.

P. tricornutum bevat grote hoeveelheden EPA en isolatie hiervan zou makkelijker kunnen zijn dan uit andere materialen (Martins et al, 2013).

Chauton et al (2013) hebben exponentiële fed-batch cultures van *P. tricornutum* onderzocht. Hierbij werd een N of P gelimiteerd medium (N:P ratio's van resp. 3 en 195) in kleine doses elke minuut gedoseerd gedurende de kweekperiode. Ongeacht de behandeling was het vetgehalte van de cellen ongeveer 10% DS. Hogere opslag van C kan bereikt worden door de totale biomassaproductie te verhogen i.p.v. het maximaliseren van de concentratie van vet of koolhydraten in de cellen. De verdunningssnelheden in de batches varieerden tussen 0.33 en 1.1/d. N gelimiteerde cellen bevatten ongeveer half zoveel C als de P gelimiteerde cellen. Dit heeft te maken met een verminderde fotosynthetische C assimilatie als gevolg van verminderde eiwitsynthese. De P gelimiteerde cellen waren minder in aantal dan N gelimiteerde cellen, wat erop wijst dat de celcyclus ophoudt tegen celdeling aan. Samenvattend leidt N limitatie tot afname van celgrootte, minder C per cel en meer C opslag in koolhydraten. P limitatie leidt tot grotere cellen met meer C per cel, maar een grotere fractie van die C was geassocieerd met mogelijk zeer waardevolle bestanddelen anders dan neutrale vetten, koolhydraten en eiwitten.

Xia et al (2013b) vonden de beste groei van voor deze alg bij N concentraties van 11.8-17.7 mmol/L, resulterend in een maximale biomassaproductie van 2.7 g/L. *P. tricornutum* kan hoge celdelingssnelheden handhaven bij hogere lichtintensiteiten. Zijffers et al (2010) noemt een maximum opbrengst van 0.5 g/mol fotonen voor *P. tricornutum* bij lichtintensiteiten van 1000 en 2000 $\mu\text{mol fotonen/m}^2/\text{s}$.

Gómez-Loredo et al (2015) hebben de groei en fucoxanthine productie van *I. galbana* en *P. tricornutum* bij verschillende lichtintensiteiten, mengcondities (beluchting vs. mengen) en mediumsamenstelling (f/2 en Conway (=Walne's medium)). Er is geen direct verband tussen celgroei en fucoxanthine productie. De fucoxanthine concentratie van *I. galbana* op Conway medium is 1.2-15x zo hoog als die in macroalgen. *I. galbana* had een specifieke groeisnelheid van 1.12/d onder beluchte condities en een lichtintensiteit van 62 $\mu\text{mol fotonen/m}^2/\text{s}$. De fucoxanthine concentratie was 25% hoger in *P. tricornutum* bij 13.5 $\mu\text{mol fotonen/m}^2/\text{s}$ (medium/lage lichtintensiteit) onder beluchte condities, maar *I. galbana* liet de hoogste fucoxanthineproductie zien (3.32 mg/L op dag 16). De groei van *I. galbana* was veel beter op Conway medium dan op f/2 medium. Het schudden van cultures leidde tot lager celdichtheden dan beluchte cultures. Voor beide soorten waren de hoogste lichtintensiteit 62 μmol

fotonen/m²/s en beluchte omstandigheden het gunstigst voor hoge celdichtheden. Lage lichtintensiteiten waren voor beide soorten het meest gunstig voor fucoxanthine concentraties. Het oogsttijdstip voor *P. tricornutum* varieert met de mengcondities, aangezien de hoogste fucoxanthine productie bij beluchting bereikt werd op dag 8, en bij schudden op dag 16. De celgroei neemt af met afnemende lichtintensiteiten in de exponentiële fase. *P. tricornutum* heeft efficiënte lichtbeschermende mechanismes om overbodige energie te gebruiken bij lichtintensiteiten tot 500 μmol fotonen/m²/s. Dit werd in de huidige experimenten niet gevonden en heeft waarschijnlijk te maken met de mengcondities (met beluchting kunnen hogere lichtintensiteiten gebruikt worden). *I. galbana* lijkt echter een beter lichtadaptatieproces te hebben als het gaat om hoge lichtintensiteiten. Dit kan veroorzaakt worden door de synthese of afbraak van lichtverzamelende complexen, wat bijdraagt aan een evenwichtige absorptie van excitatie-energie voor groei en celonderhoud. Synthese van lichtverzamelende complexen zou gunstig kunnen zijn voor biomassa- en pigment- (fucoxanthine) productie. Groei van *P. tricornutum* was gelijk onder zowel beluchting als schudden bij lage lichtintensiteiten, dus schudden zou een substituut kunnen zijn voor beluchting in het geval van deze alg. Voor *I. galbana* leiden lichtintensiteiten van 22-65 μmol fotonen/m²/s tot hoge celdichtheden in beluchte (0.75-2 vvm) batchcultures. Ook in deze experimenten speelt C limitatie mogelijk een rol. Voor *P. tricornutum* is namelijk bewezen dat 2% CO₂ i.p.v. alleen blootstelling aan atmosferische CO₂ leidt tot verdubbelde biomassaproductie. De resultaten van het huidige onderzoek kunnen waarschijnlijk verbeterd worden door toevoeging van een C bron (bijv. industriële afvalstromen). Fucoxanthine productie in *P. tricornutum* is niet alleen afhankelijk van de leeftijd van de culture maar ook van verschillende cultuurcondities (bijvoorbeeld hogere mengingssnelheden) zodat de productiepiek naar achteren verplaatst kan worden naar de stationaire fase van de groei. De groei van *I. galbana* is beperkt bij concentraties lager dan 0.5 mM NaNO₃, een component die een grote rol speelt voor het vetgehalte van deze alg. Ook is er van concentraties van 50-500 μM P en 10 μM Zn²⁺ aangetoond dat het celgroei van *I. galbana* verhoogt.

Zhao et al (2014) beschrijven dat *P. tricornutum* een economisch belangrijke soort is. Si is niet nodig voor de kweek, maar uit dit onderzoek blijkt dat Si een tot goede groei leidt bij groen licht en lage temperaturen. Voor de meeste diatomeeën heeft kiezelzuur grote invloed op de celdeling en het lijkt erop dat biogeen Si een effectieve pH buffer is die de enzymatische omzetting van bicarbonaat naar opgelost CO₂ vergemakkelijkt (wat de efficiëntie van fotosynthese in diatomeeën verhoogt). Deze alg heeft drie elkaar afwisselende morfotypen die Si assimileren: ovaal, fusiform en triradiaat. Deze vormen zijn waarschijnlijk gerelateerd aan bepaalde kweekcondities. Ander onderzoek constateerde dat afwezigheid van Si tijdens de kweek resulteerde in betere groei omdat celbeschadigingen door Si voorkomen werden. In het beschreven onderzoek werd *P. tricornutum* gekweekt bij lage saliniteit (20 ‰), hoge lichtintensiteit (2000 μmol/m²/s), verschillende fotoperiodes en verschillende nutriëntdeficiënties (Fe of N). Het bleek dat Si de groei niet beïnvloedde onder deze condities maar bij andere lichtgolflengtes en lage temperatuur (10°C) werden verschillende effecten wel duidelijk. Si had geen invloed bij rood licht (647-700 nm) maar cellen onder blauw licht (470-475 nm) stierven na drie dagen. Dit wordt mogelijk veroorzaakt omdat blauw licht niet geabsorbeerd kan worden door Chla. Bij groen licht (491-574 nm) en lage temperatuur bleek de afwezigheid van Si tot langzamere groei te leiden. Onder normale omstandigheden zijn de concentraties fucoxanthine en Chla resp. 12 en 30*10⁻⁵ ng/cel, maar deze gehalten namen af in afwezigheid van Si. Verder bleek uit de proeven dat de afwezigheid van Si de fotosynthetische efficiëntie en het vetgehalte niet beïnvloedde maar de vetzuursamenstelling wel (licht verhoogde EPA en DHA concentraties). Ook leken de cellen gevoeliger voor stress in afwezigheid van Si. Afwezigheid van Si leidt tot lagere concentraties fucoxanthine, wat leidt tot meer ROS. Als fucoxanthine aan eiwitten in cellen bindt, verschuift het absorptiemaximum van 490 naar 530 nm. Hierdoor wordt een grotere fractie van groen licht beschikbaar. Door de afname van fucoxanthine in afwezigheid van Si nam de absorptie van groen licht dus af. Als fucoxanthine niet effectief kan binden aan het lichtinvangende eiwit zullen

fotosynthetische efficiëntie en groeisnelheden afnemen. Ook de totale hoeveelheid onverzadigde vetzuren nam iets af in afwezigheid van Si. Dit zal de groei bij lage temperaturen negatief beïnvloeden, dus Si heeft waarschijnlijk voordelen bij groei in diepe wateren.

Pasquet et al (2014) vonden dat het aandeel EPA en PUFAs in *P. tricornutum* hoger is bij de lagere temperaturen gemeten in het temperatuurbereik 10-25°C. Veranderingen in vetzuursamenstelling en -verzadiging als gevolg van stijgende temperaturen vinden bij deze soort sneller plaats dan bij andere diatomeeën.

5.4.5 *Porphyridium purpureum*

Golueke and Oswald (1962) beschrijven de kweek van *Porphyridium purpureum* op geconcentreerd zeewater (zoutgehalte < 4.6%) en afvalwater verrijkt met ureum, ijzerchelaat en andere toevoegingen. Afvalwater leidt tot versnelde groei maar het is niet duidelijk welke component hiervoor verantwoordelijk is. Deze alg is relatief makkelijk te handhaven als dominant organisme (99% van de totale droge biomassa), ook in aanwezigheid van bacteriën of verontreinigingen. Kovač et al (2013) vermelden dat deze alg bij een dieetinclusie van 5-10% meetbaar gunstige effecten heeft op kippen en eieren.

Guihéneuf and Stengel (2015) beschrijven de gecombineerde effecten van een drietal parameters op de productie van een aantal componenten in *P. purpureum*. Er werden verschillende concentraties NaNO₃ (0, 0.1 en 1 g/L), lichtintensiteiten (30, 100 en 200 μmol/m²/s) en temperaturen (10, 15, 20, 25 en 30°C) toegepast. Voor de productie van PB, koolhydraten, vetzuren en EPA was een N overmaat gunstig. NO₃ tekort leidde tot verminderde groei, phycoerythrine(PE)-, vetzuur- en EPA-concentraties, wat duidt op de afbraak van membranen. Koolhydraatproductie daarentegen werd gestimuleerd. Na verversen van het medium kwamen PB en vetzuurconcentraties op het oude niveau terug, met name PE en EPA, wat lijkt te duiden op een compleet herstel van plastidemembranen en phycobilisomen. De hoogste PB concentratie (2.9% DS) werd bereikt bij lage lichtintensiteit (30 μmol/m²/s) en temperatuur (10°C). Maximale PB productiviteit van 33 mg/L werd echter bereikt bij 20°C (en lage lichtintensiteit). Onder deze omstandigheden bevatte de biomassa ook aanzienlijke hoeveelheden andere waardevolle componenten, o.a. koolhydraten 32.5 % DS, EPA 0.21 % DS, Chla 646 μg/g DS, zeaxanthine 198 μg/g DS en β-caroteen 139 μg/g DS. De PB concentratie in *P. purpureum* kan oplopen tot 4.8% DS met 70% PE, 20% PC en 10% APC. Meestal wordt bij deze soort onderzoek gedaan aan extracellulaire polysachariden. De hoogste biomassa in batchcultures met N overmaat was 3.4 g/L. *P. purpureum* staat bekend om zijn zeer hoge biomassaproductie met productiviteiten rond de 0.37 g/L/d en kan blijven groeien gedurende NO₃ depletie. Dit kan te maken hebben met het gebruik van intracellulair N of door N te gebruiken die normaal bestemd is voor productie van PB. In voorgaande studies bleek dat een NaNO₃ concentratie van 1 g/L groei maximaliseert van *P. purpureum*. Voor optimale groei zijn een N-overmaat of continue kweek belangrijk. Voor hoge PB productie is continue of semi-continue kweek het meest voordelig. Bij een plotselinge blootstelling aan licht (bijv. door verdunning van de culture na het toevoegen van medium) neemt de PB concentratie af. De hoogste cellulaire koolhydraatproductie en volumetrische concentratie werden bereikt in *P. purpureum* bij N-overmaat, als gevolg van hoge biomassaproductie. Licht en temperatuur blijken zowel onafhankelijke als gecombineerde effecten te hebben op biomassaproductie met name onder niet-limiterende nutriëntconcentraties. Dit geldt ook voor PB productie. Cellen gekweekt bij lage lichtintensiteiten bevatten vaak drie keer zoveel PBs als bij hoge lichtintensiteiten. Temperatuur is de enige factor die invloed heeft op koolhydraatproductie met concentraties tot 768 mg/L. De koolhydraatconcentratie kon oplopen tot 45% DS bij lage lichtintensiteit en lage temperatuur. Ook de hoogste EPA en FA concentraties (0.4 en 3.7% DS) werden bereikt onder deze condities. Als de groeisnelheid afneemt door afgenomen lichtintensiteit, toegenomen celdichtheid, suboptimale temperatuur, suboptimale pH of toegenomen saliniteit neemt de concentratie EPA af en die van ARA toe. Met

toenemende lichtintensiteit en temperatuur namen de pigmentconcentraties af. Bij hoge lichtintensiteit en verhoogde temperatuur nemen de concentraties PB, Chla en carotenoïden af. Het extraheren van meerdere componenten via een bioraffinage keten zou gunstiger kunnen zijn dan het isoleren van een enkele component.

Razaghi et al (2014) beschrijven dat *P. purpureum* vooral wordt gekweekt voor de polysachariden. Het onderzoek bekeek de invloed van wisselende N:P ratio's (1.6-50) met de Redfield ratio (1:16) als referentie. Lage N:P ratio's beïnvloedden de groei negatief en de optimale ratio voor groei was 35-50 met specifieke groeisnelheden van 0.19 /d en 1.2 g biomassa DS/L. Hogere ratio's leidden tot cellen met een grotere diameter. Het ontstaan van cellen met een kleinere diameter onder N limitatie kan veroorzaakt worden door een herschikking van het fotosynthese apparaat of door het uitscheiden van exopolysachariden (door verhoogde oplosbaarheid van de celwanden). Verlaagde P concentraties kunnen leiden tot het vertragen van celdeling wat leidt tot het ontstaan van grotere cellen. Door toegenomen celgrootte kunnen er meer polysachariden opgehoopt worden. De koolhydratenconcentratie nam enigszins toe bij lagere ratio's, maar het algemeen effect van hogere ratio's op biomassagroei was belangrijker voor een hogere eindopbrengst. De koolhydraten werden voornamelijk opgehoopt in de late exponentiële en stationaire fase. Exopolysachariden uitgescheiden door *P. purpureum* kunnen een C bron zijn voor fermentatieprocessen zoals bioethanolproductie. N limitatie leidt in *P. purpureum* tot verlaagde chlorofyl en phycoerythrine concentraties. Ook stimuleren hoge lichtintensiteiten zetmeel- en exopolysacharidenvorming terwijl continue belichting alleen exopolysacharidenvorming stimuleert. De N:P ratio werd gevarieerd door de concentratie NO_3 te variëren bij een lichtintensiteit van $98 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (7000 lux). Onder N limitatie duurde de lag-fase langer en was de maximale celconcentratie lager terwijl deze hoger was onder N overmaat. De totale koolhydratenconcentratie was lager onder N limitatie en hoger onder N overmaat. Het extreem verhogen van de N concentratie kan leiden tot relatieve tekorten in andere nutriënten zoals P, sporenelementen en vitamines. Ook was er in deze studie mogelijk sprake van C limitatie.

Velea et al (2011) bekeken de invloed van licht (120 en $240 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) en NaHCO_3 op vorming van phycobiliproteïnen en exopolysachariden. Productie van deze stoffen en biomassa werden gestimuleerd door hogere lichtintensiteiten en NaHCO_3 concentraties. Maximale concentraties van phycoerythrine, R-phycoerythrine en allophycoerythrine waren 12, 10 en 3% DS. *P. purpureum* kan fluorescente phycobiliproteïnen, exopolysachariden, PUFAs, carotenoïden (zeaxanthine, tocoferol etc.) en vitamines ophopen. Voor optimale EPA productie moet de kweektemperatuur lager zijn dan 25°C . In dit artikel worden formules beschreven om de concentraties phycoerythrine, R-phycoerythrine en allophycoerythrine te berekenen m.b.v. een spectrofotometer. De hoogste groei werd gevonden bij $2\text{g NaHCO}_3/\text{L}$, wat 25% hoger is dan bij het standaard medium van kunstmatig zeewater. Ook leidt het verdubbelen van de lichtintensiteit tot 25% meer productie. Ophoping van phycobiliproteïnen vond juist plaats bij lagere lichtintensiteiten en hogere NaHCO_3 concentraties.

5.4.6 *Tetraselmis chuii*

Lowrey & Yildiz (2014) hebben de groei van de facultatief heterotrofe microalg *T. chuii* in het donker getest op koeienmest (uit een buitenvijver voor mestopslag), op vaste kippenmest opgelost in gedestilleerd water tot een concentratie van 3.2 g/L , en op bezonken vismest van gestreepte zeebaars. Er werd geen groei gevonden, wat te wijten is aan een tekort aan anorganisch C of slecht opneembaar organisch C. San Pedro et al (2013) vonden voor *T. chuii* een biomassaconcentratie van ongeveer 1.25 g/L en een biomassaproductiviteit van ongeveer 0.3 g/L/d op standaard Algal medium. Op Arnon medium werd een hogere productiviteit bereikt (0.4 g/L/d).

5.4.7 *Odontella aurita* en *sinensis*

Xia et al (2013b) hebben in buis en plaat bioreactoren (met een lichtweg van 3 tot 12 cm) gekeken naar het effect van kweekomstandigheden (N, P, Si en S, lichtintensiteit, lichtweglengte) op groei en biochemische samenstelling van *O. aurita*. Het optimale medium voor fotoautotrofe kweek bevat in de buisreactoren per liter 17.65 mmol N, 1.09 mmol P, 0.42 mmol Si en 24.51 mmol S. Dit resulteerde in een maximale biomassaproductie van respectievelijk 6.1-6.8 g/L en 6.7-7.8 g/L onder lage en hoge lichtintensiteiten. Uit proeven met verschillende plaatreactoren bleek dat een kortere lichtweg gunstiger was. β -1,3-glucan (het belangrijkste opslag koolhydraat in diatomeeën) hoopte op tot 50% DS gedurende de kweek. Deze component is een immunostimulant voor vissen en kan ook het immuunsysteem van zoogdieren verbeteren. Het hoogste vetpercentage (19.7% DS) werd bereikt bij 0.11 mmol Si/L en hoge lichtintensiteiten ten tijde van de oogst. EPA vormde 9-20% van de totale vetzuren. Gedurende de kweek namen SFAs en MUFAs toe in combinatie met een afname van EPA, mogelijk als gevolg van een afname van polaire vetten en een toename in de neutrale vetten. Uit deze alg kan ook sterolsulfaat geïsoleerd worden. De buisreactoren werden bedreven bij 150 en 300 μmol fotonen/ m^2/s , de plaatreactoren bij 200 μmol fotonen/ m^2/s . De concentratie Chla was significant hoger bij 17.65 dan bij 11.76 mmol N/L. Sulfaat had een negatief effect waarschijnlijk als gevolg van toegenomen saliniteit. De gecombineerde kweek van *O. aurita* en *Chondrus crispus* (Iers mos, een rode alg) leidde voor beide soorten tot een toename van 44% in biomassa-groei en PUFAs in vergelijking met de monocultures.

Xia et al (2014) beschrijven de productie van chrysolaminarine uit *Odontella aurita*. Dit is een glucaan, dat voornamelijk uit glucose bestaat en als natuurlijke antioxidant toegepast kan worden in aquacultuur, voeding en farmacie. Wateroplosbare chrysolaminarines (β -D-1,3-glucanen) zijn koolhydraten die worden opgehoopt als energiebron in mariene diatomeeën, vooral onder nutriëntarme omstandigheden. De anti-oxidatieve werking neemt toe bij toenemende concentraties en het vangt ROS weg. De activiteit in een test met hydroxylradicalen was echter lager dan die van de controle ascorbinezuur. Het ruwe extract heeft mogelijk een hogere anti-oxidatieve werking dan het pure extract. De hoogste productiviteit in een reactor was 306 mg/L/dag in experimenten met verschillende N concentraties en lichtintensiteiten. *O. aurita* wordt gekweekt in raceway-vijvers en wordt gebruikt als voedingssupplement door het hoge gehalte aan ω 3 vetzuren (EPA vormt maximaal 28% van de totale vetzuren). Ook bevat deze alg fucoxanthine en fytosterolen, die gezondheidsbevorderende effecten hebben. Bij een lichtintensiteit van 300 μmol fotonen/ m^2/s en een overmaat aan stikstof (18 mM) werd een maximale biomassaconcentratie van 6.36 g/L bereikt. Bij lage lichtintensiteiten (100 μmol fotonen/ m^2/s) en N concentraties (6 mM) nam de chrysolaminarine concentratie toe van 15 naar 61% DS, wat aantoont dat het een reservestof is. Chrysolaminarine productiviteit is het resultaat van biomassatoename en chrysolaminarine concentratie. Dit leidt ertoe dat de totale productiviteit het hoogst is bij hoge lichtintensiteit en hoge nutriëntconcentraties als gevolg van de hoge biomassatoename.

Dezelfde groep (Xia et al, 2013a) beschrijft de productie van fucoxanthine uit *O. aurita*. Lage lichtintensiteiten (100 μmol fotonen/ m^2/s) en een N overmaat (18 mM) bevorderen de productie. Bij een maximale biomassaconcentratie van 6.36 g/L werd een maximale fucoxanthineconcentratie bereikt van 18.47 mg/g DS in bellenkolom-fotobioreactoren (diameter 3 cm). De biomassaproductie na opschaling naar een plaat-fotobioreactor nam af, maar de volumetrische fucoxanthineproductie bleef vergelijkbaar. Bij lage lichtintensiteiten was er vrijwel identieke groei bij de verschillende N concentraties en de maximale biomassaconcentratie was 4 g/L. Bij hoge lichtintensiteit (300 μmol fotonen/ m^2/s) en N concentratie was er snellere groei en een hogere biomassaconcentratie (6.36 g/L) die 50% hoger was dan bij lage N concentratie (4.24 g/L). Eindconcentraties fucoxanthine waren bij hoge lichtintensiteiten ongeveer twee keer zo laag als bij lage lichtintensiteiten (zowel bij hoge als lage stikstofconcentraties). De maximale volumetrische fucoxanthineproductie

was 79.56 mg/L met een overmaat aan NO₃ en hoge lichtintensiteit, wat een recordproductie van fucoxanthine van 7.96 mg/L/d betekent. Bij een langere lichtweg nam de biomassaconcentratie af, maar de fucoxanthine concentratie in de droge biomassa was niet verschillend. De volumetrische fucoxanthineproductie van de reactor met de korte lichtweg was daardoor veel hoger. De belangrijkste carotenoïden in de pigmentfractie waren fucoxanthine, cis-fucoxanthine, diadinoxanthine, diatoxanthine en β -caroteen en de belangrijkste chlorofylcomponenten Chla en Chlc. Net als bij chrysolaminarine was de antioxidatieve werking van fucoxanthine minder dan die van ascorbinezuur. Toch vertonen fucoxanthine en fucoxanthinol hogere of gelijkwaardige activiteiten dan α -tocoferol wat betreft capaciteit om radicalen in te vangen.

Pasquet et al (2014) hebben het effect van drie verschillende kweektemperaturen (8, 16 en 24°C) onderzocht op groei en vetzuursamenstelling van *O. aurita*. Bij de laagste temperatuur werd de groei vertraagd maar nam het aandeel PUFAs (EPA en DHA) toe terwijl het aandeel SFAs afnam (C14:0 en C16:0). Ook het oogsttijdstip is van belang. Bij 24°C namen bijvoorbeeld EPA en DHA concentraties toe tijdens de stationaire fase terwijl het aandeel SFAs en PUFAs in de tijd afnam. *O. aurita* bevat naast PUFAs bioactieve componenten zoals pigmenten, vezels en fytosterolen. De lichtintensiteit tijdens de experimenten was 300 μmol fotonen/m²/s. De hoogste groeisnelheid en maximale celdichtheid werden bereikt bij 24°C, resp. 0.813/d en 0.639x10⁶ cellen/mL. De hoogste concentratie ω 3 vetzuren (45%, waarvan tot 39% EPA) werd gevonden bij 8°C in cultures die geoogst werden in de stationaire fase. Het enzym ω 3 desaturase is een temperatuurafhankelijk enzym. Het hoogste vetpercentage in andere onderzoeken aan deze alg (20% DS) werd gevonden bij hoge lichtintensiteiten (300 μmol fotonen/m²/s) en lage Si concentraties bij 25°C. In andere artikels werd een afname van PUFAs en een toename van SFAs en MUFAs in een batchcultuur gevonden met de hoogste concentratie EPA onder niet-nutriëntgelimiteerde condities. Hier werden in de groeifase (exponentiële fase) juist een hogere hoeveelheid EPA en afnemende hoeveelheden SFAs en MUFAs gevonden. Dit kan liggen aan de lage concentratie anorganisch C die in dit onderzoek gebruikt werd, aangezien deze belangrijk lijkt te zijn voor TAG accumulatie.

Plötner et al (2014) hebben getest of heterotrofe flagellaten (*Oxyrrhis marina* en *Cafeteria roenbergensis*) nutriënten uit bacteriën beschikbaar kunnen maken voor de diatomeeën *Coscinodiscus granii* en *Odontella sinensis*. Op deze manier zouden deze algen een competitief voordeel kunnen hebben bij de opname van opgeloste anorganische nutriënten. Flagellaten remineraliseren een aanzienlijk deel van de nutriënten die zij opnemen tijdens predatie van bacteriën. Algenculturen zijn zeer gevoelig voor de ingroei van concurrerende microalgen, pathogenen en grazers. Heterotrofe bacteriën hebben dankzij hun grotere oppervlakte/volume ratio een competitief voordeel bij de opname van nutriënten t.o.v. grote algencellen, voornamelijk onder nutriëntlimitatie. Bij N limitatie komen bijvoorbeeld grote hoeveelheden opgelost organisch materiaal vrij en uitgerekend onder deze omstandigheden bereiken algen hun hoogste vetpercentage. De proeven werden gedaan met en zonder flagellaten en onder verschillende omstandigheden: zonder een externe C bron of in aanwezigheid van organisch materiaal (gerstekorrels of digestaat). Het digestaat was afkomstig uit een vergister met vloeibare mest (varkensmest:koemest = 60:40), maiskuil en graskuil als substraten. Na vier weken werd het bemonsterd voor de algenproef en de pH was 8. De aanwezigheid van flagellaten had een positief effect op de groei van microalgen maar dit was context- en soortspecifiek. Vooral de groei van *C. granii* nam toe (30% hoger dan in het standaard medium). Heterotrofe flagellaten zullen vooral een gunstig effect hebben op de efficiëntie van nutriëntgebruik in organisch vervuild water met langzaam groeiende grote algensoorten, daar deze door hun grootte niet door flagellaten opgegeten kunnen worden. De algen groeiden niet goed bij een digestaatconcentratie hoger dan 0.5% en de toegepaste concentratie was 0.15%. Voor het experiment werd het supernatant van het digestaat overnacht bezonken en vervolgens verdund, gecentrifugeerd en gefilterd. De flagellaten vormden in volume gemiddeld ongeveer 1% van het gecombineerde

volume van diatomeeën en flagellaten bij elkaar. Er werd 13% hogere groei van *O. sinensis* gevonden in aanwezigheid van flagellaten en digestaat. Naast hogere groeisnelheden werd ook de stationaire fase sneller bereikt. De aanwezigheid van flagellaten verhoogt de netto nutriëntverwijdering door het oogsten van algen. Het lijkt erop dat de verhoogde beschikbaarheid van ammonia een grote bijdrage leverde aan het effect. Ammonium wordt volgens bronnen (en in dit experiment) vooral opgenomen bij hoge fotonflux dichtheden ($>60 \mu\text{mol fotonen/m}^2/\text{s}$). Des te hoger de groeisnelheid van de alg, des te kleiner zal de toegevoegde waarde van flagellaten zijn. In het supplement van dit artikel staan de details over het digestaat. Een onverwacht resultaat was dat microalgen hogere maximum groeisnelheden kunnen bereiken en dus sneller nutriënten uitputten in de aanwezigheid van flagellaten. Dit zou de procestijd en energievraag van commerciële systemen kunnen verkorten.

5.4.8 Andere algen

Del Campo et al (2007) beschrijven een aantal interessante kandidaten voor carotenoïdenproductie. Dit zijn mutante stammen van *Chlorococcum* sp. (vooral voor astaxanthine) en *Dunaliella bardawil* (voor phytoeen en phytoflueen, precursors van carotenoïden). De meeste stammen die interessante componenten produceren zijn obligaat fototroof, maar in het geval van carotenoïdeproductie kan licht een absolute vereiste zijn voor het induceren van carotenogenese. De productie van deze componenten door heterotrofe algen ligt hierdoor vooralsnog niet heel erg voor de hand.

Batista et al (2013) beschrijven *Diacronema vlkianum* en *Isochrysis galbana* die vooral DHA en EPA bevatten. Beide algen zijn wijdverspreid en dienen als voer voor diverse waterdieren, vooral in larvale en juveniele weekdieren, kreeftachtigen en vissen. Dit heeft voornamelijk te maken met het hoge PUFA gehalte. De algen bevatten verder sterolen (vooral sitosterol), tocoferolen, gekleurde pigmenten en andere nutraceutische stoffen. 2.4-3.2 % van de DS bestaat uit pigmenten (fucoxanthine, luteïne/zeaxanthine, β -caroteen, Chla en Chlc). *D. vlkianum* bevat naast EPA en DHA ook een relatief hoog percentage DPA ω 6 (C22:5).

Marrez et al (2014) beschrijven dat het gebruik van ureum i.p.v. NO_3 of NO_2 leidt tot hogere vet- en vetzuurconcentraties voor *Isochrysis galbana*.

Gómez-Loredo et al (2015) hebben de groei van *I. galbana* vergeleken met die van *P. tricornutum* (zie paragraaf over deze alg).

Xia et al (2014) beschrijven chrysolaminarine in *Chaetoceros affinis* en *Skeletonema costatum*. De concentratie nam, evenals bij *O. aurita*, snel toe na het opraken van N in de stationaire fase. Ook nam de concentratie onder nutriëntverzaadiging en hoge lichtintensiteit toe.

Campenni et al (2013) beschrijven *Chlorella protothecoides* die heterotroof gekweekt kan worden, uitgebreid bestudeerd is en grote hoeveelheden luteïne en vetzuren bevat met een goed profiel voor biodieselproductie. De alg kan switchen tussen een autotrofe en heterotrofe levenswijze door opbouw en afbraak van chloroplasten. In dit onderzoek werden carotenoïde- en vetzuurproductie door *C. protothecoides* onder autotrofe condities onderzocht. *C. protothecoides* werd gekweekt totdat de N bron uitgeput was en vervolgens verdund in een NaCl oplossing in concentraties van 10, 20 en 30 g/L. Dit leidde tot nutritionele, licht- en zoutstress. De hoogste producties van carotenoïden en FAs werden bereikt bij 20g/L NaCl. Door de verdunning vond er een verkleuring plaats van groen naar oranje-rood, wat wijst op carotenoïdeproductie. Vetoplosbare stoffen in de heterotrofe variant kunnen tot 72% DS uitmaken, wat vier keer zoveel is als bij autotrofe groei (16% DS). De biomassaconcentratie was 30 g/L t.o.v. 1.5 g/L. Ook bevat de heterotrofe variant luteïne. In hun proeven nam biomassagroei van de autotrofe variant zelfs na extracellulaire N depletie toe. Dit werd verklaard door de consumptie van intracellulaire N bronnen zoals chlorofyl. De maximale carotenoïde concentratie was 0.8 % DS, waarvan het grootste deel bestond uit cantaxanthine. Een hogere lichtintensiteit leidt tot verhoogde/versnelde carotenogenese, maar een lagere lichtintensiteit leidt tot meer luteïne/zeaxanthine. De hogere lichtintensiteit leidt tot

meer astaxanthine en de esters daarvan. Autotroof kweken leidt tot lagere opbrengsten voor biomassa en vetproductiviteit, maar leidt tot een hogere carotenoiden opbrengst. De autotrofe kweek leidt daarnaast tot lagere milieubelasting, lagere kosten en er is geen organisch C voor nodig.

Cho et al (1999) onderzochten activatie van de groei van *Isochrysis galbana* door extracten van zeewieren toe te voegen. Bij *Enteromorpha linza* ging dit om methanoloplosbare extracten, bij *Grateloupia turuturu* en *Monostroma nitidum* ging dit om wateroplosbare extracten. De concentratie van *M. nitidum* extract was 1 mg/ml, wat leidde tot een verhoging van de celgroeisnelheid van 0.52 naar 0.65 per dag. Celmassa van de culture en specifieke groeisnelheid werden dus verhoogd door het toevoegen van de extracten. De celgrootte, basale biochemische compositie, vetzuursamenstelling en verteringsefficiëntie door schelpdieren vertoonden echter slechts marginale verschillen tussen cultures van *I. galbana* met of zonder wateroplosbaar *M. nitidum* extract. Het kweken van microalgen als voeding voor weekdieren, kreeftachtigen en vissen is een belangrijke component van de aquacultuur sector. Dit geldt vooral voor de vroege stadia van mariene soorten. Onvoldoende PUFAs (DHA en EPA) leidt tot hoge sterfte en lage groeisnelheden. Alleen EPA is echter niet afdoende om dit te voorkomen. *I. galbana* bevat beide PUFAs, is lastig in hoge dichtheden te kweken, behalve mogelijk in bioreactoren. EPA en DHA concentraties veranderden niet na toevoeging van het extract, maar de totale hoeveelheid $\omega 3/\omega 6$ ratio was wel toegenomen, voornamelijk door de toename van 18:4 $\omega 3$. Zonder extract was de 18:2 $\omega 6$ fractie hoger. Voor de volgende soorten had het zelfde waterige extract een positief effect op cel aantallen: *D. salina*, *I. galbana*, *Navicula pelliculosa*, *Pavlova lutheri* en *Tetraselmis levi*. Vooral de dichtheid van *D. salina* nam met een factor twee toe. Het is niet duidelijk welke component uit het zeewierextract de toegenomen groei veroorzaakt.

6 Conclusie

De op dit moment commercieel meest interessante zout- en brakwatersoorten zijn *Spirulina*, *Dunaliella* sp. en *Aphanizomenon flos-aquae* (Buono et al, 2014). Verkoop van (voedingsingrediënten uit) deze eerste twee soorten lijkt dan ook de meeste potentie te hebben. Andere interessante soorten zijn *N. gaditana* (o.a. EPA), *T. chuii* en *O. aurita*, maar deze worden in mindere mate gekweekt.

7 Literatuur

- Andersen, R. A. 2005. Algal culturing techniques. Academic Press, 578 pp.
- Anoniem, 2015. De basis van algen kweken. <http://www.wageningenur.nl/nl/Expertises-Dienstverlening/Leerstoelgroepen/Agrotechnologie-en-Voedselwetenschappen/Bioprocetechnologie/Profielwerkstuk/Zelf-kweken.htm>
- Batista, A. P., L. Gouveia, N. M. Bandarra, J. M. Franco and A. Raymundo (2013). "Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products." *Algal Research* 2(2): 164-173.
- Brody, S. S. and L. Stelzig (1983). "Effect of Pressure on the Absorption Spectra of Phycobiliprotein and *Porphyridium Cruentum*." *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 38(5-6): 458-460.
- Buono, S., A. L. Langellotti, A. Martello, F. Rinna and V. Fogliano, 2014. Functional ingredients from microalgae. *Food & Function* 5: 1669-1685
- Campenni, L., B. P. Nobre, C. A. Santos, A. C. Oliveira, M. R. Aires-Barros, A. M. F. Palavra and L. Gouveia (2013). "Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(3): 1383-1393.
- CCAP Website, 2016. <http://www.ccap.ac.uk/>
- Chauton, M. S., Y. Olsen and O. Vadstein (2013). "Biomass production from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: Nutrient stress and chemical composition in exponential fed-batch cultures." *Biomass and Bioenergy* 58: 87-94.
- Chen, C. Y., P. C. Kao, C. J. Tsai, D. J. Lee and J. S. Chang (2013). "Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycocyanin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*." *Bioresource Technology* 145: 307-312.
- Chen, H. B., J. Y. Wu, C. F. Wang, C. C. Fu, C. J. Shieh, C. I. Chen, C. Y. Wang and Y. C. Liu (2010). "Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes." *Biochemical Engineering Journal* 53(1): 52-56.
- Cho, J. Y., H. J. Jin, H. J. Lim, J. N. C. Whyte and Y. K. Hong (1999). "Growth activation of the microalga *Isochrysis galbana* by the aqueous extract of the seaweed *Monostroma nitidum*." *Journal of Applied Phycology* 10(6): 561-567.
- Cohen, Z. Chemicals from microalgae (1999). CRC Press, 419 pp.
- Combe, C., P. Hartmann, S. Rabouille, A. Talec, O. Bernard and A. Sciandra (2015). "Long-term adaptive response to high-frequency light signals in the unicellular photosynthetic eukaryote *Dunaliella salina*." *Biotechnology and Bioengineering* 112(6): 1111-1121.
- Das, P., W. Lei, S. S. Aziz and J. P. Obbard (2011a). "Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light." *Bioresource Technology* 102(4): 3883-3887.
- Das, P., S. S. Aziz and J. P. Obbard (2011b). "Two phase microalgae growth in the open system for enhanced lipid productivity." *Renewable Energy* 36(9): 2524-2528.
- Del Campo, J. A., M. García-González and M. G. Guerrero (2007). "Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives." *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(6): 1163-1174.
- Doan, T. T. Y. and J. P. Obbard (2012). "Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting." *Algal Research* 1(1): 17-21.
- Enzing, C., M. Ploeg, M. Barbosa & L. Sijtsma, 2014. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. Report EUR 26255 EN.
- Fu, W., O. Guomundsson, G. Paglia, G. Herjólfsson, O. S. Andrésón, B. O. Pálsson and S. Brynjólfsson (2013). "Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(6): 2395-2403.
- Fu, W., K. Wichuk and S. Brynjólfsson (2015). "Developing diatoms for value-added products: Challenges and opportunities." *New Biotechnology*.
- Golueke, C. G. and W. J. Oswald (1962). "The mass culture of *Porphyridium cruentum*." *Appl. Microbiol.* 10: 102-107.
- Gómez-Loredo, A., J. Benavides and M. Rito-Palomares (2015). "Growth kinetics and fucoxanthin production of *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* cultures at different light and agitation conditions." *Journal of Applied Phycology*.
- Guihéneuf, F. and D. B. Stengel (2015). "Towards the biorefinery concept: Interaction of light, temperature and nitrogen for optimizing the co-production of high-value compounds in *Porphyridium purpureum*." *Algal Research* 10: 152-163.
- Guiry, M. D. (2012). "How many species of algae are there?" *Journal of Phycology* 48(5): 1057-1063.
- Hazel, J. R. (1995). "Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation?" *Annual Review of Physiology* 57: 19-42.
- Hohenadler (2010). Extensieve algenkweek in verschillende media en systemen. Een praktisch onderzoek naar de productiviteit van *Phaeodactylum tricornutum* in verschillende media en kweeksystemen. Eindrapport. Spring- Centrum voor duurzaamheid en water/Hogeschool Zeeland
- Kent, M., H. M. Welladsen, A. Mangott and Y. Li (2015). "Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements." *PLoS ONE* 10(2).
- Kim, C. W., M. G. Sung, K. Nam, M. Moon, J. H. Kwon and J. W. Yang (2014). "Effect of monochromatic illumination on lipid accumulation of *Nannochloropsis gaditana* under continuous cultivation." *Bioresource Technology* 159: 30-35.

- Kovač, D. J., J. B. Simeunović, O. B. Babić, A. C. Mišan and I. L. Milovanović (2013). "Algae in food and feed." *Food and feed research* 40(1): 21-31.
- Kroon, A. 2016. *Algae Food & Fuel*. Personal communication.
- Lamers, P. P., M. Janssen, R. C. H. De Vos, R. J. Bino and R. H. Wijffels (2012). "Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga." *Journal of Biotechnology* 162(1): 21-27.
- Liu, J., Z. Sun, H. Gerken, Z. Liu, Y. Jiang and F. Chen (2014). "*Chlorella zofingiensis* as an alternative microalgal producer of astaxanthin: Biology and industrial potential." *Marine Drugs* 12(6): 3487-3515.
- Lowrey, J. and I. Yildiz (2014). Investigation of heterotrophic cultivation potential of *Chlorella vulgaris* and *Tetraselmis chuii* in controlled environment wastewater growth media from dairy, poultry and aquaculture industries. *Acta Horticulturae*. 1037: 1109-1114.
- Madkour, F. F., A. E. W. Kamil and H. S. Nasr (2012). "Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media." *Egyptian Journal of Aquatic Research* 38(1): 51-57.
- Markou, G. (2014). "Effect of various colors of light-emitting diodes (LEDs) on the biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in semi-continuous mode." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172(5): 2758-2768.
- Marrez, D. A., M. M. Naguib, Y. Y. Sultan, Z. Y. Daw and A. M. Higazy (2014). "Evaluation of chemical composition for *Spirulina platensis* in different culture media." *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 5(4): 1161-1171.
- Martins, D. A., L. Custódio, L. Barreira, H. Pereira, R. Ben-Hamadou, J. Varela and K. M. Abu-Salah (2013). "Alternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae." *Marine Drugs* 11(7): 2259-2281.
- Mary Leema, J. T., R. Kirubakaran, N. V. Vinithkumar, P. S. Dheenan and S. Karthikayulu (2010). "High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater." *Bioresource Technology* 101(23): 9221-9227.
- Michael, C., M. del Ninno, M. Gross and Z. Wen (2015). "Use of wavelength-selective optical light filters for enhanced microalgal growth in different algal cultivation systems." *Bioresource Technology* 179: 473-482.
- Michalak, I. and K. Chojnacka (2015). "Algae as production systems of bioactive compounds." *Engineering in Life Sciences* 15(2): 160-176.
- Mooij, P. R., G. R. Stouten, J. Tamis, M. C. M. Van Loosdrecht and R. Kleerebezem (2013). "Survival of the fattest." *Energy and Environmental Science* 6(12): 3404-3406.
- Novel Food Catalogue, 2016. Website http://ec.europa.eu/food/safety/novel_food/catalogue/search/public/index.cfm
- Parlevliet, D. and N. R. Moheimani (2014). "Efficient conversion of solar energy to biomass and electricity." *Aquatic Biosystems* 10(1).
- Pasquet, V., L. Ulmann, V. Mimouni, F. Guihéneuf, B. Jacquette, A. Morant-Manceau and G. Tremblin (2014). "Fatty acids profile and temperature in the cultured marine diatom *Odontella aurita*." *Journal of Applied Phycology*: 1-7.
- Perin, G., A. Segalla, S. Basso, D. Simionato, A. Meneghesso, E. Sforza, A. Bertucco and T. Morosinotto (2014). Biotechnological optimization of light use efficiency in *Nannochloropsis* cultures for biodiesel production. *Chemical Engineering Transactions*. 37: 763-768.
- Plötner, W. A., H. Hillebrand, R. Ptacnikova and R. Ptacnik (2014). "Heterotrophic flagellates increase microalgal biomass yield." *Journal of Applied Phycology*.
- Razaghi, A., A. Godhe and E. Albers (2014). "Effects of nitrogen on growth and carbohydrate formation in *Porphyridium cruentum*." *Central European Journal of Biology* 9(2): 156-162.
- San Pedro, A., C. V. González-López, F. G. Acién and E. Molina-Grima (2013). "Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production." *Bioresource Technology* 134: 353-361.
- Simionato, D., M. A. Block, N. La Rocca, J. Jouhet, E. Maréchal, G. Finazzi and T. Morosinotto (2013). "The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus." *Eukaryotic Cell* 12(5): 665-676.
- Simionato, D., E. Sforza, E. Corteggiani Carpinelli, A. Bertucco, G. M. Giacometti and T. Morosinotto (2011). "Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation." *Bioresource Technology* 102(10): 6026-6032.
- Spruijt, J., R. van der Weide & M. van Krimpen, 2014. Kansen voor micro-algen als grondstofstroom in diervoeders. ACRRES-Wageningen UR, PPO rapport nr. 619. 50 pp.
- Velea, S., L. Ilie and L. Filipescu (2011). "Optimization of *Porphyridium purpureum* culture growth using two variables experimental design: Light and sodium bicarbonate." *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science* 73(4): 81-94.
- Viganì, M., C. Parisi, E. Rodríguez-Cerezo, M. J. Barbosa, L. Sijtsma, M. Ploeg and C. Enzing (2015). "Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU." *Trends in Food Science and Technology* 42(1): 81-92.
- Voort, M.P.J. van der, Vulsteke, E., Visser, C.L.M. de. 2015a. Macro-economics of algae products, Public Output report of the EnAlgae project, Swansea, June 2015, 47 pp.
- Voort, M. P. J. van der, 2015b. Voedsel- en diervoeder veiligheid van algenproducten . Verkenning van wet- en regelgeving voor voedselveilige productie van algen. PPO rapport nr. 631.
- Wang, C. Y., C. C. Fu and Y. C. Liu (2007). "Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*." *Biochemical Engineering Journal* 37(1): 21-25.
- Xia, S., B. Gao, A. Li, J. Xiong, Z. Ao and C. Zhang (2014). "Preliminary characterization, antioxidant properties and production of chrysolaminarin from marine diatom *Odontella aurita*." *Marine Drugs* 12(9): 4883-4897.
- Xia, S., L. Wan, A. Li, M. Sang and C. Zhang (2013b). "Effects of nutrients and light intensity on the growth and biochemical composition of a marine microalga *Odontella aurita*." *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 31(6): 1163-1173.

-
- Xia, S., K. Wang, L. Wan, A. Li, Q. Hu and C. Zhang (2013a). "Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*." *Marine Drugs* 11(7): 2667-2681.
 - Xie, Y., Y. Jin, X. Zeng, J. Chen, Y. Lu and K. Jing (2015). "Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycocyanin production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under phototrophic cultivation." *Bioresource Technology* 180: 281-287.
 - Xue, S., Z. Su and W. Cong (2011). "Growth of *Spirulina platensis* enhanced under intermittent illumination." *Journal of Biotechnology* 151(3): 271-277.
 - Zhang, L., L. Chen, J. Wang, Y. Chen, X. Gao, Z. Zhang and T. Liu (2015). "Attached cultivation for improving the biomass productivity of *Spirulina platensis*." *Bioresource Technology* 181: 136-142.
 - Zhang, T. Y., H. Y. Hu, Y. H. Wu, L. L. Zhuang, X. Q. Xu, X. X. Wang and G. H. Dao (2016). "Promising solutions to solve the bottlenecks in the large-scale cultivation of microalgae for biomass/bioenergy production." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 60: 1602-1614.
 - Zhao, P., W. Gu, S. Wu, A. Huang, L. He, X. Xie, S. Gao, B. Zhang, J. Niu, A. Peng Lin and G. Wang (2014). "Silicon enhances the growth of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin under green light and low temperature." *Scientific Reports* 4.
 - Zijffers, J. W. F., K. J. Schippers, K. Zheng, M. Janssen, J. Tramper and R. H. Wijffels (2010). "Maximum Photosynthetic Yield of Green Microalgae in Photobioreactors." *Marine Biotechnology* 12(6): 708-718.

Appendix I

Soort	Medium	Auteur
<i>D. salina</i> UTEX LB#200	Gg-8	Fu et al, 2013
<i>D. salina</i> CCAP 19/18	Medium Lamers et al 2010 zonder N (gebaseerd op <i>D. tertiolecta</i>)	Lamers et al, 2012
<i>Dunaliella</i> sp.	Aangepast Johnson medium	Kent et al, 2015
<i>D. tertiolecta</i> CCAP 19/6B	Synthetisch zeewater medium	Zijffers et al, 2010
<i>N. gaditana</i> CCMP526	Aangepast f/2, 5x zoveel NaNO ₃	Kim et al, 2014
<i>N. gaditana</i> 849/5 CCAP	Steriel f/2 medium	Perin et al, 2014
<i>N. gaditana</i> 849/5 CCAP	Steriel gefilterd f/2 medium	Simionato et al, 2011
<i>N. gaditana</i> 849/5 from CCAP	Steriel gefilterd f/2 medium	Simionato et al, 2013
<i>Nannochloropsis</i> sp.	f/2 Guillard medium	Doan & Obbard, 2012
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Sterilized seawater enriched with Guillard F medium	Das et al, 2011b
<i>Nannochloropsis</i> sp.	f/2 medium	Kent et al, 2015
<i>Nannochloropsis</i>	Verrijkt gesteriliseerd zeewater	Das et al, 2011a
<i>N. gaditana</i> Lubián CCMP 527	Algal-verrijkt natuurlijk zeewater	San Pedro et al, 2013
<i>S. platensis</i>	Geen standaard medium?	Chen et al, 2013
<i>S. platensis</i> breed F3	Zarrouk medium	Xue et al, 2011
<i>S. platensis</i>	Zarrouk medium	Zhang et al, 2015
<i>S. platensis</i> (ATCC-29408)	Zarrouk medium	Wang et al, 2007
<i>A. platensis</i> (WH879)	Zarrouk medium	Xie et al, 2015
<i>S. platensis</i> (K-2)	Low cost medium	Madkour et al, 2012
<i>S. platensis</i> (K-2)	Zarrouk medium	Madkour et al, 2012
<i>A. platensis</i>	Zarrouk medium	Mary Leema et al, 2010
<i>A. platensis</i>	Seawater media	Mary Leema et al, 2010
<i>S. platensis</i> ATCC29408	Zarrouk	Chen et al, 2010
<i>A. platensis</i> SAG 21.99	Zarrouk medium	Markou, 2014
<i>S. platensis</i>	BG-11	Marrez et al, 2014
	Modified BG-11	
	Zarrouk (ZM)	
	Synthetische urine	
<i>S. maxima</i> (Setchell & Gardner, LB2342)	Spirulina medium	Batista et al, 2013
<i>I. galbana</i> (ISG-1)	f/2	Gómez-Loredo et al, 2015
<i>I. galbana</i> (Mary Parke collection)	Wallerstein & Miquel medium (3:1 in filtered seawater with 35% (?) salt)	Batista et al, 2013
<i>I. galbana</i> (CCMP-1324)	f/2 medium	Cho et al, 1999
<i>O. aurita</i> K-1251	Aangepast L1 medium uit kunstmatig zeewater	Xia et al, 2013b
<i>O. aurita</i> CCMP1796	Aangepast kunstmatige zeewater	Pasquet et al, 2014
<i>O. aurita</i> K-1251	Gemodificeerd L1 medium	Xia et al, 2013b
<i>P. purpureum</i>	Concentrated (2x) seawater-sewage medium with additions	Golueke and Oswald, 1962
<i>P. purpureum</i> GUMACC25 UTEX 161	f/2 met hogere concentraties Na ₂ PO ₄ , sporenelementen en vitamines	Razaghi et al, 2014

<i>P. purpureum</i>	Kunstmatig zeewater	Velea et al, 2011
<i>P. purpureum</i> PLY#539	f/2-RSE medium	Guihéneuf & Stengel, 2015
<i>P. tricornutum</i> Bohlin CCMP 2561	Guillard f/2 uit gefilterd en gesteriliseerd zeewater	Chauton et al, 2013
<i>P. tricornutum</i>	f/2 uit gesteriliseerd zeewater	Zhao et al, 2014
<i>P. tricornutum</i> (PHT-1)	f/2	Gómez-Loredo et al, 2015
<i>P. tricornutum</i> SAG 1090-1a	'Algal'-verrijkt natuurlijk zeewater	San Pedro et al, 2013
<i>T. chuii</i>	Aangepast f/2	Lowrey and Yildiz, 2014
<i>T. chuii</i> SAG 8-6	Algal-verrijkt natuurlijk zeewater	San Pedro et al, 2013
<i>T. suecica</i> CCAP 66/4	Algal-verrijkt natuurlijk zeewater	San Pedro et al, 2013
<i>D. vlkianum</i> (Mary Parke collection)	Wallerstein & Miquel medium (3:1 in filtered seawater with 35% (?) salt)	Batista et al, 2013

Correspondentie adres voor dit rapport:

Postbus 430
6700 AK Lelystad
T 0320 29 11 11
<http://acres.nl>

Rapport 749

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 5.000 medewerkers en 10.000 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.



