



Astaxanthine 2.0

Hoogwaardige inhoudsstoffen uit algen in kassen

Lex de Boer², Jelle van den Bos⁶, Wim Graman⁸, Sander Hazewinkel³, Silke Hemming¹, Gerwien Kerkhof⁹, Cees van der Lans⁵, Teus Luijendijk², Robert Prins⁷, Eugene Roebroek³, Jim van Ruijven¹, Marta Streminska¹, Joost van de Ven⁴, Chris Vermeer², Wim Voogt¹, Wilko Wisse⁵

Rapport WPR-808

1 Wageningen University & Research Glastuinbouw, 2 Groen Agro Control, 3 Lgem, 4 OCAP/Linde Gas, 5 Lans, 6 Bosplant, 7 Algae4You, 8 J&J Algae, 9 Rabobank

Referaat

Het doel van dit project was de realisatie van een proof-of-principle keten voor de productie van astaxanthine als oleoresin uit de alg *Haematococcus pluvialis* in fotobioreactoren in Nederlandse kassen. Astaxanthine is een sterk antioxidant dat bij kan dragen aan een gezonde voeding voor consumenten. Astaxanthine kan in Nederlandse kassen duurzaam worden geproduceerd (kassen als zonnecollector, gebruik afval CO₂ uit industrie, reinigen afvalwater). Binnen dit project is onderzoek verricht naar de selectie van natuurlijke algenstammen op kasniveau, klassieke stamverbetering op labniveau (uitgangsmateriaal), procesverbetering in alle fases van de productie (voorkweek, opkweek, groene fase, rode fase) door optimalisatie teeltfactoren en hygiënisatie (teelt en productie) en het maken van een proof-of-principle eindproduct (eindformulering) volgens marktspecificatie (markt en economie). Met het project is kennis vergaard om een nieuw verdienmodel voor de productie van een hoogwaardige stof (astaxanthine) in de tuinbouw te realiseren. Er is een proof-of-principle van een economisch rendabele productieketen van uitgangsmateriaal over productie tot product eindformulering volgens specificaties van de markt aangetoond voor de productie van astaxanthine uit *Haematococcus pluvialis*.

Abstract

The aim of this project was the realization of a proof-of-principle value chain for the production of astaxanthin as oleoresin from the algae *Haematococcus pluvialis* in photobioreactors in Dutch greenhouses. Astaxanthin is a strong antioxidant that can contribute to a healthy diet for consumers. Astaxanthin can be produced sustainably in Dutch greenhouses (greenhouses as solar collectors, usage of waste CO₂ from industry, cleaning and recycling of waste water). Within this project, research was carried out into the selection of natural algae strains at the greenhouse level, classical strain improvement at lab level (starting material), process improvement at all stages of production, from pre-cultivation, cultivation, green phase and red phase, by the optimization of all cultivation factors and sanitation (growth and production) and designing a proof-of-principle end product (formulation) according to market specification (market and economy). With the project, knowledge has been gathered to realize a new revenue model for the production of a high-quality substance (astaxanthin) in horticulture. A proof-of-principle of an economically viable production chain of starting material from production to product final formulation according to market specifications has been demonstrated for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*.

Rapportgegevens

Rapport WPR-808
Projectnummer: 3742219200

DOI nummer: 10.18174/455264
Thema: Nieuwe verdienmodellen

Dit project / onderzoek is mede tot stand gekomen door de bijdrage van de topsector Tuinbouw & Uitgangsmateriaal, het ministerie van LNV, Groen Agro Control, Lgem, OCAP CO₂/Linde Gas, Lans, Bosplant, J&J Algae, Algae4You, Rabobank en uitgevoerd door Wageningen University & Research en stichting Control in Flowers & Food.

Disclaimer

© 2018 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Glastuinbouw, Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk T 0317 48 56 06, www.wur.nl/plant-research.

Kamer van Koophandel nr.: 09098104

BTW nr.: NL 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 aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Adresgegevens

Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk
Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk
T +31 (0)317 48 56 06

Inhoud

	Samenvatting	7
1	Inleiding	9
1.1	Achtergrond	9
1.2	Doelstelling project	9
1.3	Verwachte project resultaten	10
1.4	Maatschappelijke, economische en wetenschappelijke meerwaarde	10
1.5	State of the art	11
2	Werkpakketten	13
3	Uitgangsmateriaal (WP1)	15
3.1	Werkzaamheden	15
3.1.1	Screening van natuurlijke <i>Haematococcus pluvialis</i>	15
3.1.2	Klassieke stamverbetering <i>Haematococcus pluvialis</i>	15
3.2	Materiaal en methodes	17
3.2.1	Natuurlijke stammen <i>Haematococcus pluvialis</i>	17
3.2.2	Klassieke stamverbetering <i>Haematococcus pluvialis</i>	17
3.2.2.1	Rein kweken van de stammen	17
3.2.2.2	Mutagenese	17
3.2.2.3	Primaire selectie	18
3.2.2.4	Secundaire selectie	18
3.2.2.5	Astaxanthine analyse	19
3.3	Resultaten	19
3.3.1	Natuurlijke stammen <i>Haematococcus pluvialis</i>	19
3.3.2	Klassieke stamverbetering <i>Haematococcus pluvialis</i>	20
3.3.2.1	Mutagenese	20
3.3.2.2	Primaire selectie	20
3.3.2.3	Secundaire selectie	21
3.4	Conclusie en discussie uitgangsmateriaal	23

4	Teelt en productie (WP2)	25
4.1	Werkzaamheden	25
4.1.1	Opkweek	25
4.1.2	Slagingspercentage	25
4.1.3	Productieverhoging	25
4.1.4	Stammenscreening	26
4.2	Materiaal en methodes	26
4.2.1	Levenscyclus van <i>Haematococcus pluvialis</i>	26
4.2.2	Teelt van <i>Haematococcus pluvialis</i> in kassen	27
4.2.3	Voorkweek in kweekkast	27
4.2.3.1	Reinkweek	27
4.2.4	Opkweek in klimaatcel	28
4.2.4.1	Plastic zakken	28
4.2.4.2	Telen in opkweek	30
4.2.5	Teeltsysteem in kas	31
4.2.5.1	Kassysteem	31
4.2.5.2	Algenteeltsysteem	31
4.2.5.3	Licht	33
4.2.5.4	CO ₂	33
4.2.5.5	Water	33
4.2.5.6	Nutriënten/ Teeltmedium	34
4.2.5.7	Metten en regelen	34
4.2.6	Telen in kas	35
4.2.6.1	Schoonmaken algenteeltsysteem	35
4.2.6.2	Inoculeren algenteeltsysteem	35
4.2.6.3	Groene fase	35
4.2.6.4	Rode fase	36
4.3	Experimenten en resultaten	38
4.3.1	Opkweek in klimaatcel	38
4.3.1.1	Capaciteit	38
4.3.1.2	Hygiëniseren met ClO ₂	38
4.3.1.3	Licht	38
4.3.1.4	CO ₂	39
4.3.2	Telen in kas	39
4.3.2.1	Lagere stikstofdosering	39
4.3.2.2	Lichtniveau groene fase	40
4.3.2.3	Lichtniveau rode fase	43
4.3.3	Experimenten verlaging lichtniveau / verhoging effectiviteit belichting	47
4.3.3.1	Positie LED	47
4.3.3.2	Hoeveelheid LED	47
4.3.3.3	Resultaten licht en groei	48
4.3.3.4	Resultaten licht en energieverbruik	50
4.4	Conclusies teelt en productie	51
4.5	Totale astaxanthine productie	51
4.6	Hygiëniseren	54
4.6.1	Besmetting	54
4.6.2	Hygieneprotocol	55
4.7	Waterverbruik	55

5	Eindformulering (WP3)	59
5.1	Werkzaamheden	59
5.2	Materiaal en methodes	59
5.2.1	Materiaal	59
5.2.2	Analyse	59
5.2.3	Extractie	60
5.3	Resultaten	61
5.3.1	Analyse	61
5.3.2	Extractie	61
5.4	Conclusie optimalisatie eindformulering	63
6	Markt en economie (WP4)	65
6.1	Werkzaamheden	65
6.2	Marktperspectief	65
6.3	Kostenanalyse productie	66
6.3.1	Economische kengetallen algenteeltsystemen in Bleiswijk	66
6.3.1.1	Algenproductie in Bleiswijk	66
6.3.1.2	Vaste kosten algenproductiesysteem in Bleiswijk	66
6.3.1.3	Vaste kosten voor kas en inrichting in Bleiswijk	67
6.3.1.4	Vaste kosten voor grond	67
6.3.1.5	Flexibele kosten voor algenteelt in Bleiswijk	67
6.3.2	Economische kengetallen commercieel algenteeltsystemen 1 ha	68
6.3.2.1	Vaste kosten algenproductie in kas op 1 ha	69
6.3.2.2	Flexibele kosten algenproductie in kas op 1 ha	70
6.4	Resultaten	70
6.4.1	Kengetallen algenproductie in Bleiswijk	70
6.4.2	Jaarlijkse kosten algenteelt	71
6.4.3	Kostprijs scenario's algenteelt	72
6.5	Conclusies markt en economie	73
7	Opschaling (WP5)	75
	Literatuur	77
	Bijlage 1 Ontwikkelingsstadia <i>Haematococcus pluvialis</i>	79
	Bijlage 2 Teeltresultaten <i>Haematococcus pluvialis</i>	81

Samenvatting

De productie van hoogwaardige stoffen uit algen en met name astaxanthine uit *Haematococcus pluvialis* biedt mogelijk perspectief voor Nederlandse tuinbouwondernemers die op zoek zijn naar nieuwe verdienmodellen. Het doel van dit project was de realisatie van een proof-of-principle keten voor de productie van astaxanthine als oleoresin uit de alg *Haematococcus pluvialis* in fotobioreactoren in Nederlandse kassen.

Astaxanthine is een sterk antioxidant dat bij kan dragen aan een gezonde voeding voor consumenten. Astaxanthine kan in Nederlandse kassen duurzaam worden geproduceerd (kassen als zonnecollector, gebruik afval CO₂ uit industrie, reinigen afvalwater).

Binnen dit project is onderzoek verricht naar de selectie van natuurlijke algenstammen op kasniveau, klassieke stamverbetering op labniveau (WP1 uitgangsmateriaal), procesverbetering in alle fases van de productie (voorkweek, opkweek, groene fase, rode fase) door optimalisatie teeltfactoren en hygiënisatie (WP2 teelt en productie) en het maken van een proof-of-principle eindproduct vanuit het geoogste product volgens marktspecificatie, over drogen van de biomassa, openbreken van de cellen en extractie van astaxanthine (WP3 eindformulering). Er is een economisch model ontwikkeld voor de berekening van de kostprijs, economische kengetallen zijn geproduceerd op basis van de gerealiseerde astaxanthine producties in dit project. Er is contact gelegd met marktpartijen (WP4 markt en economie). Belangrijke aspecten voor opschaling van de productie op commerciële schaal in de praktijk zijn geïnventariseerd (WP5 opschaling).

In werkpakket 1 zijn een aantal aanvullende natuurlijke stammen van *Haematococcus pluvialis* gescreend. Hierbij zijn vooral 3 stammen naar voren gekomen die perspectief leken te bieden op basis van bovengemiddelde resultaten op het gebied van groeisnelheid en astaxanthine productiviteit. Dat waren de stammen 840 (hoogste groeisnelheid, gemiddeld astaxanthine gehalte, totaal hoogste astaxanthine productie), 883 (hoogste astaxanthine gehalte, maar langzamere groei) en 358 (snelle groei, maar gemiddelde astaxanthine gehalte). Alle stammen werden ook in de grote reactoren in de kas gescreend en op basis van de resultaten kwam uiteindelijk 840 als de beste stam naar voren.

In hetzelfde werkpakket werd stam 840 met behulp van klassieke stamverbetering doorontwikkeld. In een aantal selectierondes werden echter maar beperkt verbeterde stammen gevonden. De stammen D en I leken potentie te hebben, de stam R had met grote waarschijnlijkheid een hogere astaxanthine productiviteit dan het wildtype 840.

In werkpakket 2 is gewerkt aan de verbetering van alle fases van de productie (voorkweek, opkweek, groene fase, rode fase) door optimalisatie van de teeltfactoren en hygiënisatie. Voor de opkweek is geëxperimenteerd met de groeifactoren licht en CO₂. Door het licht te dimmen, kon het aandeel gestreste cellen worden verlaagd. De continue CO₂ dosering bleek te lage pH waarden te geven. Het bleek dat een beperkte dosering van CO₂ ruim voldoende was voor de groei. Hygiënisatie van de opweekzakken met ClO₂ gaf veel minder uitval door besmettingen.

Tijdens de teelt in de grote reactoren in de kas bleek een lagere N dosering bij de start goed te voldoen, zo kon de stressfase sneller worden ingezet zonder de groeisnelheid te verlagen. De gehele belichting- en scherm cyclus van de teelt is geoptimaliseerd. Dit mede met het oog op energie- en kostenbesparing. Voor de groene fase is een trapsgewijze toename van het lichtniveau met de dichtheid opgenomen. Voor de rode fase is het aan- en uitschakelen van de SON-T en LED lampen aangepast en ook het inzetten van het energie- en verduisteringsscherm om zo constant mogelijke lichtcondities te kunnen bereiken. Energiebesparingen waren echter beperkt, vooral omdat in tendens meer licht ook een meerproductie geeft.

Gemiddeld over alle teelten in 2016-2018 was de teeltduur 37 dagen, waarbij de groene fase minder dan 10 dagen duurde. De groeisnelheid was gemiddeld 2,9 g/m²/d voor alle teelten en 3,5 g/m²/d, voor de beste 10 teelten. De astaxanthine gehalte was gemiddeld voor alle teelten 2,3%, voor de beste 10 teelten 3,5%. Op jaarbasis werd voor alle teelten 17,2 g/m² astaxanthine geproduceerd in de kas in Bleiswijk, voor de 10 beste teelten was dit 28,4 g/m². Aangezien de fotobioreactor configuratie in de experimentele kas in Bleiswijk erg ongunstig was (maar 42% benutting teeltoppervlak), mag er van uitgegaan worden dat de producties in een commerciële kas (77% benutting teeltoppervlak) hoger zijn. Op basis van de gerealiseerde productie kengetallen over alle teelten zou dan in een commerciële kas 27,5 g/m² astaxanthine kunnen worden geproduceerd of 45,5 g/m² op basis van de kengetallen van de beste 10 teelten.

In werkpakket 3 werd onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van eindformuleringen die aansluiten aan de wensen in de markt. Op basis van marktonderzoek werd vastgesteld dat een 5% of 10% astaxanthine bevattende oleoresin wenselijk is. Om voldoende astaxanthine gehalte in het oleoresin te bereiken is het juiste oogstmoment bepalend met oog op een optimale astaxanthine productiviteit en het voorkomen van astaxanthine degradatie en cellysis. Een hoge astaxanthine gehalte in de oogst is wenselijk voor verdere werking. Vriesdrogen leek een goede bewaarmethode. Verder is de methode om astaxanthine te ontsluiten uit de biomassa belangrijk voor de productie van een oleoresin. Na oogst moeten de cellen worden gebroken met zirconia beads alvorens de astaxanthine te extraheren. Zowel ethanol als ook scCO_2 (superkritisch CO_2) leken goede methodes te zijn om een oleoresin te produceren. Vanuit een 3,85% astaxanthine bevattende algenpoeder kon met ethanol een 7,5% oleoresin worden gemaakt met scCO_2 een 8,5% oleoresin. Bij beiden werd gebruik gemaakt van de natuurlijke olie in *Haematococcus pluvialis*. Stabilisatie van het eindproduct kan worden bereikt door toevoeging van vitamine E.

In werkpakket 4 werd een marktonderzoek uitgevoerd en werden contacten gelegd met mogelijke afnemers in de keten. Verder werd een economisch model ontwikkeld waarmee de kostprijs voor de productie op basis van in dit project gerealiseerde kengetallen van de productie kon worden berekend. Huidige kostprijs voor gemiddelde van 10 beste teelten met hoogste astaxanthine productie is ca. €222 per kg oleoresin (met 5% astaxanthine), of €4.442 per kg ds astaxanthine (optimistisch scenario), of €343 per kg oleoresin (met 5% astaxanthine), of €6.858 per kg ds astaxanthine ook rekening houdend met alle niet gelukte teelten en alle bijhorende kosten (realistisch scenario). In het marktonderzoek is vastgesteld dat oleoresin met 5% astaxanthine voor ca. €600 op de markt wordt verkocht en astaxanthine met €6.500-10.000.

In werkpakket 5 werd door de participerende ondernemers in een aantal sessies gediscussieerd over de opschaling van de bereikte resultaten naar een commercieel productiebedrijf. Na uitvoerige discussie vonden de in het project betrokken ondernemers het lastig is om een zekere businesscase te maken voor de productie van natuurlijke astaxanthine in Nederlandse kassen. Door een onzekere markt en onzekere prijzen voor het eindproduct, resterende onzekerheden in het productieproces en onbekendheid met een nieuwe markt werd besloten om de volgende stap naar opschaling nu niet te maken.

Samenvattend kan worden gesteld dat in het project kennis is vergaard rond om de productie van de hoogwaardige stof astaxanthine uit de alg *Haematococcus pluvialis* in Nederlandse tuinbouw kassen te realiseren. Er is een proof-of-principle van een productieketen van uitgangsmateriaal over productie tot product eindformulering volgens specificaties uit de markt aangetoond voor de productie van astaxanthine uit *Haematococcus pluvialis*. De proof-of-principle productieketen en de methode om deze te ontwikkelen kan worden gebruikt als blauwdruk voor de ontwikkeling van andere hoogwaardige stoffen uit andere algen.

1 Inleiding

1.1 Achtergrond

De productie van hoogwaardige stoffen uit algen en met name astaxanthine uit *Haematococcus pluvialis* biedt mogelijk perspectief voor Nederlandse tuinbouwondernemers, die op zoek zijn naar nieuwe verdienmodellen. Algen hebben net als in de traditionele tuinbouwteelten licht, water en nutriënten, CO₂ en een optimale temperatuur nodig om te kunnen groeien met een goede en reproduceerbare kwaliteit. Tuinbouwondernemers hebben veel ervaring om de teeltcondities van hun huidige gewassen optimaal te sturen, ze hebben ervaring met klimaatregeling, CO₂-dosering, water- en nutriënten voorziening en water behandelingssystemen. Ze hebben ervaring met de productie van voedingsmiddelen en om aan de daaraan gestelde kwaliteitseisen te voldoen en logistiek en afzet te organiseren. Het ligt voor de hand om deze ervaring te benutten voor de teelt van algen. In een kas is een duurzame en economisch rendabele algenproductie potentieel mogelijk. Ten opzichte van een buitenteelt heeft een kas een groot energievoordeel, omdat gratis zonlicht en daarmee energie vangt voor de productie, CO₂ is beschikbaar als afvalproduct van industriële productielocaties of energieproductie op eigen tuinbouwbedrijf, water en nutriënten worden op een tuinbouwbedrijf recyclet.

De kleurstof en antioxidant astaxanthine is een hoogwaardige stof waarvoor op de wereldmarkt veel vraag is als voedingssupplement. De alg *Haematococcus pluvialis* produceert deze stof. Omdat voor voedingssupplementen productkwaliteit erg belangrijk is zal deze productie vooral gezocht moeten worden in gesloten productiesystemen in bedrijven die gewend zijn om aan de kwaliteitseisen voor voedingsmiddelen te voldoen. Nederlandse glastuinbouwbedrijven hebben hiervoor een goede startpositie. Door de gecontroleerde omstandigheden in Nederlandse kassen kan astaxanthine naar verwachting jaarrond met een hoge hoeveelheid en met een hoge kwaliteit geproduceerd worden. Door de ervaring en standaardisatie in de tuinbouw kan naar verwachting reproduceerbaar geteeld worden volgens de specificaties van de markt. Hiermee wordt een concreet nieuw verdienmodel aangeboden aan Nederlandse tuinbouwondernemers.

Er liggen echter nog kennisvragen om de risico's verbonden aan de economisch rendabele productie van astaxanthine mogelijk te maken. De vragen liggen op het gebied van het uitgangsmateriaal, de productie en de uiteindelijke eindformulering voor de markt. Deze zullen binnen het hier voorliggende project worden beantwoord.

Binnen het project wordt een proof-of-principle van een keten van uitgangsmateriaal over productie tot product met toegevoegde waarde voor de markt en consument gerealiseerd. Door dit voorbeeld van een nieuw verdienmodel in de bio-economie wordt naar verwachting de marktpositie van Nederlandse tuinbouwondernemers verbeterd. De ontwikkelde methodiek is tevens bruikbaar voor de productie van andere inhoudstoffen uit algen in Nederlandse kassen.

1.2 Doelstelling project

Proof-of-principle van de productie van astaxanthine als oleoresin uit *Haematococcus pluvialis* stammen in Nederlandse kassen:

- Uitgangsmateriaal: stammenselectie van natuurlijke *Haematococcus* stammen zoals eerder uitgevoerd op lab niveau, nu onder geconditioneerde omstandigheden in 450 l reactoren op kasniveau.
- Uitgangsmateriaal: door klassieke stamverbetering verkregen beste stammen voor hoogste astaxanthine productie (groeisnelheid, productie, gehalte en opwerkbaarheid).
- Teelt en productie: verhogen slagingskans teelt (minder besmetting met ongewenste micro-organismen ("onkruid en plagen"), verkorting teeltduur, verhoging groeisnelheid in voorkweek, opkweek, en teelt groene fase, verhoging astaxanthine productie (groeisnelheid en percentage) in rode fase door methodische inzet van alle productiefactoren (licht, CO₂, pH, N en andere nutriënten, temperatuur en andere vormen van metabole stress), toepassing ontsmettingsprotocol.
- Analyse: gevalideerd analyseprotocol voor astaxanthine en gerelateerde carotenoïden en productkwaliteit gerelateerde analyses.
- Eindformulering: omzetting voorproducten astaxanthine in astaxanthine, stabilisatie en extractie voor oleoresin, proof-of-principle maken van een stabiele eindformulering voor astaxanthine.
- Hele waardeketen als proof-of-principle realiseren, hierdoor vermindering risico's vervolginvesteringen.

1.3 Verwachte project resultaten

De volgende resultaten worden verwacht:

- Een proof-of-principle van een waardeketen van uitgangsmateriaal over kasproductie tot eindformulering van een product volgens marktspecificaties waarbij alles stappen tot een zodanig niveau worden ontwikkeld dat de risico's voor vervolginvesteringen van tuinbouwondernemers verlaagd worden.
- De hoogst producerende *Haematococcus pluvialis* stam in het geoptimaliseerde productieproces die te vinden is in de diverse stammencollecties, of een zelf gescreende natuurijsolaat.
- Een 50% hoger-producerende stam die verkregen is door mutagenese en selectie, afgeleid van de hoogst producerende natuurlijke stam van een stammencollectie, die goed opwerkbaar is in een eindformulering.
- Teeltrecept en hygiëneprotocol om een stabiele teelt van *Haematococcus* stammen mogelijk te maken met een minimaal slagingspercentage van 90% en een teeltduur niet langer dan gemiddeld 50 dagen en een minimale productie astaxanthine van 30 g/m²/y.
- Analysesysteem plus protocol, waarmee alle intermediären van de astaxanthine biosyntheseroute kunnen worden geïdentificeerd, een in het projectteam nader te definiëren proof-of-principle eindformulering, dat aansluit op de markt.
- Het resultaat van dit project en de hier opgebouwde kennis kan door projectpartners gebruikt worden om vervolginvesteringen te plegen om de keten in de praktijk op te schalen na afloop van het project.
- Opzet van een gezamenlijke coöperatie voor de teelt, verwerking van algen en een gezamenlijke afzet van de producten van algen, zoals bijvoorbeeld duurzame astaxanthine, na afloop van dit project.
- Resultaat is tevens de blauwdruk voor de "moeilijk" te telen algen, dus andere algen met een potentiële afzet uit gesloten systemen uit Nederlandse kassen.

1.4 Maatschappelijke, economische en wetenschappelijke meerwaarde

Astaxanthine is een natuurlijk roodkleurig pigment met sterke antioxidant eigenschappen. De afgelopen jaren neemt de vraag naar en ook de productie van natuurlijk astaxanthine sterk toe. Deze vraag komt vanuit de markt voor voedingssupplementen. De natuurlijke vorm van dit pigment wordt gewonnen uit de algensoort *Haematococcus pluvialis*. Natuurlijk astaxanthine wordt op verschillende plekken wereldwijd geproduceerd, waarbij productievolume en vraag nog steeds stijgen: in de VS (bijv. Cyanotech op Hawaï), in Japan (bijv. BioReal in Zweden, eigendom van Fuji). Productiebedrijven breiden uit op basis van de steeds stijgende marktvraag (bijv. Algatech in Israël), nieuwe productiebedrijven worden opgezet (bijv. BGG in China), Algalif (IJsland), Biolife (Oostenrijk). In Europa is astaxanthine door de EFSA erkend als safe novel food ingrediënt. Het wordt nu toegepast in pillen en poeders om in te nemen als voedingssupplement. Een toekomstige markt zou ook kunnen liggen in de directe toepassing ervan in gezonde voedselproducten en kleurrijke maaltijden. Hiermee wordt dan een directe bijdrage geleverd aan gezondheid bevorderende voeding.

Astaxanthine kan duurzaam worden geproduceerd in Nederlandse kassen. De kas is een uitstekende zonnecollector die gratis zonlicht opvangt voor de productie van planten en algen. Tijdens de productie wordt net als bij andere gewassen gebruik gemaakt van afval CO₂ uit industriële bronnen. Hierbij wordt kennis gebruikt uit de PPS Energie en CO₂. De waterkringloop kan eenvoudig worden gesloten, emissies worden beperkt door reinigen van afvalwater volgens kennis die gegenereerd is in de PPS Glastuinbouw Waterproof.

Astaxanthine is een hoogwaardige stof, de productieketen hiervan zal als concrete business case van een nieuw verdienmodel voor de tuinbouw worden uitgewerkt. Op één vierkante meter kas kan ca. 1 kg droge stof *Haematococcus pluvialis* per jaar in Nederland worden geproduceerd. Met een gemiddeld astaxanthine gehalte van 3% komt dit neer op een astaxanthine productie van ca. 30 g per vierkante meter per jaar. De productiewaarde ligt bij ca. €5000-10000 per kg astaxanthine of ca. €600 per kg oleoresin met een 5% astaxanthine gehalte. Bij grote toename van productiecapaciteit op de wereldmarkt zal de waarde dalen, bij grote vraag op markt zal hij toenemen. Voorlopige kostprijsberekeningen geven aan dat de kostprijs vooral afhankelijk is van de slagingskans van de teelt, teeltduur, de astaxanthine gehalte en dus de uiteindelijk te realiseren totale astaxanthine productie. Een economisch model laat zien dat bij opschaling van de productie een kostprijs ca. € 150 per kg oleoresin kan liggen. Op 1 ha kas kan in Nederland ca. 300 kg astaxanthine of ca. 7500 kg oleoresin met 5% astaxanthine worden geproduceerd. Door goede beheersing van alle productiefactoren ligt er een unieke kans voor Nederlandse tuinbouwondernemers om astaxanthine in kassen als nieuw verdienmodel te realiseren.

Fundamentele kennis gepubliceerd in wetenschappelijke literatuur op het gebied van astaxanthineproductie wordt binnen dit project met behulp van industrieel onderzoek toegepast. De daadwerkelijke realisatie van een proof-of-principle keten van uitgangsmateriaal over productie tot eindformulering wordt binnen dit project aangetoond met focus op astaxanthineproductie in Nederlandse kassen. Er wordt een methodiek ontwikkeld van alle stappen in de keten van productie van hoogwaardige stoffen uit algen in Nederlandse kassen: uitgangsmateriaal, productie, eindformulering volgens marktspecificatie. In de toekomst zal deze methodiek ook toepasbaar zijn voor andere hoogwaardige stoffen uit algen (bijv. antibiotica, vetzuren etc.). Met behulp van dit project wordt dus een 'blauwdruk' ontwikkeld voor een 'teeltmethodiek' en 'productieketen' van uitgangsmateriaal tot eindformulering welke in de toekomst ook bruikbaar is voor de ontwikkeling en exploitatie van andere inhoudsstoffen uit algen in Nederlandse kassen. Dit met name voor algen, die 'moeilijk' te telen zijn, door bijvoorbeeld een trage groei, zodat ze snel worden overwoekerd door andere algen. In de toekomst zullen de hoogwaardige inhoudsstoffen vooral komen uit lastig te telen algen. De blauwdruk is met name voor deze 'moeilijk' te telen algen die uiteindelijk hogere financiële opbrengsten zullen betekenen t.o.v. makkelijk te telen algen (bulk algen zoals bijv. *Chlorella*). Dit type algen is zeer geschikt voor gesloten teelten in de Nederlandse glastuinbouw.

1.5 State of the art

Dit project bouwt voort op het project Duurzame astaxanthine productie uit algen in de tuinbouw (EFRO/clusterregeling Zuid-Holland, EZ/BO). Eerdere resultaten in het genoemde project waren de opbouw van basiskennis om economische rendabele en reproduceerbare productie van astaxanthine in Zuid-Hollandse kassen mogelijk te maken. Helaas kwamen tijdens de looptijd van het project een aantal knelpunten naar voren waardoor de teelt in de toekomst weliswaar potentieel economisch rendabel kan zijn, maar er meer onderzoek vereist is om risico's voor tuinbouwondernemers verder naar beneden te brengen en dichterbij een daadwerkelijk economisch rendabele businesscase te brengen.

Zo werd er tijdens het eerdere project gewerkt aan de selectie van natuurlijke *Haematococcus* stammen met snelle groei en hoge productie van astaxanthine en kennis over kweekomstandigheden voor optimale productie van astaxanthine op labschaal. Tot nu toe konden echter de uit de screening komende veelbelovende stammen nog niet worden opgeschaald naar grotere systemen. Dit werd alleen met zeer beperkt aantal stammen gedaan, waarbij bleek dat tijdens de opschaling een aantal andere criteria belangrijk waren dan tijdens de selectie op labschaal. Inmiddels zijn er geschikte screening methodes ontwikkeld maar nog niet doorgevoerd. Meer industrieel onderzoek is hier vereist. Daarnaast is er nog niet gewerkt aan stamverbetering van de veelbelovende stammen waardoor de productie (groeisnelheid en astaxanthine gehalte) naar verwachting kan worden verbeterd en waardoor een economisch rendabele business case dichterbij komt. Stamverbetering moet een belangrijk element van het hier voorliggende project worden.

Andere werkzaamheden in het eerdere project waren gericht op de productie van *Haematococcus* algen in kassen. Een van de resultaten was het beschikbaar hebben van een goed teeltsysteem voor de duurzame productie van algen in kassen in de vorm van een proof-of-principle teeltsysteem in een kasafdeling in Bleiswijk. Een ander resultaat was de optimalisatie van het CO₂ gebruik door algen door productie op afval CO₂ uit industrie en optimale benutting van het CO₂ door algen tijdens de teelt.

Tijdens het werk aan teeltrecepten voor de geselecteerde algen om een met efficiënte productie van astaxanthine met constant hoge en reproduceerbare kwaliteit volgens door de afnemer opgegeven specificaties te realiseren, bleek dat teelten vaak mislukten door besmetting met ongewenst micro-organismen ('onkruid en plagen') en hierdoor de slagingskans van een teelt te laag was. In de laatste maanden van het project werd deze slagingskans door een de ontwikkelde methodieken (teelt en ontsmetting) verhoogd van 10% naar 70%. Voor een economisch rendabele businesscase is een verdere verhoging van de slagingskans nodig. Daarnaast moet de teeltduur (juiste algendichtheid/groeisnelheid in relatie toe alle groeifactoren) worden verkort. Deze is nu té variabel met een teeltduur tussen de 28 en 100 dagen. Deze moet constant onder de 50 dagen liggen. Door problemen met besmetting konden nog niet alle groeifactoren tijdens alle teeltseizoenen zorgvuldig worden onderzocht. In het hier voorliggende project zal extra aandacht worden besteed aan de productiemethodiek van algen in kassen. Deze moet worden ontwikkeld op een niveau van proof-of-principle, zodat de methodiek ook voor andere algensoorten met andere hoogwaardige stoffen kan worden gebruikt in de toekomst. Voor de hier voorliggende case van astaxanthine zullen hoofdlijnen voor een teeltrecept worden ontwikkeld, zodat het bedrijfsleven consortium in de toekomst zelf verder kan gaan met experimentele ontwikkeling buiten dit project. Ook opschaling bij telers in kassen valt niet onder dit project.

In het eerdere project werd basiskennis ontwikkeld over oogst, stabilisatie en bewaring van algen. Ook een analysemethodiek werd ontwikkeld. In het hier voorliggende project moet worden gewerkt aan een constante eindformulering volgens specificaties uit de markt. Uit de proefproductie in de algensystemen in Bleiswijk zal een eindformulering worden gemaakt om ook hier het proof-of-principle aan te tonen en te komen tot een traceerbaar en safe eindproduct. Er zal geen eindproduct daadwerkelijk worden gemaakt en verkocht in het kader van het hier voorliggende project.

2 Werkpakketten

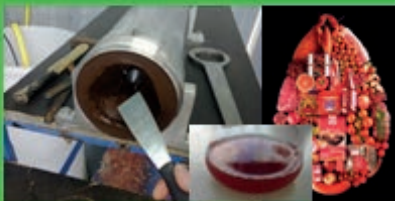

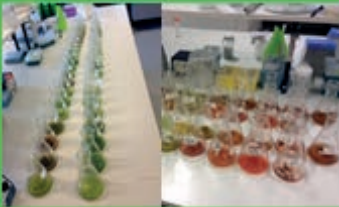
PPS T&U Astaxanthine 2.0

WP 4 Markt en Economie:
Markt monitoren, kostprijs blijven analyseren

WP 1: Uitgangsmateriaal
selectie Haematococcus stammen onder kascondities, klassiek stamverbetering voor teelt in NL kassen

WP 2: Teelt en productie
voorfase, groene en rode fase in NL kassen met doel min. 90% succesvolle teelten, teeltduur van max. 50 dagen en maximale astaxanthine productie (proof-of-principle)

WP 3: Eindformulering
oogsten, bewaren en maken van constante eindformulering (proof-of-principle)



WAGeningen UR
For quality of life

3 Uitgangsmateriaal (WP1)

3.1 Werkzaamheden

3.1.1 Screening van natuurlijke *Haematococcus pluvialis*

In het eerdere project "Duurzame astaxanthine productie uit algen in de tuinbouw" (de Boer *et al.* 2015) heeft een uitgebreide screening plaatsgevonden van natuurlijke stammen van *Haematococcus pluvialis* die verkrijgbaar zijn in de openbare stammencollecties. In totaal werden 27 stammen getest op groeisnelheid en de hoeveelheid gevormde astaxanthine (tezamen een maat voor de productiviteit) en met elkaar vergeleken. Ondanks dat er stammen werden gevonden die in staat waren tot een hogere astaxanthine productiesnelheid, bleek stam 840 de beste te zijn, en dat is dus eigenlijk de uitgangsstam voor het hier voorliggende project. Stam 840 is getest in een van binnenuit belichte Biostream 12 liter fermenter, in een vergelijkbaar groeimedium als wordt toegepast in de grote reactoren in Bleiswijk.

3.1.2 Klassieke stamverbetering *Haematococcus pluvialis*

In een volgende stap werden verschillende isolaten van de natuurlijke *Haematococcus pluvialis* stam 840 gescreend en geselecteerd op hun astaxanthine productie. De eigenschappen van het hoogst producerende natuurlijke isolaat van *Haematococcus pluvialis* kan verder worden verbeterd middels klassieke stamverbetering. Het huidige geoptimaliseerde proces voor algenproductie en opwerking van het astaxanthine product laat ruimte voor productie- en stamverbetering. Een productierun duurt 4 weken, en het aldus verkregen product is alleen met grof mechanisch geweld op te werken. Klassieke stamverbetering (mutagenese en selectie) is geschikt om zowel de fysiologische als morfologische eigenschappen van de algen te verbeteren. Hiervoor moet een geschikt selectieregime voor worden ontwikkeld. Daarnaast moet worden vastgesteld welke algeneigenschappen moeten worden verbeterd. Gezien het huidige productieproces en de huidige stam zijn er de volgende mogelijkheden voor klassieke stamverbetering van *Haematococcus pluvialis* stam 840:

- Versnellen van de astaxanthine synthese snelheid in de stress-fase, resulterend in een hoger astaxanthine gehalte en/of kortere algen productietijd.
- Selectie van stammen met een lager niveau van carotenoïden bijproducten en daardoor een hoger astaxanthine gehalte (wegnemen van biosynthetische bottle necks). De huidige kleur van het eindproduct geeft een duidelijke aanwijzing m.b.t. de aanwezigheid van andere carotenoïden.
- Isolatie van stammen die beter opwerkbaar zijn. Bij beëindiging van de productie hebben de cellen sterke dikke celwanden die alleen met speciale maatregelen open te breken zijn. Isolatie van stammen met een dunnere celwand zijn makkelijker en goedkoper op te werken al is het alleen doordat de mechanische bewerking verkort of achterwege gelaten kan worden.
- Selectie van stammen met verhoogde productiviteit en opwerkbaarheid.

De uitdaging van de klassieke stamverbetering ligt in de ontwikkeling van geschikte selectietechnieken waarmee voldoende grote aantallen stammen kunnen worden gescreend en welke voorspellend zijn voor de productie in de fotobioreactoren in de kas. De selectie gebeurt in het algemeen in verschillende stappen op agar platen, microtiter platen, schudkolven en in een algencultivatiesysteem.

Een dergelijke klassieke stamverbetering is eerder met succes uitgevoerd op de gist *Phaffia rhodozyma*, waarbij het astaxanthine gehalte bij gelijkblijvende groeisnelheid met een factor 30 werd verhoogd (0,5% op basis van droge stof). Hoe hoger het astaxanthine gehalte van deze stammen werd, hoe moeilijker het werd om nog verbeterde stammen te isoleren, en dit werd opgelost door automatisering van de screening waarbij miljoenen stammen werden gescreend door tientallen medewerkers. Op deze wijze werd de voortgang van de stamverbetering gegarandeerd. De biochemische achtergrond van de stamverbetering is dat *bottlenecks* in de biosynthese van het gewenste metaboliet worden weggenomen, waardoor de biosynthesesnelheid of het eindniveau van het gewenste product wordt verhoogd. Uiteraard ontstaat er dan elders in de biosyntheseroute weer een nieuwe bottleneck. Zo'n bottle neck kan de synthesesnelheid zijn van enzymen die van belang zijn voor de flux metabolieten, feedback-controls van enzymen die door mutaties kan worden weggenomen, specifieke activiteit van biosynthetische enzymen of inbouwsnelheid van astaxanthine in membranen. Zo kunnen er aanzienlijke productieverhogingen worden gerealiseerd door opeenvolgende mutaties aan te brengen in de DNA. *Haematococcus pluvialis* bezit al van nature een aanzienlijk astaxanthine gehalte, tot 2,5 – 5%. De praktijk heeft geleerd dat hoe hoger het eindgehalte van een product is, hoe moeilijker het wordt om verbeterde stammen te isoleren en de verbeteringen zullen relatief klein zijn t.o.v. het eindgehalte. Daarom moet het onderscheidend vermogen tussen stammen hoog worden gemaakt. Er moet dus een selectiemethode worden gekozen waarbij relatief kleine verschillen goed zichtbaar zijn. Naarmate kolonies van *Haematococcus pluvialis* meer astaxanthine vormen worden deze steeds donkerder rood, waardoor het onderscheidend vermogen tussen de kolonies beperkt is, omdat er visuele verzadiging optreedt. Om het onderscheidend vermogen te verhogen, kan er gebruik gemaakt worden van effectoren die de biosynthesesnelheid van astaxanthine negatief beïnvloeden. Voorbeelden hiervan zijn diphenylamine, dimethylphtalaat en nicotine. De *Haematococcus* kolonies blijven daardoor lichter van kleur, waardoor kleine verschillen in kleur tussen de kolonies beter zichtbaar worden, waardoor een visuele selectie van verbeterde stammen mogelijk wordt.

Verder is het van belang een goede mutageneseprocedure te ontwikkelen. De effectiviteit hiervan wordt bepaald door de overlevingskans van de cellen (survival rate) te bepalen: deze moet tussen de 0,5 – 10% liggen. Het principe is erop gebaseerd dat een cel niet kan overleven als er te veel DNA door de mutagenese is beschadigd. Een te hoge survival rate betekent dat de mutagene stof te weinig effect had. De kans is dan kleiner dat er een mutatie in een bottleneck heeft plaatsgevonden.

Het aantal kolonies die gescreend moeten worden voor een redelijke kans om een verbeterde stam te vinden, is in de praktijk alleen empirisch te bepalen gedurende het stamverbeteringstraject zelf. Verloopt de stamverbetering niet voorspoedig, dan wordt er meer mankracht ingezet: in het *Phaffia*-project is met twee personen begonnen en eindigde met 20: er waren steeds meer mensen nodig om de voortgang erin te houden. Aangezien de wildtype *Haematococcus* bij het begin al een hoog eindniveau astaxanthine produceert, is het bij begin van het stamverbeteringsproces onbekend wat de omvang van het stamverbeteringstraject zou moeten zijn om een significante voortgang te boeken. Het is echter waarschijnlijk dat een grote inspanning nodig is om tot de selectie van verbeterde stammen te komen.

3.2 Materiaal en methodes

3.2.1 Natuurlijke stammen *Haematococcus pluvialis*

Als aanvulling op de screening van natuurlijke stammen uit het eerdere project "Duurzame astaxanthine productie uit algen in de tuinbouw" (De Boer *et al.* 2015) is er nog 1 screeningsexperiment uitgevoerd. In dit experiment zijn de volgende stammen in viervoud gescreend in een kweekkast van Groen Agro Control: 5, 12, 14, 55, 72, 84, 125, 129, 358, 840 en 883. De cultivatie van de voorkweken is gestandaardiseerd in de kweekkast. De verschillende schudkolven van iedere stam zijn op gerandomiseerde wijze in de kweekkast geplaatst. De experimenten duurden 5 weken om niet alleen de groei maar ook de astaxanthine productie te volgen. De omstandigheden zijn gebaseerd op de omstandigheden waarbij stam 840 groeit in de reactor in de kas in Bleiswijk. De eerste 2 weken groei vonden plaats onder de volgende omstandigheden:

- 750 mg/l NO_3 startconcentratie
- 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (dag) – 0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (nacht) (bij benadering, verschillende plaatsen in de kweekkast hebben verschillende lichtintensiteiten)
- dag:nacht ritme à 16:8 uur
- 23°C
- Niet schudden
- 7 l/min lucht in totaal over alle schudkolven
- 2,5% CO_2

Daarna 3 weken astaxanthine productie onder de volgende omstandigheden:

- 0 mg/l NO_3 startconcentratie
- 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (bij benadering, verschillende plaatsen in de kweekkast hebben verschillende lichtintensiteiten)
- continue licht
- 23°C
- Niet schudden
- 7 l/min lucht in totaal over alle schudkolven
- 2,5% CO_2

3.2.2 Klassieke stamverbetering *Haematococcus pluvialis*

3.2.2.1 Rein kweken van de stammen

Voor het natuurlijke stammenscreenings onderzoek was het van belang dat er geen andere algen of protozoa aanwezig waren, terwijl een aanwezige bacterie of schimmel in verreweg de meest gevallen weinig schade kon aanbrengen. Bovendien was ook een groot deel van de isolaten die worden aangeleverd door de cultuurbank besmet met meerdere schimmels en bacteriën. Voor de klassieke stamverbetering zijn algen gekweekt op agarose platen met basal bold medium (BB platen). Aangezien de meeste bacteriën in staat zijn om op agarose te groeien als koolstof- en energiebron, was een axenische algencultuur een vereiste alvorens de klassieke stamverbetering werd gestart.

Om de kweek axenisch te verkrijgen zijn verschillende methodes getest. Een effectieve methode bleek de volgende te zijn: herhaaldelijk uitstrijken op agarose platen, kolonie uitpikken, resuspenderen in groeimeidium en vervolgens weer uitstrijken op agarose platen. Om te controleren of de kweek ook daadwerkelijk axenisch was, werden er gedurende het gehele onderzoek controles uitgevoerd op speciale bacteriën en schimmel agar platen.

3.2.2.2 Mutagenese

Nadat er een axenische kweek was bereid, kon een mutagenese worden uitgevoerd. Het was van belang dat cellen in de kweek voor een groot gedeelte in de flagella staat waren. De methode voor mutagenese is gebaseerd op de methode in de publicatie van Gomez *et al.* (2007). Echter, op deze methode zijn talloze aanpassingen gedaan voor een optimaal resultaat.

Het mutagen dat wordt gebruikt in het onderzoek is ethylmethanosulfaat (EMS). Er wordt gemutageniseerd door verschillende EMS concentraties toe te voegen aan de kweek, namelijk 1%, 1,2%, 1,4%, 1,6% en 1,8%. Als controle werd een sample meegenomen zonder EMS behandeling. De zes behandelingen werden vervolgens 2 uur geïncubeerd en elke 30 minuten met de vortex gehomogeniseerd. Hierna zijn de buizen twee keer gecentrifugeerd en gewassen met een steriele 2,5% natriumthiosulfaat oplossing. Natriumthiosulfaat neutraliseert de werking van EMS. Uiteindelijk zijn de cellen geresuspendeerd in standaard medium. De buizen zijn 24 uur geïncubeerd onder natuurlijk licht in het raamkozijn in het laboratorium van Groen Agro Control. De volgende dag is van elke behandeling een deel uitgeplaat op drie Basal Bold agarose platen om vervolgens na een week de survival rate te kunnen bepalen. De survival rate is bepaald door de kolonies te tellen en te vergelijken met de controle. Wanneer de survival rate tussen de 0,5-15% lag, werd de mutagenese als succesvol beschouwd.

3.2.2.3 Primaire selectie

De behandelingen met een geslaagde mutagenese zijn vervolgens op agarose platen met de kleur-inhibitor nicotine uitgeplaat. Ter vergelijking werd de controle behandeling uitgeplaat op platen met inhibitor en zonder inhibitor. De platen werden gewikkeld in een dubbele laag parafilm en geïncubeerd op een tafel in een kas van Groen Agro Control. De dag temperatuur in de kas lag ongeveer tussen de 20 en 30°C, de nacht temperatuur was ongeveer 20°C. De LED lampen (Hortilux Schreder, HSE Hortiled Red/Blue 150) boven de platen werden ingeschakeld van 04:00 tot 9:30 om de dag te verlengen. Het schermdoek in de kas lag gedurende het hele onderzoek dicht. Op verschillende momenten tijdens dit onderzoek is de lichtintensiteit gemeten in de kas. Gedurende de dag en gedurende het jaar varieerde de lichtintensiteit sterk. In de wintermaanden lagen de metingen tussen 10 en 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. In het voorjaar lagen de metingen tussen 50 en 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Wanneer de platen met mutanten lang genoeg geïncubeerd hadden om kolonies goed te kunnen waarnemen, werd onderzocht of er potentiële mutanten bij waren. Na vier weken en na vijf weken zijn de platen bekeken en zijn kolonies geselecteerd met het blote oog. Er is geselecteerd op kolonies die bovengemiddeld rood zijn vergeleken met andere kolonies.

3.2.2.4 Secundaire selectie

Nadat de mutanten in de primaire selectie geselecteerd zijn, zijn ze geënt in 20 ml basal bold medium en opgekweekt. Nadat deze voldoende celdichtheid hadden bereikt, dit duurde ongeveer vier weken, is de OD_{750} gemeten, zodat de juiste verdunning kon worden berekend om zo evenveel celmateriaal van elke mutant te kunnen overzetten. De start OD_{750} van het schudkolvenexperiment is 0,01. De mutanten zijn overgezet in schudkolven met 100 ml basal bold medium en in de kweekkast van Groen Agro Control gezet.

M1	M1	M5	M5
M2	M2	Wildtype	Wildtype
M3	M3	M6	M6
Wildtype	Wildtype	M7	M7
M4	M4	M8	M8
± 70	± 40	± 40	± 70

$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

Figuur 1 Overzicht van de schudkolven in de kweekkast. Iedere cel representeert één schudkolf. De gele lijnen geven de belichting weer. De schudkolven naast het licht ontvingen ongeveer 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. De schudkolven in de middelste kolommen ontvingen ongeveer 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Mutanten (M) 1 t/m 8 zijn verspreid over de kweekkast in tweevoud, bovendien zijn er nog wildtypes (meestal in viervoud) meegenomen.

In de kweekkast stonden de schudkolven in rijen van 5 bij 4, waarbij aan 2 kanten licht werd geschenen op de schudkolven (Figuur 1). Dit betekent dat elke mutant in tweevoud is ingezet. Ook is telkens de wildtype van stam 840 minimaal in viervoud meegenomen. Eén schudkolf van iedere stam/wildtype is direct naast het licht gezet en de andere in het midden. Op deze wijze wordt iedere stam 2 keer gescreend en wordt de betrouwbaarheid van de screening hoger.

In de kweekkast werd de lucht- en CO₂ toevoer, de temperatuur en de lichtintensiteit gereguleerd. De luchttoevoer was 200 ml/min. De concentratie CO₂ in de lucht was tijdens de licht uren 2%, in de donkeruren was de CO₂ afgesloten. Tijdens schudkolvenexperiment 1 t/m 3 was de temperatuur in de kweekkast 20°C en was het 16 uur licht en 8 uur donker per dag. Om de groei van de algen te versnellen is dit voor schudkolvenexperiment 4 t/m 6 aangepast naar 22°C en 20 uur licht en 4 uur donker per dag. De pH en de OD₇₅₀ zijn wekelijks gemeten.

3.2.2.5 Astaxanthine analyse

Nadat de schudkolven van de schudkolvenexperimenten de maximale roodheid hebben behaald, is het percentage astaxanthine en de biomassa concentratie geanalyseerd. Dit is uitgevoerd volgens het standaard protocol van Groen Agro Control.

3.3 Resultaten

3.3.1 Natuurlijke stammen *Haematococcus pluvialis*

De resultaten van de natuurlijke stammen screening zijn weergegeven in Tabel 1. Het valt op dat er grote verschillen in astaxanthine gehalte en productie zijn tussen de verschillende stammen. Wat betreft de hoeveelheid biomassa en de totale hoeveelheid astaxanthine scoort stam 840 het hoogst, wat betreft het astaxanthine gehalte scoort 883 het hoogst.

Tabel 1

Overzicht belangrijkste resultaten stammenscreeningsexperiment. De weergegeven data is een momentopname op $t=5$ weken.

Stam	DW (g/l)	Astaxanthine (% of DW)	Totaal Astaxanthine (mg/l)
5	4,9±1,7	3,6±0,6	176,4±34,6
12	3,3±0,2	3,0±0,4	97,5±29,8
14	4,3±1,1	3,2±0,3	137,6±8,5
55	4,75±0,6	1,8±0,8	85,5±64,9
72	4,25±0,2	1,8±0,1	77±7,9
84	5,3±2,2	3,3±1,1	174,9±74,4
125	6,9±1,1	2,6±0,2	179,4±71,2
129	4,6±1,3	2,5±0,2	115±36,4
358	7,8±0,9	2,9±0,7	226,2±55
840	9±1,3	2,8±0,6	252±53
883	5,3±0,4	4,1±0,3	217,3±20

Voor de klassieke stamverbetering in de volgende paragraaf is gekozen voor stam 840, enerzijds vanwege de bovengemiddelde resultaten op het gebied van groeisnelheid en astaxanthine productiviteit, anderzijds vanwege het succes met de teelt in de grote algenreactoren in de kas van WUR in Bleiswijk.

3.3.2 Klassieke stamverbetering *Haematococcus pluvialis*

3.3.2.1 Mutagenese

Nadat er een axenische cultuur is bereid, zijn er een aantal mutageneses uitgevoerd. Omdat er iedere keer veel variatie zit in de effectiviteit van de mutagenese is ervoor gekozen om standaard een range aan EMS concentraties mee te nemen en vervolgens de meest succesvolle behandeling, d.w.z. de optimale survival rate, verder te gebruiken. Het viel op dat dit iedere mutagenese een andere concentratie was. Toen het optimalisatie- en ontwikkelingswerk gedaan was zijn er in totaal 12 mutageneses uitgevoerd.

3.3.2.2 Primaire selectie

Na de mutagenese van de *Haematococcus* cellen werden deze op plaat uitgestreken en geïncubeerd in de kas (Figuur 2). In de beginfase zijn een aantal problemen opgelost zoals uitdroging van het medium, veel variatie tussen de platen, overmatige condensvorming en het uitblijven van de rode fase. Toen dit onder controle was zijn er gedurende het gehele onderzoek 12 mutageneses uitgevoerd, welke resulteerden in ongeveer 2.400 (12*200) platen met ongeveer 100 *Haematococcus* kolonies per plaat. Dat maakt het aantal gescreende kolonies op ongeveer 240.000.

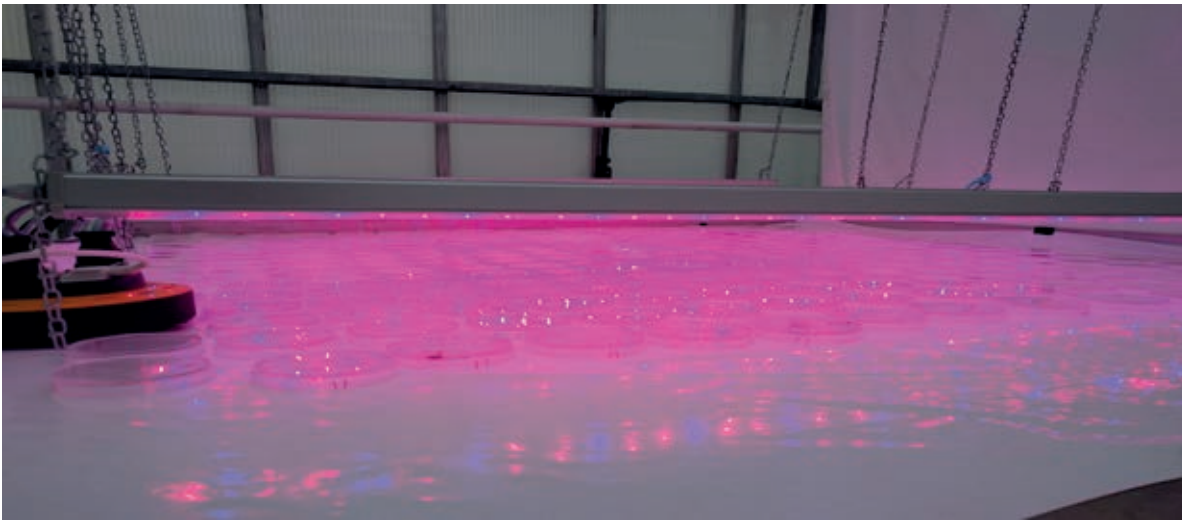
Van de gekweekte kolonies zijn vervolgens de uitschieters op het gebied van roodheid geselecteerd en vervolgens op steriele wijze overgebracht in vloeibaar medium. Het viel op dat de kolonies onder invloed van nicotine, zoals verwacht, oranje kleurden in plaats van rood. Zodoende was het eenvoudiger om de roodste kolonie te selecteren (Figuur 3). Het selecteren van de roodste kolonies gebeurde met het blote oog maar ook met de microscoop. In totaal zijn er gedurende het onderzoek zo'n 100 potentiële mutanten geselecteerd. Per mutagenese waren er duidelijke verschillen in de mate van variatie tussen de kolonies. Zodoende verschilde het aantal potentiële mutanten sterk per mutagenese.



Figuur 2 Foto van een agarose plaat met *Haematococcus* kolonies. In het midden is een bovengemiddeld rode kolonie gemarkeerd.



Figuur 3 Schudkolven experiment 2 (na 3 dagen). Er staan 4 rijen van 5 schudkolven. Luchttoevoer wordt geregeld door een flowmeter waarbij de lucht eerst door een 0,2 µm filter wordt gesteriliseerd.



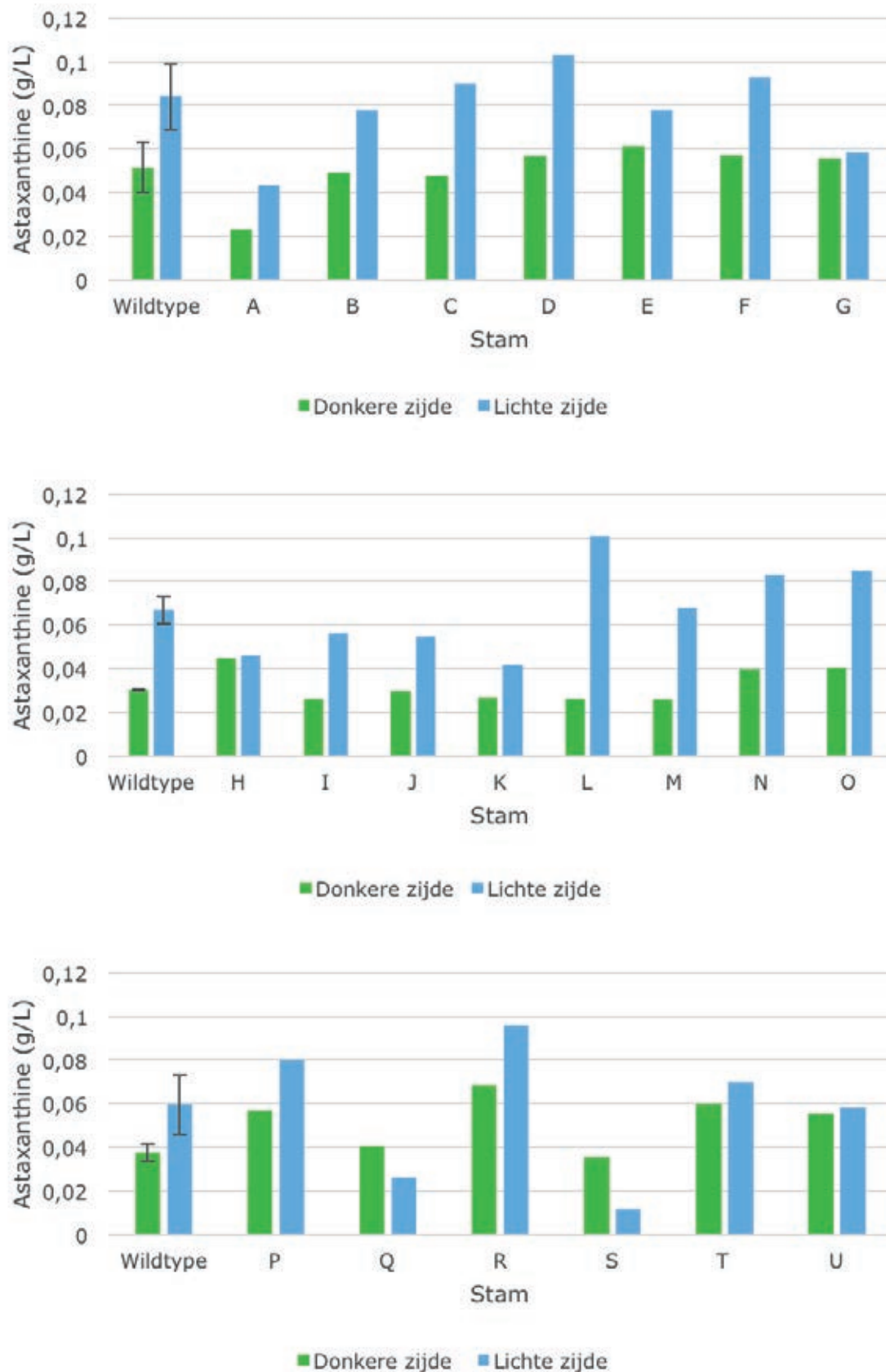
Figuur 4 Foto van de kas waar de agarose platen zijn opgekweekt. De dag wordt verlengd met LED lampen tot ongeveer 16 uur licht per etmaal.

3.3.2.3 Secundaire selectie

Van de ruim 100 potentiële mutanten die zijn geselecteerd vanaf de agarose platen zijn er uiteindelijk 42 mutanten gescreend in 6 schudkolven experimenten. De keuze is gebaseerd om zowel de roodheid van de kolonie op de agarose platen als de snelheid van groei in de voorkweek van de secundaire selectie. De data van 3 experimenten worden hier weergegeven. De duur van de experimenten was 6 weken.

Na 6 weken is de astaxanthine concentratie geanalyseerd. Dit is het percentage astaxanthine van het drooggewicht vermenigvuldigd met de hoeveelheid drooggewicht. Deze waarde houdt zowel rekening met de biomassa concentratie als met het astaxanthine gehalte en geeft hierdoor het meest complete beeld van hoe de stam presteert.

In Figuur 5 is de astaxanthine concentratie weergegeven van 21 mutanten in vergelijking met het wildtype. Zoals verwacht is bij bijna alle stammen de astaxanthine concentratie hoger bij de lichte zijde dan bij de donkere zijde. Het valt direct op dat er geen hoge uitschieters zijn, zeker niet als er rekening wordt gehouden met de standaarddeviatie van het wildtype. Mutanten D, L en R scoorden het hoogst in de 3 experimenten en hebben hogere waarden dan het wildtype. Zodoende zijn deze stammen interessant voor vervolgonderzoek. Maar als er rekening wordt gehouden met de standaarddeviatie bij mutant D kan er nauwelijks gesproken worden over een significante toename ten opzichte van het wildtype. Bij mutant L scoorde alleen de schudkolf aan de licht zijde hoger dan het wildtype, de schudkolf aan de donkere zijde niet. Bij mutant R was er wel een aanzienlijke toename zichtbaar bij zowel de lichte als de donkere kant.



Figuur 5 Astaxanthine productie in schudkolvenexperimenten 3, 4 en 6 (overige experimenten niet weergegeven), gemeten op $t = 6$ weken. De wildtype stammen van experiment 4 en 6 zijn in duplo (2 schudkolven aan de lichte zijde en 2 schudkolven aan de donkere zijde) ingezet. De wildtype stammen van experiment 3 zijn in triplo (3 schudkolven aan de lichte zijde en 3 schudkolven aan de donkere zijde) ingezet. Over deze waarde is de standaarddeviatie weergegeven. De mutanten zijn genummerd met de letters A t/m U.

Alhoewel de astaxanthine concentratie leidend zou moeten zijn in de besluitvorming welke stam de meeste potentie geeft, is het astaxanthine percentage ook een interessante meetwaarde om te bespreken. In Tabel 2 zijn de astaxanthine percentages weergegeven van de hoogst scorende mutanten uit onderzoek 3, 4 en 6, alleen van de schudkolven aan de lichte zijde. Hier valt op dat mutant D en R aanzienlijk hoger scoren dan het wildtype. Andere mutanten scoorden lager of ongeveer even hoog als de mutanten in Tabel 2. Een belangrijke opmerking is dat het doel van de schudkolvenexperimenten niet was om de hoogst mogelijke astaxanthine percentages te halen, maar om een stam te ontdekken met een hogere astaxanthine productiviteit dan het wildtype.

Tabel 2

Astaxanthine percentage van de best producerende stammen uit schudkolvenonderzoek 3, 4 en 6 in vergelijking met het wildtype. Geanalyseerd op t=6 weken. Alleen de schudkolven aan de lichte zijde van de kweekkast.

	Stam	Astaxanthine (% of DG)	Stam	Astaxanthine (% of DG)
Onderzoek 3	<i>Wildtype</i>	1,9±0,22	<i>D</i>	2,7
Onderzoek 4	<i>Wildtype</i>	2,1±0,06	<i>I</i>	2,2
Onderzoek 6	<i>Wildtype</i>	2,2±0,16	<i>R</i>	3,1

3.4 Conclusie en discussie uitgangsmateriaal

Gedurende de natuurlijke stammen screeningsronde zijn de vier schudkolven met daarin dezelfde stam op willekeurige plekken in de kweekkast gezet. Dit betekent dat de schudkolven verschillende lichtintensiteiten ontvingen. Dit heeft geresulteerd in een relatief grote variatie in resultaten, te zien aan de standaarddeviaties. Zoals eerder aangegeven is dit experiment slechts een aanvulling op de natuurlijke stammen screening in het eerdere project "Duurzame astaxanthine productie uit algen in de tuinbouw" (De Boer *et al.* 2015). Op basis van de hier behaalde resultaten verandert de conclusie uit dit eerste rapport niet.

Klassieke stamverbetering is een probabilistisch proces waarbij het moeilijk is om te voorspellen wanneer een succesvolle mutant ontstaat. Maar een misschien nog wel grotere uitdaging ligt in het selecteren van de juiste kandidaten in de screeningsronden. Vanwege onvermijdelijke, kleine afwijkingen in de experimentele opstelling en in de analyses zullen er altijd willekeurige fouten zitten in de data. Deze fouten zullen een rol spelen bij het selecteren van de potentiële mutanten.

Door het grote aantal potentiële mutanten was het te arbeidsintensief om een veelvoud aan schudkolven van dezelfde mutanten te screenen. Daarnaast was de configuratie van de kweekkast een gegeven en daardoor was het onmogelijk om een groot aantal schudkolven in dezelfde lichtintensiteit te plaatsen. Zodoende is voor een andere methode gekozen bij de klassieke stamverbetering.

Bovenstaande methode maakt het echter moeilijk om uitgebreide statistische analyses uit te voeren en statistisch gefundeerde conclusies te trekken. Er kan wel geconcludeerd worden dat stam D en I potentie hebben en dat stam R met grote waarschijnlijkheid een hogere astaxanthine productiviteit heeft dan het wildtype. Uit de resultaten blijkt dat stam R aan de donkere kant een 60% hogere astaxanthine concentratie dan het wildtype had en aan de lichtere kant een 83% hogere astaxanthine concentratie.

Tot slot, is het van belang te vermelden dat een schudkolf als kweekstelsel lastig te vergelijken is met een grootschalige fotobioreactor in een kas in de praktijk. Resultaten behaald in dit onderzoek zijn daarom niet direct te kopiëren naar een grootschalige buizenreactor.

4 Teelt en productie (WP2)

4.1 Werkzaamheden

In dit werkpakket is het in het eerdere project “Duurzame astaxanthine uit algen in Nederlandse kassen” ontwikkelde basis teeltrecept doorontwikkeld. Het hoofddoel was de productierisico's te verlagen, om zo een stabiele teelt mogelijk te maken. De teelt van de alg *Haematococcus pluvialis* bestaat uit de onderdelen voorweek, opweek, groene vermeerderingsfase, rode (stress) fase en een schoonmaak/hygiëniseringsprotocol.

4.1.1 Opweek

De opweek vindt plaats in plastic zakken met doorvoer van lucht/CO₂ mengsel, in een geconditioneerde klimaatcel met kunstmatig licht (TL buizen).

- De hygiëniserings voor-en tijdens de opweek zal worden geoptimaliseerd om het slagingspercentage te verhogen.
- De effecten van CO₂ dosering en de hoeveelheid licht op de groeisnelheid zal worden onderzocht met als doel de opweekfase te verkorten.
- Een oplossing voor het sneller inoculeren van het opgekweekte materiaal in de bioreactoren in de kas zal worden gezocht.

4.1.2 Slagingspercentage

De ervaring in het eerdere project heeft geleerd dat er twee voornaamste oorzaken zijn van het mislukken van sommige teelten: 1. besmetting met ongewenste organismen en 2. suboptimale groei of afsterven in de rode fase door suboptimale teelt en teeltfactoren. Het onderzoek zal daarom langs twee lijnen worden gedaan: 1. hygiëniserings en 2. teeltverbetering.

- Hygiëniserings: Onderzoek zal worden gedaan naar de verbetering van het reinigingsprotocol, zowel in tijd als in effect.
- Teeltverbetering: Uit de monitoring tijdens de teelten in het eerdere project is gebleken dat de oorzaken van ongewenste afsterving kunnen samenhangen met al dan niet plotselinge afwijkingen in pH, CO₂-concentratie en temperatuur. Fundamenteel onderzoek naar de effecten en grenswaarden van alle parameters binnen dit project zijn gezien kosten en tijd niet haalbaar. We beperken ons daarom tot het optimaliseren van deze parameters op basis van eerder verworven kennis en ervaring en op basis van literatuuronderzoek. Er worden investeringen in het teeltsysteem gedaan om de parameters EC, pH, CO₂ en temperatuur beter te kunnen monitoren en bewaken.

4.1.3 Productieverhoging

Activiteiten zijn gericht op het verhogen van de productie en de productie per tijdseenheid. Aangezien de productie van *Haematococcus pluvialis* batchgewijs verloopt, namelijk met een vegetatieve (groene) groeifase en een stress (rode) fase, met daarvoor deels tegengestelde randvoorwaarden, vraagt dit een goede afstemming van parameters van groeifactoren. Deze afstemming moet verder worden geoptimaliseerd. Hiervoor zal onderzoek worden gedaan aan de effecten van een aantal groeifactoren:

- Licht in groene fase. Onderzoek zal worden gedaan aan het effect van lichtsterkte in de groene fase, met name het dynamisch aanpassen van de lichtsom aan de groei, met als doel deze fase zo kort mogelijk te laten duren.
- Stikstof in groene fase. Onderzoek naar het effect van de hoeveelheid stikstof, nodig voor de initiële groene fase, om zoveel mogelijk zwamcellen te genereren, die potentieel nodig voor de uiteindelijk te bereiken dichtheid zonder de stressfase nadelig te beïnvloeden, waarin de hoeveelheid stikstof nul moet zijn.

- Start stressen. Onderzoek naar het moment van starten van de stressbehandeling. Bij welke dichtheid kan idealiter worden gestart met stressen. Uit ervaring blijkt dat de dichtheid nog zeer sterk toeneemt vanaf stressfase. Een hoge dichtheid levert met een bepaald % astaxanthine veel product op, echter bij een lagere dichtheid eerder stressen levert tijdswinst op en verlaagt de kans op mislukkingen.
- Lichtniveau en energieverbruik. In dit onderdeel zal worden gekeken welk lichtniveau minimaal noodzakelijk is voor het stressen, om vervolgens een optimum te zoeken voor de instellingen van de regelingen in de kas (belichten, schermdoeken) bij maximaal gebruik van daglicht en zo laag mogelijk energieverbruik voor belichten.

4.1.4 Stammenscreening

De in WP1 geselecteerde en verbeterde meest belovende stammen moeten op verschillende tijdstippen van het seizoen worden geteeld in een kasomgeving. In het eerste jaar worden met uit het voorgaande project (De Boer *et al.* 2015) enkele veelbelovende stammen experimenten verricht, stammen 840, 358 en 883.

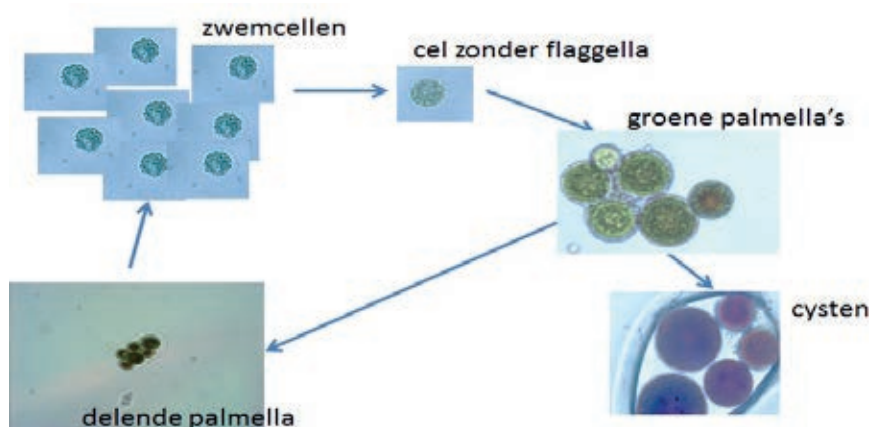
4.2 Materiaal en methodes

4.2.1 Levenscyclus van *Haematococcus pluvialis*

Haematococcus pluvialis is een eencellige alg met vier verschillende stadia in vegetatieve cel cyclus (Figuur 9). In het eerste stadium is de alg een zwemcel met twee flagella. Dit type cel domineert onder gunstige groeiomstandigheden. Wanneer het milieu of de kweekomstandigheden ongunstig zijn geworden, verliezen de zwemcellen hun flagella en ontwikkelen ze zich tot een "palmella", die zich niet kan voortbewegen. In het derde stadium worden van de palmella's cysten gevormd met dikke en rigide celwanden. Dat zijn in feite overlevingsstructuren van *H. pluvialis*. In de cyste wordt de productie van carotenoiden gestart, o.a. astaxanthine.

Het is ook mogelijk dat palmella's in plaats van een cyste te vormen zich verder gaan delen. Dan worden tot 32 zwemcellen gevormd uit één palmella. Of een palmella tot een cyste vormt of zich deelt is afhankelijk van de omstandigheden. Zonder te kort aan voeding en aanwezigheid van andere stressfactoren worden nieuwe zwemcellen gevormd. Onder stressomstandigheden (voedingstekort, hoge lichtintensiteit) gaan palmella's voornamelijk cysten vormen.

Hierboven is de ongeslachtelijke levenscyclus van *Haematococcus pluvialis* beschreven. Geslachtelijke voortplanting wordt zelden waargenomen in *H. pluvialis*, die is grotendeels vervangen door vegetatieve voortplanting.



Figuur 6 Levenscyclus van *Haematococcus pluvialis*.

4.2.2 Teelt van *Haematococcus pluvialis* in kassen

De teelt van *Haematococcus pluvialis* in een kas is erop gericht door stressbehandeling uiteindelijk een zo hoog mogelijke productie van astaxanthine te realiseren in zo kort mogelijke tijd. Dit kan op allerlei manieren, echter, omdat de basis voor dit teeltrecept reeds is gelegd in het eerdere project "Duurzame astaxanthine productie uit algen in kassen" (De Boer *et al.* 2015) liggen een aantal uitgangspunten vast: 1. Het algenteeltsysteem: een bestaande opstelling van gesloten GemTube bioreactoren in kassen, zoals die staan bij WUR in Bleiswijk; 2. Het uitgangsmateriaal, reeds beschikbare beperkte selectie van een aantal natuurlijke *Haematococcus pluvialis* stammen; 3. Standaard voeding; 4. bestaande kasuitrusting met beperkte mogelijkheden voor belichting en schermregeling.

Er is gekozen voor een batchgewijze twee-fasen teelt van astaxanthine uit *Haematococcus pluvialis* (zie ook Fábregas *et al.* 2001): 1. een groene fase, waarbij na inoculeren van de alg in de teeltsystemen zo snel mogelijk tot een bepaalde dichtheid aan algen wordt gekweekt en 2. een rode fase, waarin via een stressbehandeling de astaxanthine productie in gang wordt gezet. Voorafgaande aan de teelt is er de opkweek van inoculum, die ook uit twee fasen bestaat: een voorkweek vanuit reïncultuur in erlenmeyers in een kweekkast en een opkweek tot voldoende inoculum in plastic zakken in een klimaatcel.

4.2.3 Voorkweek in kweekkast

4.2.3.1 Reinkweek

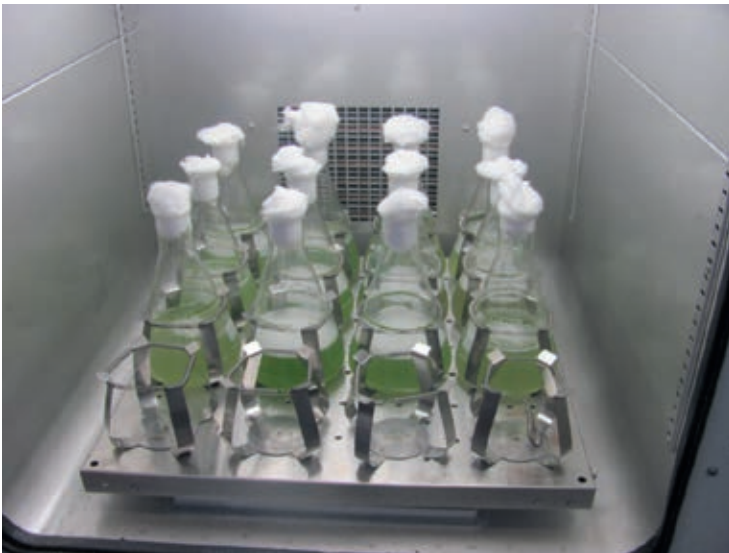
Reinkweek van *Haematococcus pluvialis* Flotow isolaat 840 (vanuit CCALA- Culture Collection of Autotrophic organisms, Tsjechië) en de stammen 358 en 883 was gekweekt op vloeibaar Basal Bold medium (met modificaties) op schudtafel met licht en zonder extra beluchting/CO₂ toevoer.

Erlenmeyers

Erlenmeyers van 500 ml worden gevuld met ca. 250 ml teeltmedium. Dit wordt in een autoclaaf bij 120°C gedurende 15 min gesteriliseerd. Na afkoelen in een flowkast wordt ca. 5 ml van een beschikbare reïncultuur geënt en worden de erlenmeyers afgedicht met een steriele wattenprop. Deze worden vervolgens op een schudtafel, in de kweekkast geplaatst. De schudtafel wordt ingesteld op 120 toeren per min. In ca 14 dagen tijd ontwikkelt zich een hoeveelheid algen tot een dichtheid van ca. 1 g/l, die voldoende is om te gebruiken als inoculum voor de opkweekfase.

Het is van uiterst belang dat in deze fase volledig steriel wordt gewerkt. Het betreft hier de vermeerdering van het uitgangsmateriaal, de risico's van een eventuele besmetting met andere algen of micro-organismen is dan erg groot. Zo nodig kunnen reïnculturen betrokken worden van een daartoe gespecialiseerd lab.

Zo nodig kan het inoculum langere tijd in stand worden gehouden als het nog niet direct nodig is voor de opkweek. De algen zullen na het bereiken van de maximale dichtheid binnen de randvoorwaarden van licht, CO₂ en voeding enige tijd in een evenwichtssituatie blijven. Het betreft een reïncultuur dus is er geen gevaar op 'vervuiling'. In onze omstandigheden hebben we ze zeker een maand of langer nog kunnen gebruiken. Bovendien is er ook mogelijkheid om algen op vast medium in petrischalen te laten groeien.

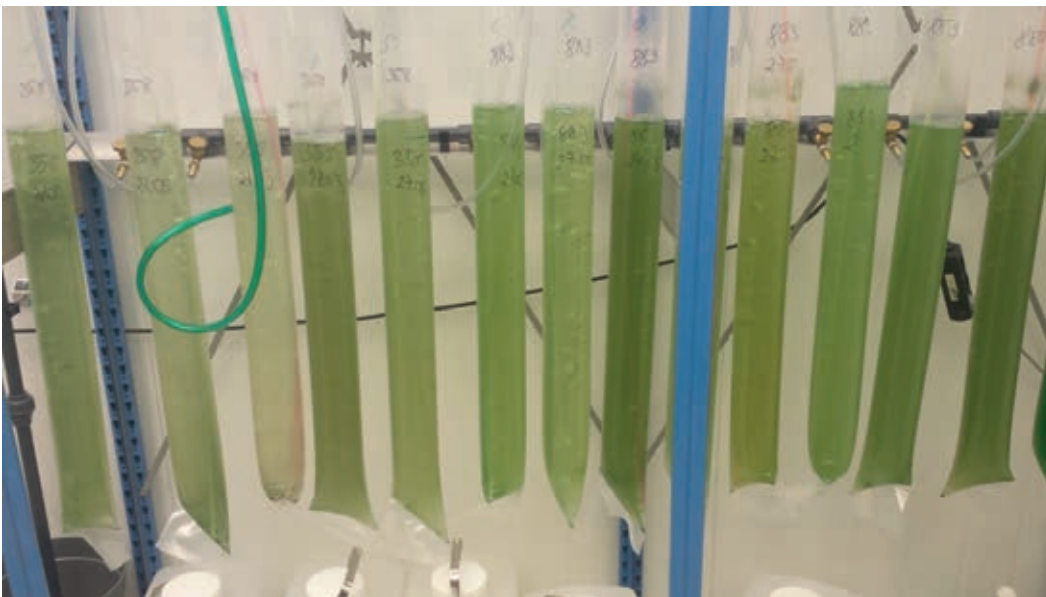


Figuur 7 Voorkweek in kweekkast met schudtafel.

4.2.4 Opkweek in klimaatcel

4.2.4.1 Plastic zakken

Het doel van de opkweek is een hoeveelheid jonge cellen in een zuivere kweek te realiseren, wat kan worden gebruikt als startmateriaal voor de teelt in de kas. Net als in de voorkweek is ook van belang in de opkweek zo schoon en steriel mogelijk te werken. Een geschikte schone werkruimte is een belangrijke voorwaarde.



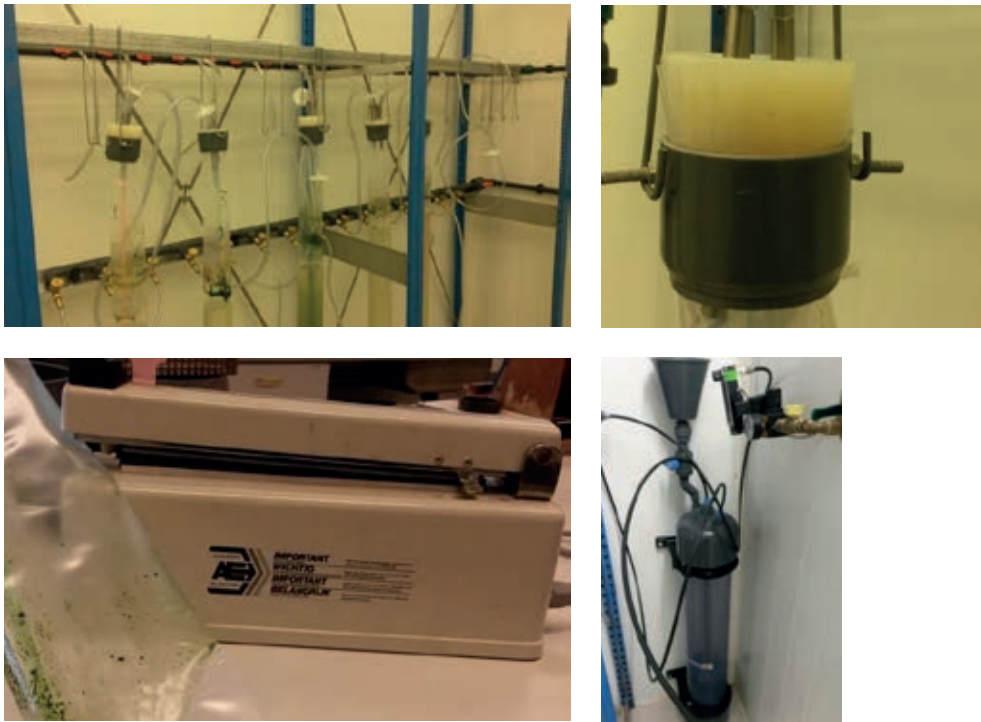
Figuur 8 Opkweek in PE buisfolie-zakken met lucht/CO₂ mengsel.

Voor de opkweek wordt gebruik gemaakt van een klimaatcel met kunstlicht. Hierin bevindt zich een metalen rek waaraan zakken worden gehangen. De opkweek zelf vindt plaats in buisvormige plastic zakken, die verticaal opgehangen worden aan het rek. Elke zak is afgesloten met een kurk en een slang voor aanvoer en een voor afvoer van het lucht/CO₂ mengsel. Perslucht wordt aangevoerd via het centrale systeem, de druk wordt gereduceerd tot 1 bar overdruk. Via een naaldafsluiter wordt de luchtflow vervolgens zodanig geregeld dat er continu een redelijke hoeveelheid luchtbellen in alle zakken doorkomen (visuele beoordeling). CO₂ is afkomstig uit zuivere CO₂ tanks en wordt eveneens gereduceerd tot 1 bar. Menging van lucht en CO₂ vindt plaats in een vat dat tevens dient als wasfles. Er wordt een met CO₂ verrijkt luchtmengsel door een luchtwasser geleid om eventuele verontreinigingen uit te filteren, maar vooral ook om het vochtgehalte te maximaliseren, zodat de verdamping uit de zakken door het continu lucht doorblazen zoveel mogelijk wordt beperkt. De verhouding lucht CO₂ is ca 0,5%. Dit wordt bereikt door via een tijdschakelaar de CO₂ te doseren.

Het luchtmengsel wordt gedistribueerd via een hoofdleiding, voor elke zak is een koperen naaldafsluiter aangebracht waarmee de luchttoevoer enigszins te regelen is. De luchtleiding naar elke zak is voorzien van een 0,3 µm Hepa-filter, 50 mm doorsnede. De afvoerslang van elke kweekzak wordt aangesloten op een centrale afvoerleiding via een simpele afsluiter. Het af te voeren luchtmengsel wordt naar buiten gevoerd.

Gebruikt materiaal (Figuur 6):

- Plastic zakken van 107 cm lengte worden gemaakt van een rol doorzichtig PE buisfolie, van 150 µm dikte en 120 mm breedte en een doorsnee van ca. 60 mm. Bestelling via <http://www.rajapack.nl>.
- Seal-apparaat van Audion Elektro, op stand 8.
- Rietjes van PE, 1 m lengte, diameter 6 mm. Hiervoor worden partyrietjes besteld bij <http://www.partywinkel.nl/>.
- Kunststof kurken met een bovendiameter van 70 mm en een onderdiameter van 60 mm, met daarin twee gaten voor aanvoer en afvoer van lucht en CO₂ van 7 mm. Bestelling via www.rubberbv.nl.
- PVC klemringen met een binnendiameter van 65 mm met ophanging, eigen fabricaat.
- Flexibele slangen voor aan- en afvoer van lucht/CO₂ voor aansluiting van zakken aan toevoerleiding. Bestelling bijvoorbeeld via nl.fishersci.com.
- CO₂ is met een timer en een klep gedoseerd aan de aanvoer van perslucht.
- Wasfles van 20 l met daarin 10 l gekookt demiwater voor het bevochtigen van het aangevoerde lucht/CO₂ mengsel.
- CO₂ controller en alarm.
- Hepa-filters, 0,3 µm. Te bestellen via <https://nl.fishersci.com/nl/>.
- TL-lampen, kleur 840.



Figuur 9 Vanaf linksboven met de klok mee: overzicht van de opkweek, kurk en afsluitring, luchtwasser, sealapparaat.

4.2.4.2 Telen in opkweek

Vooraf wordt voldoende teeltmedium geautoclaveerd. Hiervoor worden jerrycans van 25 l gebruikt. Als eerste worden materialen klaargelegd op een werktafel, die van tevoren ontsmet is met een 70% alcoholoplossing. Plastic zakken worden op maat gesneden van de rol en worden aan de onderzijde dicht geseald. Om praktische redenen wordt een 45° sealnaad gemaakt, zodat uitzakkende algen zich concentreren in een klein volume en daarna gemakkelijker weer met de lucht mee omhoog worden getransporteerd. Rietjes worden op maat geknipt zodat het uiteinde tot vlak boven de bodem van de zak komt. Zakken worden vanuit de jerrycan met teeltmedium gevuld met 2,5 liter. Hierna wordt de kurk met aan- en afvoer en een daarin geschoven rietje aangebracht en vervolgens de klemring aangebracht en wordt de zak in de kweekruimte gebracht. Aanvoer van perslucht + CO₂ wordt aangesloten en gestart. Na een hygiënisatie van 24 h met ClO₂ wordt met een gesteriliseerd pipet 50 ml inoculum uit de erlenmeyer gezogen in de gevulde plastic zak gedaan

Tijdens de opkweekfase zijn er, behalve controle op continuïteit van lucht en CO₂ doorleiding, geen werkzaamheden. Na 2 weken opkweek is er voldoende dichtheid bereikt om de systemen in de kas te inoculeren. De gebruikelijke dichtheid na 2 weken is ca 1 a 1,5 g/l. Een hogere dichtheid is nauwelijks realiseerbaar. Hiervoor zou een hogere lichttoetreding in de algenkweek noodzakelijk zijn, echter de lichtintensiteit verhogen heeft als nadeel dat de celdeling stopt en er ook al stress ontstaat. Ook duurt het langer en neemt de kans op besmettingen toe naarmate de opkweek langer duurt.

Belangrijke aandachtspunten:

- Zo schoon en steriel mogelijk werken is een belangrijke randvoorwaarde. Tafels en gebruikte materialen vooraf ontsmetten met alcohol (70%). Materialen die hergebruikt worden moeten 24 uur bij 57°C in een waterbad gepasteuriseerd worden.
- De zakken worden gemaakt van een rol buisfolie; aangenomen wordt dat deze voldoende steriel is vanuit de fabricage. Van belang is de buis na afloop van elke preparatiesessie voor de zekerheid met een sealnaad dicht te sealen.
- Er moet voldoende "luchtbuffer" tussen de bovenkant van de zak en het vulniveau zijn, om ruimte te houden voor opspatten en luchtbellen en door drukverschillen wisselende waterstanden.
- Na enige tijd hechten zich algen aan de zijwanden boven het waterniveau, deze kunnen ook rood worden doordat deze deels reeds in stress gaan. Dit wordt niet als probleem ervaren.
- Vóór het inoculeren van de inhoud van de zakken in de teeltsystemen in de kas is van belang deze te checken op (on-)zuiverheid. Een praktische methode is met een injectiespuit met naald te prikken enkele cm boven het waterniveau en vloeistof op te zuigen. Inspectie onder de microscoop. Het gemaakt gaatje moet met tape weer worden dichtgeplakt.

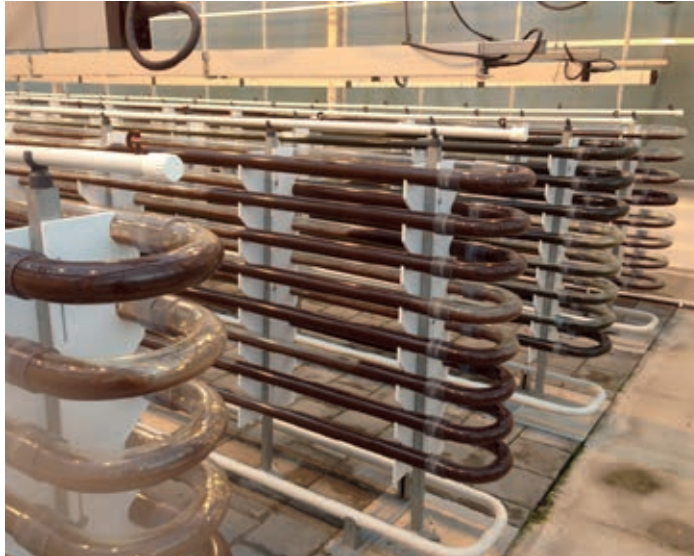
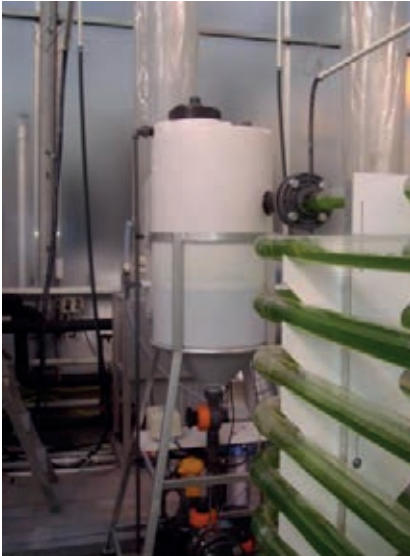
4.2.5 Teeltsysteem in kas

4.2.5.1 Kassysteem

Voor het project is een moderne kasfaciliteit bij WUR in Bleiswijk gebruikt van 6 m goothoogte, afmeting van 9,60 m * 15 m en een bruto oppervlak van 144 m², netto oppervlak is 125 m². De kas is voorzien van een diffuus glas als kasdek materiaal met een hemisferische transmissie van 82% en een haze van 71%. De gemeten kastransmissie is 61,4%. Om licht te reduceren en overdag te koelen is er een energiescherm aanwezig en een hogedruk verneveling. De verwarming bestaat uit 6 eenheden buisrail verwarming (12 * ø 51 mm) geplaatst onder de algenreactoren en een tweede verwarmingsnet boven de algenreactoren (6 * ø 24 mm). Gekoeld wordt met energiescherm en sprinklers bovenop de bioreactoren. Deze wordt aangestuurd door de klimaatcomputer, op basis van tijd, straling, kastemperatuur en reactortemperatuur. Het kasklimaat wordt automatisch geregeld door een klimaatcomputer (iSSI, Hoogendoorn). Voor de algenteelten is een setpoint van 25°C voor verwarming en voor ventilatie een setpoint van 35°C met een P-band van 5°C aangehouden. De is uitgerust met belichting (SON-T en LED, zie 4.2.5.3) en een schermdoek.

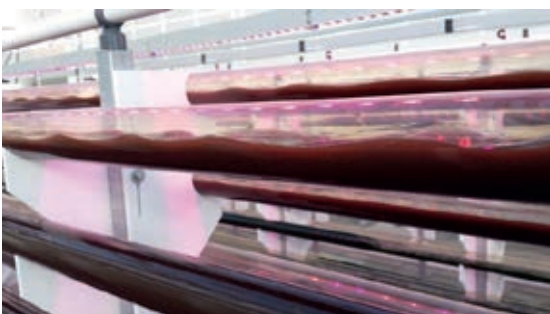
4.2.5.2 Algenteeltsysteem

In het project is gebruik gemaakt van de GemTube fotobioreactor van LGem, een bestaand teeltsysteem in een proefkas bij WUR Glastuinbouw in Bleiswijk (Figuur 10).



Figuur 10 Proeffaciliteit algenteeltsystemen in een kas bij WUR Glastuinbouw in Bleiswijk bestaande uit zes verticale algenbuisreactoren, met sprinklers voor koeling en LED balken voor de stress-behandeling.

De reactoren zijn van het type zoals ontwikkeld door LGem (Figuur 7 en Figuur 8). De fotobioreactoren bestaan uit een buffervat van 100 liter met daaraan gekoppeld een doorlopende doorzichtige PVC groeibuis met een diameter van 60 mm en 160 m lengte. Deze is opgebouwd in 8 lagen als een ellipsvormige spiraal van 10 m lengte en in de breedte 50 cm.



Figuur 11 Algen fotobioreactor type GemTube.

De reactoren zijn voor ca. 2/3 gevuld met het teeltmedium, wat continu rondgepompt wordt. Netto vloeistofinhoud van elke reactor is 420 l water. Uit eerder onderzoek bleek dat een vloeistofpomp teveel beschadigingen aan de algen geeft. Er werd daarom alleen met lucht gerecirculeerd. Naast een luchtcirculatiepomp is er een extra luchtpomp die voor overdruk in het systeem zorgt, zodat het binnendringen van ongewenste micro-organismen wordt voorkomen. Tegelijkertijd zorgt dit ervoor dat de geproduceerde O_2 uit de reactor wordt verwijderd. Zowel de overdruk luchtstroom als de CO_2 worden gemengd in de luchtcirculatiepomp en vandaaruit in de reactor gebracht. De dosering van CO_2 wordt gereguleerd door een controller op basis van de pH. De setpoint van de pH wordt gehandhaafd door meer of minder CO_2 te doseren. Dit CO_2 doseren kan door middel van een continue flow, of door een puls signaal die gemoduleerd kan worden. Er wordt zuivere CO_2 betrokken vanuit de OCAP levering (zie 4.2.5.4).

De lucht uit de reactor wordt hergebruikt. De lucht passeert een condensvanger en vervolgens wordt de lucht gefilterd d.m.v. een absoluut filter. Hiervoor wordt een dubbele filtratie toegepast: als eerste een hydrofiel filter (Fluorofill Pleatfill type PFR01S1PPEGE63) met een doorlaat van 1 μm en vervolgens een hydrofoob gasfilter (Fluorofill F20S1 AAU), met een gasdoorlaat van 0.01 μm .

Het vullen van het systeem met water en nutriënten (zie 4.2.5.5 en 4.2.5.6) vindt plaats vanuit hermetisch gesloten voorraadvaten van 500 liter. Deze worden gevuld met een directe leiding vanuit de productleiding van de omgekeerde osmose installatie. Deze laatste gebruikt grondwater als waterbron. Voedingsoplossing wordt handmatig klaargemaakt vanuit geconcentreerde A/B/C bakken. Het vullen van de reactoren vindt plaats vanuit de voorraadvaten door middel van een pomp met een leiding die is aangesloten op het voorraadvat. Dit water wordt gefilterd via een absoluut filter van 1 micron.

Het oogsten vindt plaats door middel van een extra leiding en afsluiters aan de onderzijde van het buffervat. Ook is een voorziening aangebracht voor het aftappen van monstervloeistof.

4.2.5.3 Licht

Het geïnstalleerde energiescherm gaf bij gesloten doek een kastransmissie van 41%. De kas is voorzien van assimilatie lampen (SON-T) met in totaal 114 $\mu mol/m^2/s$ (5.000 lux/ m^2).

Voor het stressen is gewerkt met Philips Green Power, LED top lighting module DR/B LB, 190 W. Dit levert 437 $\mu mol/m^2/s$. Er hingen 8 modules van 1,25 m over de gehele lengte van de reactoren (10 m). Toegerekend naar bruto teeltoppervlak komt het neer op 20,8 m^2 per reactor. Dit betekent een intensiteit van 156 $\mu mol/m^2/s$. Echter als gerekend wordt met een smallere breedte werking van de LED installatie, vanwege de directe plaatsing bovenop de reactoren en halvering van de oppervlakte, komt de intensiteit uit op 312 $\mu mol/m^2/s$. Door de lamp-buisconfiguratie kreeg alleen de bovenste buis de maximale straling toegediend, naar beneden was er sprake van sterke uitdoving. Bovendien werd vooral de binnenzijde van de spiraalwindingen van de reactor belicht. De verblijftijd van de algen in elke buis laag is ca 40 sec, en komt ca. elke 5 min weer terug, zodat per etmaal in elke buislaag een verblijf is van ca 3,5 uur.

Er is ook gemeten aan de lichtopbrengst. De resultaten staan in bijlage II van De Boer *et al.* (2015). Een gewogen gemiddelde van de lichtopbrengst over de gehele reactor geeft een opbrengst van 313 $\mu mol/m^2/s$.

4.2.5.4 CO_2

Voor de CO_2 voorziening wordt gebruik gemaakt van CO_2 geleverd via het OCAP systeem, wat voor ca. 98% uit zuivere CO_2 bestaat. Er is een back-up voorziening voor levering van vloeibare CO_2 uit een buffertank. De hoge voordruk wordt in de kas gereduceerd tot 1 bar. De CO_2 wordt gefilterd via een 2 μm kaarsfilter, om eventuele verontreinigingen te verwijderen. Distributieleidingen verzorgen de aanvoer tot aan de reactoren.

4.2.5.5 Water

Demi-water wordt geproduceerd uit via omgekeerde osmose ontzout leidingwater wat via een ionenwisselaar verder wordt gedemineraliseerd. Voor de voorkweek en opkweek wordt geautoclaveerd demi-water gebruikt. De kweek in de kas vindt plaats in water dat rechtstreeks afkomstig is uit de omgekeerde osmose (geen buffering). Dit water wordt niet verder gefilterd. Voor elke reactor is een buffervat geplaatst waarin water + voeding vooraf worden klaargemaakt. Vóór het vullen wordt water en voeding gemengd tot de gewenste EC-waarde en ontsmet met 0.5 ppm ClO_2 . Tijdens het vullen van de reactoren wordt de oplossing over een absoluut filter van 1 μm geleid.

4.2.5.6 Nutriënten/ Teeltmedium

Voedingsoplossing gebaseerd op het Basal Bolt teeltmedium, beschreven in Nichols en Bold (1969). Hierop zijn een aantal modificaties gedaan. De werkelijk toegepaste voeding is weergegeven in Tabel 3. De voeding wordt klaargemaakt als geconcentreerde voedingsoplossing, volgens de gebruikelijke wijze in de glastuinbouw (A en B bakken). Uitgegaan wordt van de standaard meststoffen die in de tuinbouw worden gebruikt, met uitzondering van NaNO_3 , dit wordt als zuivere stof bij de chemicaliën handel besteld. Vanaf 1/1/2017 is de NO_3 in de voeding verlaagd, zie 4.3.3.1.

Tabel 3

Toegepaste voedingsoplossing voor de opkweek en kweek van Haematococcus pluvialis.

Element	Eenheid	Waarde	Vanaf 1/1/2017
EC	mS/cm	1,70	1,70
NH_4	mmol/l	0,00	0,00
K	-	5,84	5,84
Na	-	8,60	8,60
Ca	-	0,45	0,45
Mg	-	0,82	0,82
NO_3	-	10,04	7
Cl	-	0,63	3,63
SO_4	-	0,82	0,82
H_2PO_4	-	4,67	4,67
Fe	$\mu\text{mol/l}$	29,00	29,00
Mn	-	5,00	5,00
Zn	-	3,50	3,50
B	-	20,00	20,00
Cu	-	0,80	0,80
Mo	-	0,50	0,50
Co	-	1,35	1,35

4.2.5.7 Meten en regelen

pH:

- In elke bioreactor wordt met twee sensoren de pH gemeten. Er wordt met een sensor geregeld.
- De sensoren zijn van het type Signet 2724-2726 pH, DryLoc connector with corrosion-resistant gold-plated contacts (GF).

Stikstof:

- De nitraat gebonden stikstof wordt bepaald door meting van proefstroken met de Nitracheck reflectometer (www.eijkelkamp.nl) met een meetbereik van 5-500 ppm met een nauwkeurigheid van 1 ppm.

Dichtheidsmeting:

- De meting van de dichtheid van de algen wordt uitgevoerd door een bepaald volume te filtreren over een glasvezelfilter met poriegrootte van 1 μm , met onderdruk via een waterstraalpompje. Na droging bij 105°C wordt door middel van weging de droge stof bepaald, relatief tot het volume is dit de dichtheid, uitgedrukt in gram (droge stof) per liter.

4.2.6 Telen in kas

4.2.6.1 Schoonmaken algenteeltsysteem

Voor de kweek kan starten moeten de systemen schoon en ontsmet zijn. Voor het inoculeren worden de systemen voor 2/3 gevuld met teeltmedium. Hieraan is vooraf 0,5 ppm chloordioxide toegevoegd. De pH wordt met bicarbonaat op 7,3 gebracht. De luchtpomp wordt aangezet zodat het systeem gaat circuleren. Na een aantal uur wordt de pH regeling geactiveerd c.q. CO₂-dosering aangezet, door het instellen van de setpoints op de controller. Hiermee wordt de concentratie aan ClO₂ verlaagd. De gekozen hoeveelheid chloordioxide heeft nog een voldoende ontsmettende werking en is niet lethaal gebleken voor de *Haematococcus*. Ook door licht zal de ClO₂ afbreken, daarom wordt deze fase in niet geschermd toestand uitgevoerd.

4.2.6.2 Inoculeren algenteeltsysteem

Vervolgens kan het systeem geïnoculeerd worden met *Haematococcus* uit de opkweek. Hiertoe worden een aantal beschikbare zakken uit de opkweek genomen en naar de kas getransporteerd. Belangrijk hierbij is zoveel mogelijk besmetting te voorkomen. Bijvoorbeeld door de zakken bij het uitnemen uit de kweek cel dicht te sealen. Het inoculeren kan met behulp van een slangenpomp, waarbij de zuigleiding in de zak wordt gestoken en de persleiding via een bestaande doorvoer (oorspronkelijk bestemd voor CO₂-meter) in het buffervat van de reactor kan worden gestoken. Op deze manier kan er ca 2,5 l inoculum per 5 min. worden ingebracht. Dit kan worden versneld door meerdere pompjes aan te sluiten. Het is niet van direct belang de snelheid van doseren te regelen in verband met de verdeling van het inoculum over het systeem, aangezien de menging in het systeem erg goed is.

De hoeveelheid inoculum is afhankelijk van beschikbaarheid c.q. capaciteit van de opkweek en het gewenste doel, ofwel welke initiële dichtheid wil men realiseren. Goede resultaten zijn bereikt met initiële dichtheden van ca 0,05 g/l. Hiervoor zijn dan 7 zakken a 2 l met een dichtheid van 1 – 1,5 g/l nodig. Een hogere dichtheid in de opkweek is nauwelijks haalbaar (zie 4.2.4).

Belangrijke aspecten:

- De ontsmetting met chloordioxide als laatste stap is belangrijk. Eventuele restbesmetting vanuit water en meststoffen of het systeem wordt daarmee afgedood. Wel is de gekozen concentratie laag (0,5 ppm), vergeleken met adviesdoseringen voor ontsmetting. Omdat er geen goede quench methode is die ook voldoende snel werkt, blijft er een rest aan ClO₂ aanwezig bij het inoculeren. Dit heeft als nadeel dat er nog afdoding van algen kan plaatsvinden. Dit risico weegt op tegen het risico van restbesmetting.
- De systemen kunnen zowel draaien met een circulatiepomp en lucht, als alleen met lucht. Empirisch is vastgesteld dat de alg *Haematococcus* hinder lijkt te ondervinden van de circulatiepomp (shear effect). Dit gegeven wordt ondersteund door literatuur (Williams *et al.* 1990). Het lijkt daarom beter om de kweek zonder circulatiepomp te laten draaien en alleen met lucht.
- De pH moet vóór inoculatie op 7,3 worden gebracht. Dit is van belang omdat de voedingsoplossing van zichzelf licht zuur is, dit zou dan tot gevolg hebben dat de CO₂-dosering niet gaat starten. Om wel CO₂ vanaf de start te laten doseren is een geforceerde pH-stijging nodig.

4.2.6.3 Groene fase

Na het inoculeren start de groene teeltfase. Doel is om zo snel mogelijk een voldoende hoeveelheid algen in uiteindelijk de palmella staat te realiseren, in een ideale dichtheid waarmee de rode (stress-) fase kan worden begonnen. Voor groei is licht nodig, echter voor de groene fase is een niveau van 50 µmol/m²/s voldoende voor de groei en ontwikkeling, bij voorkeur niet meer dan maximaal 100 µmol/m²/s om te voorkomen dat de algen te vroeg in de stress gaan. Bij de opstelling in de kas is het niet mogelijk om het licht dynamisch te regelen. Er was een basisinstelling van 24 h belichten (bij minder dan 250 W/m² instraling van buiten). Verder is het licht beperkt door telkens bedekken en verwijderen van een of meerdere losse schermdoeken, die over de reactorbuizen worden gehangen. Omdat in de lichtarme periode overdag de lichtintensiteit ook nog boven 100 µmol/m²/s kan komen, wordt na het inoculeren gestart met een enkele laag schermdoek. Na enkele dagen, als de oplossing duidelijk groen aan het worden is kan aan de schaduwzijde het doek weggehaald (c.q. opgetild) worden. Na nog een aantal dagen wordt het doek volledig weggehaald. De momenten en stappen zijn afhankelijk van de ontwikkeling van de groei (zie verderop) en wordt afgestemd in samenhang met de actuele en te verwachten straling.

Tijdens de groene fase nemen de algen steeds meer voeding op, met name stikstof (als NO_3^-). De hoeveelheid stikstof (N) in de startvoedingsoplossing (teeltmedium) is zodanig dat deze beperkend gaat worden en ook volledig uitput. Dit is bewust gedaan, omdat N-gebrek mede de astaxanthine-vorming stimuleert. De groene fase duurt zolang er nog N is; wanneer de N op is kan de rode fase starten. Het is daarom van belang in deze fase de stikstofconcentratie regelmatig (2-dagelijks) te meten. Dit kan met bijv. de Nitracheck. Zodra deze 0 is, kan gestart worden met het stressen.

Door de groei neemt de dichtheid aan algen toe. Dit kan enerzijds deling zijn en vorming van nieuwe zwemcellen, anderzijds het uitgroeien van zwemcellen tot palmella's. Bij een bepaalde dichtheid is de hoeveelheid algen zodanig dat begonnen kan worden met de stressbehandeling. Empirisch is vastgesteld dat een dichtheid tussen 1 en 1,5 g/l een geschikte dichtheid is. Daarom is het regelmatig bepalen van de dichtheid van groot belang. Het is aan te bevelen in de laatste paar dagen van de groene fase elke dag de dichtheid te meten. Het is van belang de volledige uitputting van N zoveel mogelijk samen te laten vallen met het bereiken van de gewenste dichtheid voor de start van het stressen. Ervaring leert dat de gebruikte voedingsoplossing bij het bereiken van een dichtheid van ca 1,2 g/l ook N-uitputting bereikt.

Gebleken is dat de groei, c.q. de toename in dichtheid, vrij stabiel verloopt, meestal is 8 a 9 dagen na de start een dichtheid van 1 – 1,2 g/l bereikt, voldoende om te starten met de stressfase.



Figuur 12 Eerste dagen van de teelt start onder schermdoek boven algen fotobioreactor.

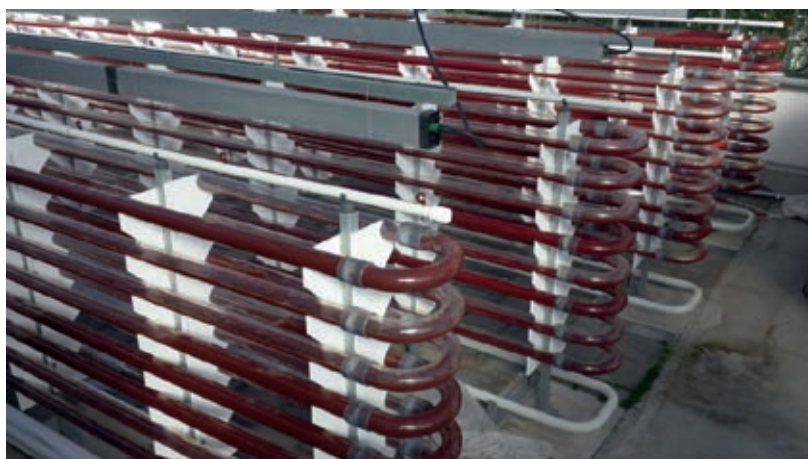
Aandachtspunten:

- In de eerste dagen na het inoculeren is gebleken dat teveel licht de ontwikkeling sterk kan remmen. Het is daarom van groot belang in deze fase te zorgen voor voldoende afscherming, met name in de periode vanaf april – augustus.
- De pH is van belang in deze fase. Te lage pH-waarden, beneden 7, zijn ongunstig voor de groei, goede resultaten zijn geboekt bij pH rond 8. Verstoring in CO_2 -dosering c.q. de pH-meting en regeling moeten in deze fase zoveel mogelijk worden voorkomen.
- In de groene fase is het van belang zoveel mogelijk celdeling te hebben, zodat zoveel mogelijk zwemcellen worden gevormd. Zwemcellen groeien in potentie uit tot palmella's. Het vormen van palmella's is het teken dat de eindfase van de groene fase is aangebroken. Een binoculair met 20x vergroting is hierbij een belangrijk hulpmiddel.

4.2.6.4 Rode fase

Tijdens de rode fase worden de algen in een stresssituatie gebracht, waarbij het doel is in zo kort mogelijke tijd, tot een zo hoog mogelijk percentage astaxanthine komen. Er zijn een aantal factoren die de vorming van astaxanthine beïnvloeden: licht, N-gebrek, hoog zoutgehalte, hoog Fe. Om praktische redenen is voor deze teelthandeling gekozen voor licht als stress-factor, in combinatie met N-gebrek.

De groene fase wordt beëindigd met het verwijderen van de schermdoeken over de reactoren en wordt zoveel mogelijk natuurlijk licht toegelaten. Hierbij geldt wel de restrictie dat de temperatuur in de buizen niet te hoog mag worden. Ook is er volgens literatuur bij een hoge lichtintensiteit kans op cel afbraak (Kumar Saha *et al.* 2013). Daarom moet de kas worden geschermd bij veel instraling en/of een hoge temperatuur. Een enkel energiescherm alleen is daarbij niet voldoende, er zal een tweede scherm nodig zijn. Vanaf half april tot eind augustus is bij zonnig weer het natuurlijk licht voldoende om stress te bewerkstelligen. Bij donker weer en alleen assimilatiebelichting van een paar tientallen μmol (paar duizend lux) is dan onvoldoende. In het project is gewerkt met LED balken boven de reactor om stress te realiseren. Deze zijn 24 uur per dag aangezet. De eerste dagen neemt de dichtheid sterk toe, met name door het uitgroeien van zwemcellen tot palmella's. Geleidelijk wijzigt de kleur van de kweek, van diep mosgroen bij aanvang naar grietgroen tot bruinrood. Op dat moment is onder de binoculair te zien dat zich oranje kernen vormen in de cellen; de vorming is dan ook gestart. Na nog een aantal dagen verandert de kleur naar bruinrood en op het laatste naar dieprood. De cellen zijn dan duidelijk volledig rood aan het worden. Uit ervaring blijkt dat het astaxanthine percentage door blijft stijgen, echter de toename neemt af met de tijd. Het moment van beëindigen zal afhangen van de randvoorwaarden en doelstelling die men heeft voor het eindproduct. In de praktijk blijkt een percentage van 2,5% - 3% een eindwaarde. In enkele gevallen is een waarde boven 3% gerealiseerd. In de rode fase is ook van belang de dichtheid te monitoren. Een dichtheid die niet verder toeneemt of zelfs afneemt is een indicatie dat de teelt ten einde loopt.



Aandachtspunten:

- Het is van belang de cel ontwikkeling onder een binoculair in de gaten te houden. In deze fase komt – zo leert de ervaring – een besmetting met andere algen of eencellige organismen tot ontwikkeling en expressie. Mocht dat het geval zijn, dan kan het raadzaam zijn eerder te stoppen, en een lager astaxanthine percentage voor lief te nemen, dan te constateren dat na enige tijd de *Haematococcus* cultuur dood gaat.
- De CO_2 -voorziening is ook in deze fase erg belangrijk, ondanks de astaxanthine vorming is assimilatie nog steeds gaande.
- Net als voor de groene fase is ook voor de rode fase optimalisering van licht belangrijk. Duidelijk is dat veel licht nodig is voor stressen. Niet duidelijk is echter of er een minimale intensiteit ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) of een hoeveelheid (mol/m^2) nodig is. In dit project zijn we uitgegaan van intensiteit, waarbij we 24 uur belicht hebben met LED lampen. Gemiddeld kwam de intensiteit op $313 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, bovenop het normale daglicht. Het is goed mogelijk dat met minder lampmodules ook voldoende stress wordt gerealiseerd. Ook optimalisatie door een andere plaatsing of configuratie van de LED armaturen, waarmee een hogere efficiëntie wordt behaald, zou tot verbetering kunnen leiden.

4.3 Experimenten en resultaten

4.3.1 Opkweek in klimaatcel

4.3.1.1 Capaciteit

Getracht is de opkweek verder te optimaliseren. De unit om plastic zakken op te hangen is verdubbeld, zodat er een totale capaciteit van 30 zakken (is ongeveer 80 l) is. Hiermee is bij een start met 2 reactoren een verdunning van 1 : 11 haalbaar, waarbij de aanvangsdichtheid max 0,08 g/l is. In de praktijk was dit vaak minder omdat er wat lekverliezen optreden en omdat een dichtheid van 1 g/l in de opkweekfase niet altijd haalbaar is.

4.3.1.2 Hygiënisatie met ClO_2

Voorafgaande aan elke inoculatie in de bioreactoren in de kas werden alle zakken bemonsterd en beoordeeld op eventuele infectie. Dit wordt gedaan door een sample te trekken met een injectienaald, en onder de microscoop te beoordelen. Bij twijfel over aanwezigheid van een besmetting werden zakken afgekeurd. Om het slagingspercentsage te verhogen is een test uitgevoerd om voorafgaande aan de inoculatie van de zakken een extra hygiënisatie uit te voeren met ClO_2 concentraties. Een reeks van 0 – 10 ppm ClO_2 werd toegediend, waarbij er in stappen van 24 en 48 uur als wachttijd algen werden geïnoculeerd. Na toevoeging van de ClO_2 werd continu het lucht/ CO_2 mengsels doorgeleid. Het bleek dat bij dosering van > 2 ppm er aanzienlijk afdoding van de geïnoculeerde algen plaatsvond, ook bij 48 uur wachttijd. Bij 2 ppm en 24 h was de eventuele afdoding beperkt, of in ieder geval acceptabel waardoor dit opgenomen is in het standaard protocol.

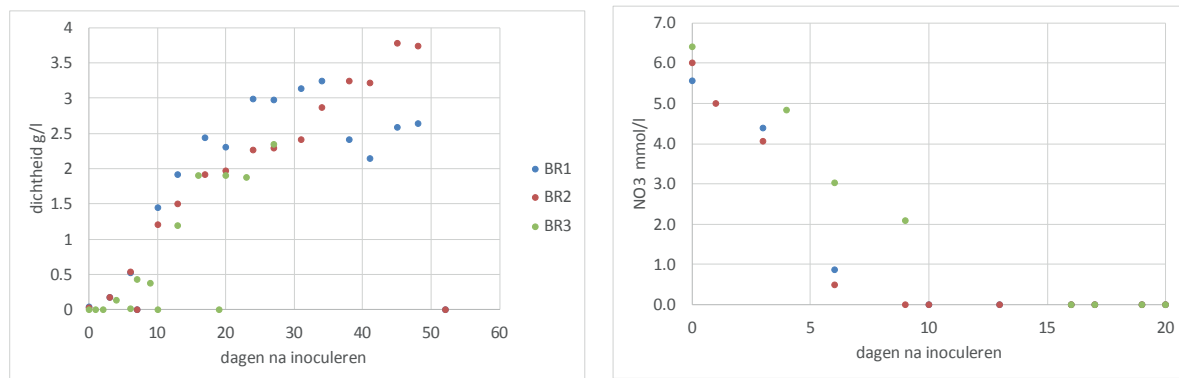
4.3.1.3 Licht

Tijdens de opkweek bleek dat er soms al licht gestreste cellen gevormd werden (oranje celkernen). Uit lichtmetingen bleek dat bovenin de zakken er een niveau van meer dan 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ werd gemeten, met een gemiddelde waarde over drie hoogtes gemeten 50 a 55, waarbij 50 uit literatuur een grenswaarde is, waarboven stress (astaxanthine vorming) optreedt. Er is daarom een voorziening aangebracht om het licht te dimmen. Hierna waren de piekwaarden iets lager, met een gemiddelde van 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Figuur 13).

Tabel 4

Teeltresultaat van de test met lagere NO_3 dosering.

BR	teelt	groene fase		rode fase					
		teeltduur d	dichtheid g/l	teeltduur d	totale teeltduur d	dichtheid g/l	asta %	asta g/m ²	asta mg/m ² /d
1	1	6	0,8	32	38	5,8	2,9	3,40	106,1
2	1	7	0,9	31	38	6,4	3,3	4,26	137,6
3	1	10	1,2	24	34	7,8	3	4,73	196,9
4	1	10	0,4	24	34	7,4	2,3	3,44	143,2
5	1	12	1,2	15	27	2,2	0,78	0,35	23,1
6	1	12	0,8	15	27	3,6	1,8	1,31	87,2



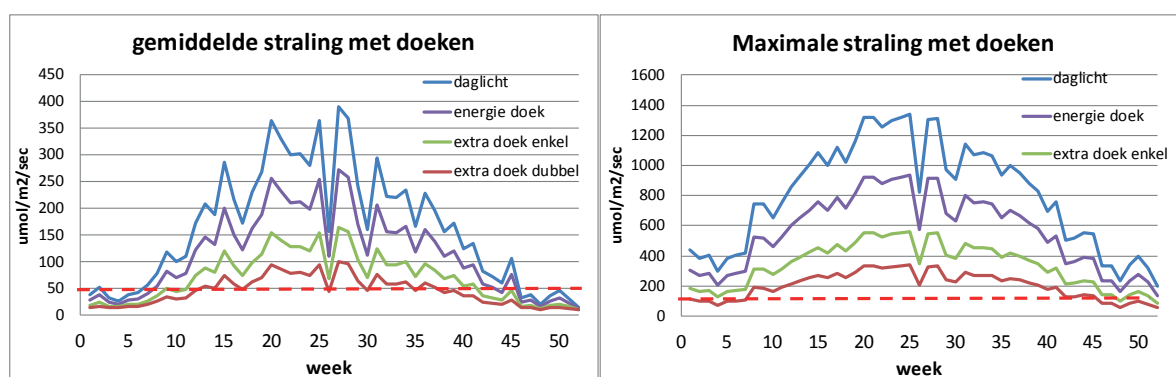
Figuur 14 Het verloop van de dichtheid aan algen (g/l) tijdens de gehele teelt (links) en de NO_3 concentratie (mmol/l) in de eerste 20 dagen van de teelt, bij drie bioreactoren met verlaagd NO_3 .

De groei in de groene fase met verlaagd NO_3 bleek goed te verlopen. Er werden dichtheden van gemiddeld 1,2 g/l bereikt op het moment dat de NO_3 naar 0 ging. Dit werd na gemiddeld 7 - 8 dagen gehaald. Dit was sneller dan in het vorige project. De dichtheden in het verdere verloop van de teelt kwamen echter niet veel hoger uit dan ca. 4 g/l, waar dat in het vorige project aanzienlijk meer kon zijn. Niettemin is besloten met deze lagere NO_3 -concentratie verder te gaan, om op die manier de totale teeltcyclus te kunnen bekorten tot ca 25 dagen.

4.3.2.2 Lichtniveau groene fase

Uit de monitoring van de teelten in het vorige project bleek dat er in de groene fase soms al vroegtijdig stress optrad, zichtbaar als oranje/rode kernen in de cellen. Vermoed werd dat er soms toch al teveel licht aanwezig is op de reactoren. Daarnaast bleek het soms moeilijk een teelt te starten, waarbij soms geheel geen groei optrad. In de literatuur is gezocht naar feitenmateriaal.

Bij een lage dichtheid ($< 0,1$ g/l) kan photobleaching optreden als de algen blootgesteld worden aan vol zonlicht (Wang *et al.* 2013). Voor de groene fase worden verschillende waarden genoemd. Scibilia *et al.* (2015) noemt een waarde van $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, terwijl Wang *et al.* (2013) evenals Li *et al.* (2010) een niveau van $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ toepassen. Park *et al.* (2014) paste een niveau van $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ toe. Op grond hiervan is geconcludeerd dat een niveau van $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ een goed uitgangspunt is voor de teelt in de groene fase, als gemiddeld maximum niveau aan de bovenkant van de reactoren. Het is hierbij logisch te veronderstellen dat de hoeveelheid benodigde fotonen zal toenemen naarmate de dichtheid toeneemt. In de opstelling in de kas zijn een aantal voorzieningen waarmee het lichtniveau op de reactor geregeld kan worden. De gehele kas heeft een transmissie waarde van 61%. Er is een beweegbaar scherm met energiedoek aanwezig met een transmissie van 70% tevens een beweegbaar scherm met verduisteringsdoek met een transmissie van 25%. Vervolgens kan het lichtniveau per reactor gedempt worden met twee lossen doeken, met elk een transmissie van 60%. Verder zijn er lampen aanwezig: SON-T met $114 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ en LED-balken van $450 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Als eerste stap is nagegaan wat de gemiddelde en maximale lichthoeveelheden zijn van natuurlijk licht over het jaar, bij gebruik van de diverse schermmogelijkheden. Als dataset is het SEL jaar gebruikt, jaar ingedeeld in 13 perioden van 28 dagen¹.



Figuur 15 Verloop van de gemiddelde (links) en maximale (rechts) dagelijkse straling over het jaar, met toepassing van diverse doeken, bij toepassing van het SEL jaar.

Duidelijk is te zien dat de gemiddelde dagelijkse straling vanaf week 6 t/m week 44 de grens van $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ overschrijdt (Figuur 15). Met het energiedoek is dit nagenoeg dezelfde periode, namelijk van week 8 – 43. Met de losse extra doeken is dit van week 12 – 40 en bij het dubbele doek is dit van week 14 – 35. De maximale straling in die periode is in bijna alle gevallen boven de 50, met uitzondering van de situatie met het energiescherm en twee doeken vanaf week 40 – week 6.

Bovengenoemde data zijn de waarden per etmaal. De maximale waarden doen zich natuurlijk soms maar enkele minuten voor. Bij inzoomen op het verloop van de straling over een dag en dan opnieuw naar de instellingen en gebruik van doeken te kijken blijkt het volgende: De periode waarin er teveel straling is voor de groene fase ($> 50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) blijkt bij toepassing van alleen het gesloten energiedoek toe te nemen van 1 á 2 uur in periode 1, tot bijna 13 uur in periode 7. Bij een enkel extra doek is dit vergelijkbaar. Bij een dubbel doek is dit ca. 5 uur in periode 3 en neemt toe tot 10 uur in periode 7. Bij de situatie met een dubbel doek en met gesloten energiedoek, is dit vanaf periode 3 enkele uren per dag, in periode 5 en 7 wordt dit gedurende 10 – 12 uur per etmaal.

Berekend naar het aantal dagen en uren dat de straling ondanks de doeken nog boven de $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ uitkomt is er in voorjaar/zomer (periode 5 en 7) op zo'n 20-25 (van de 28) dagen de straling te hoog (Figuur 17 links). Daarentegen, is er op een groot aantal dagen een aanzienlijke tijd ook minder dan $20 \mu\text{mol}$ straling (Figuur 17 rechts), uiteraard 's nachts, maar ook overdag in de donkere perioden.

¹ Uiteraard komen periode 1-2 overeen met periode 12 en 13. Echter de perioden zijn niet exact gespiegeld, aangezien de langste en kortste dag resp. op ca 2/3 van resp. begin periode 7 en eind periode 13 vallen.

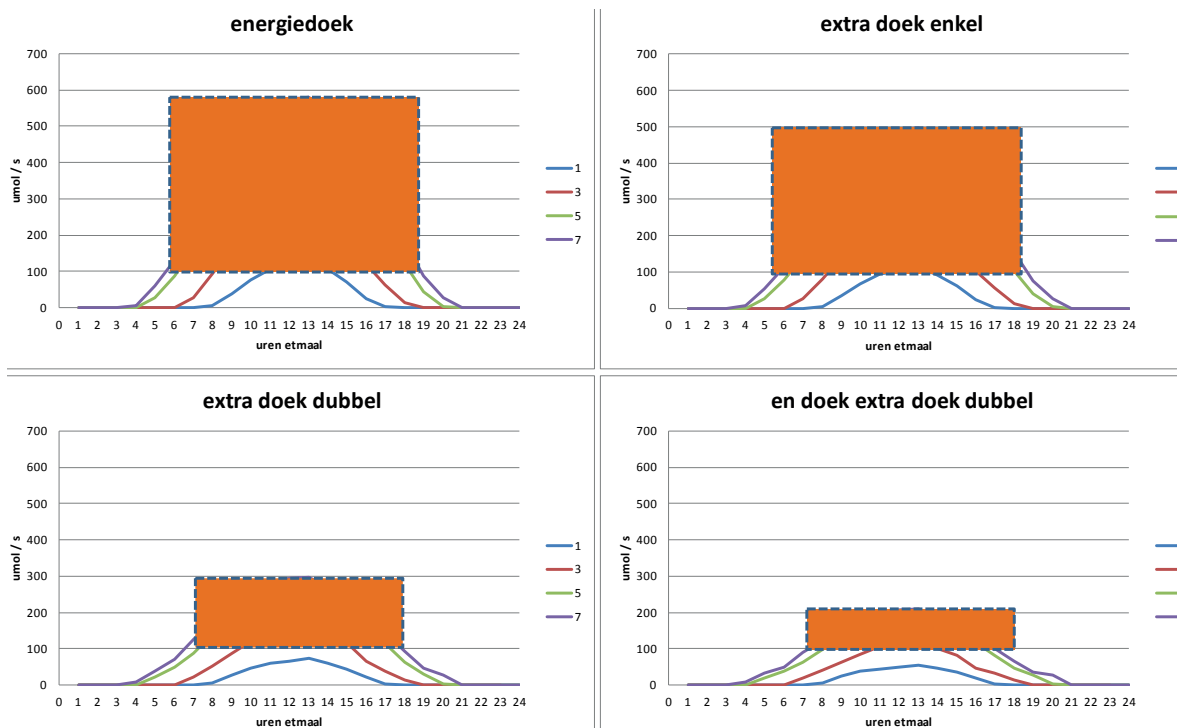
Op basis van bovenstaande bevindingen is het volgende protocol ontwikkeld voor de groene fase (Tabel 5).

Tabel 5

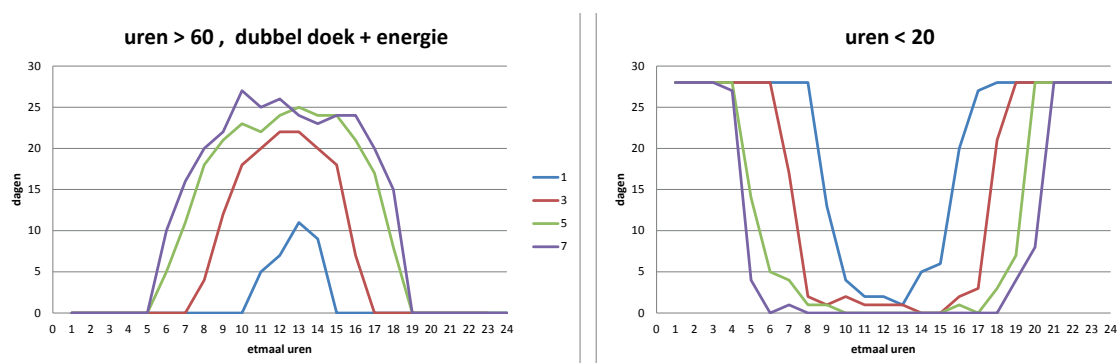
Instellingen en handelingen voor het toepassen van lichtafscherming of belichting voor de groene fase, bij de start en na 5 dagen (halverwege). De getallen zijn de grenswaarden voor licht in W/m² waarboven de doeken gesloten.

Globale straling PAR		Waarden bij start				
W/m ²	μmol/m ² /s	SON-T	Doek 1	Doek 2	Dag scherm	Verduisterings scherm
< 13	< 25		(Nee)	(Nee)		
< 33	< 50		nee	nee	nee	Nee
< 50	< 75		ja		nee	Nee
< 66	< 100		ja	ja	nee	Nee
< 100	< 150		ja	ja	ja	
< 133	< 200		ja	ja	ja	ja

Globale straling PAR		Waarden halverwege				
W/m ²	μmol/m ² /s	SON-T	Doek 1	Doek 2	Dag scherm	Verduisterings scherm
< 13	< 25		(Nee)	(Nee)		
< 50	< 75		nee	nee	nee	Nee
< 66	< 100		ja	nee	nee	Nee
< 100	< 150		ja	ja	nee	Nee
< 133	< 200		ja	ja	ja	Nee
< 200	< 300		ja	ja	ja	ja



Figuur 16 Het verloop van de straling in $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ over een etmaal in periode 1, 3, 5, en 7, bij vier situaties en combinaties met schermdoeken, met de gemarkeerde blokken waarbij de straling boven 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ uitkomt.



Figuur 17 Aantal uren met straling onder een dubbel doek en gesloten energiescherm $> 60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (links) en zonder doeken $> 20 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (rechts) gedurende een etmaal in vier perioden.

4.3.2.3 Lichtniveau rode fase

In de eerste 10 maanden van de uitvoering van dit project werd een standaard belichtingsregime uitgevoerd voor de rode (stress) fase. Dit bestond uit het aanzetten van de LED lampen, 8 stuks per reactor, die volcontinu brandden gedurende de fase van stressen, ook tijdens de periode met voldoende daglicht. Daarnaast stonden ook de SON-T lampen aan. Dit was in de wintermaanden 24 h, in het voorjaar 16 uur en in de zomer alleen 's nachts. Na evaluatie van de resultaten bleek dat de kosten voor energie een groot aandeel hadden in de totale kosten. Het gebruik van de belichting is daarop "tegen het licht gehouden" gericht op wat minimaal benodigd is voor het bereiken van een optimale astaxanthine productie bij een zo laag mogelijk energieverbruik. Logischerwijze is daarbij het gebruik van natuurlijk licht gemaximaliseerd.

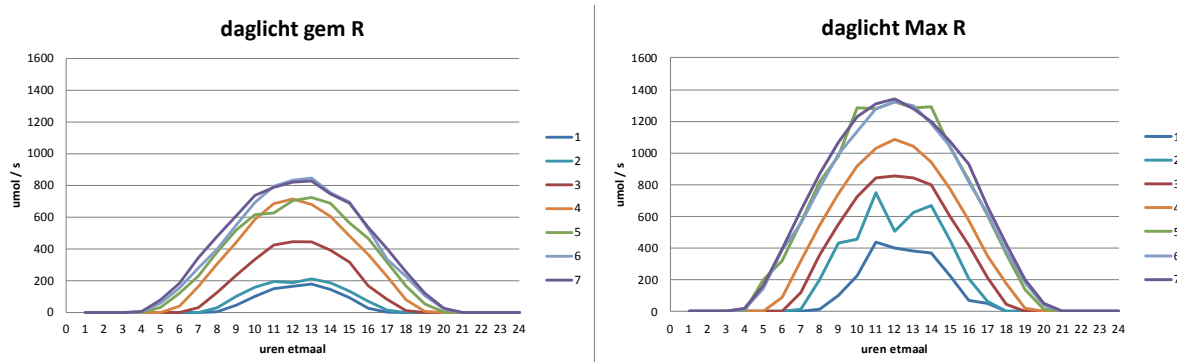
Als eerste is er nogmaals in de literatuur gezocht naar bruikbare data om te kunnen gebruiken als parameter voor het instellen van de diverse schermen en lampen. In deze literatuurstudie is onderzoek gedaan naar de gegevens die betrekking hebben op lichtintensiteit, spectrum en frequentie in bioreactoren. Uit deze studie blijkt dat de maximale lichtintensiteit in de rode fase ongeveer 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ bedraagt waarboven geen toename in astaxanthine productie plaatsvindt. Blauw licht kan ingezet worden om astaxanthine productie te stimuleren. De resultaten van cyclische belichten met een lage al dan niet hoge frequentie lopen uiteen. Over het algemeen kan gesteld worden dat de efficiëntie niet toeneemt bij lagere lichtintensiteiten. In een goed gemixt systeem is er in feite al sprake van een 'cyclisch belichting' op celniveau. In de groene fase treedt bij hoge lichtintensiteiten al snel astaxanthine vorming op. Verder lijkt het trapsgewijs toelaten van meer licht gedurende de overgang van groene naar rode fase positief te zijn voor de uiteindelijke astaxanthine productie. Een samenvatting van de gevonden data staat in Tabel 6.

Tabel 6

Gegevens uit literatuur bronnen over optimale lichtniveaus voor groene en rode fase.

Referentie	Lichtintensiteit ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)		Temperatuur ($^{\circ}\text{C}$)		Opmerkingen
	Groene fase	Rode fase	Groene fase	Rode fase	
(Evens, Niedz, and Kirkpatrick, 2008)	260	-	27	-	Lage astaxanthine productie; focus op groeisnelheid
(Xi <i>et al.</i> 2016)	50	150	25	25	Blauw licht in rode fase geeft hogere astaxanthine productie
(Park <i>et al.</i> 2014)	60-120-150	150-450	23	23	Stapsgewijze verhoging geeft meer astaxanthine dan constant licht
(Kang <i>et al.</i> 2010)	100-150-200	400	23	23	Cel concentratie gelijk, maar biomassa hoger onder stapsgewijze lichtverhoging in groene fase
(Scibilia <i>et al.</i> 2015)	40	40-400	22	22	Hoogste astaxanthine productie gevonden onder 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ in combinatie met stikstof deficiëntie

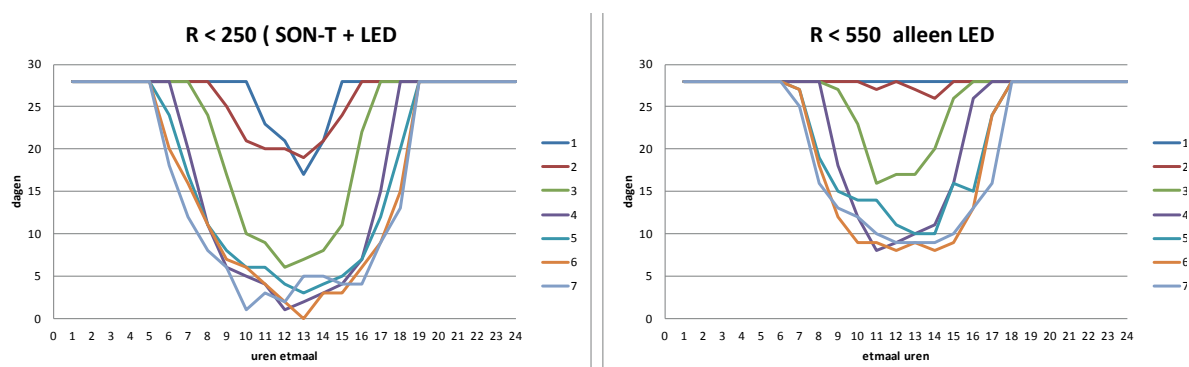
Vervolgens is gekeken hoe dit gedurende het jaar verloopt en welke instellingen dan moeten worden gekozen voor de verschillende maatregelen (afschermen, belichten). Ook hier is (net als bij de groene fase) gerekend met het SEL jaar. Om een idee te hebben van het verloop van de beschikbare natuurlijke hoeveelheid licht, is de gemiddelde en de maximale straling op basis van uurgemiddelde waarden weergegeven in Figuur 18.



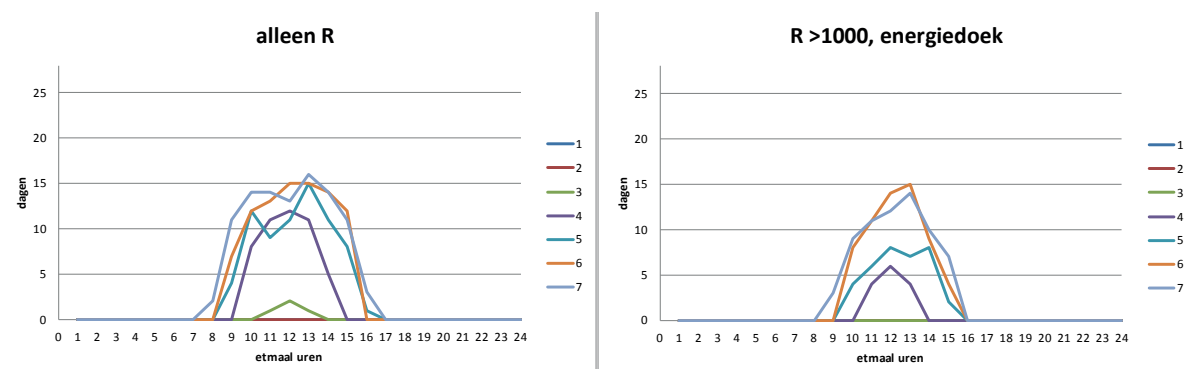
Figuur 18 Het verloop van de gemiddelde (links) en maximale (rechts) hoeveelheid PAR licht in $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ van het SEL jaar over een etmaal in periode 1 – 7.

De dataset is vervolgens geanalyseerd uitgaande van de volgende gegevens: Bij globale straling $<132 \text{ W/m}^2$ ($= 250 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ PAR licht) moet zowel SON-T ($114 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) als LED ($450 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) aangezet worden. Dit uitgangspunt is gekozen, zodat er gemiddeld 50% van het licht aan de bovenzijde van de reactor gemiddeld op de reactor valt. In dit geval is er bij 132 W/m^2 dan sprake van 250 (daglicht) + 114 (SON-T) + 450 (LED) = $700 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s} * 0,5 = 350 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ gemiddeld op de reactor. Tussen 132 en 291 W/m^2 is alleen LED aan. Dit geeft dan een traject van 350 tot $500 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ gemiddeld.

Uit de analyse van de data blijkt dat het aantal dagen dat er per etmaal minder straling is dan $250 \text{ } \mu\text{mol}$, en er zowel SON-T en LED ingezet zou moeten worden, voor periode 1 en 2 op enkele uren na vrijwel continu is voor alle 28 dagen (Figuur 19 links). Voor periode 5 – 7 zijn er – afgezien van de nachtperiode- toch nog een aantal uren in de morgen en avond waar dit criterium ook geldt. Voor het criterium >250 en kleiner dan 550 is op beduidend meer dagen en aantal uren nodig dat LED lampen aan moeten zijn. In periode 1 en 2 is dit nagenoeg volcontinu, voor periode 5 – 7 is dit tussen ca. 9 en 16 uur en nog maar op 8 – 12 dagen het geval. Dagen dat er overdag alleen daglicht kan worden gebruikt ($> 550 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) is beperkt tot een klein aantal dagen per periode, vanaf periode 4 en slechts voor een aantal uren per dag (Figuur 20 links). Er zijn ook dagen dat het licht te veel is en er risico bestaat voor cel doding. Hiervoor is een criterium gesteld van $1000 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$. Uit de analyse van de data blijkt dan dat er van 5 (periode 4) tot 15 (periode 7) dagen per periode geschermd moet worden, variërend van 3 tot 6 uur per etmaal (Figuur 20 rechts).

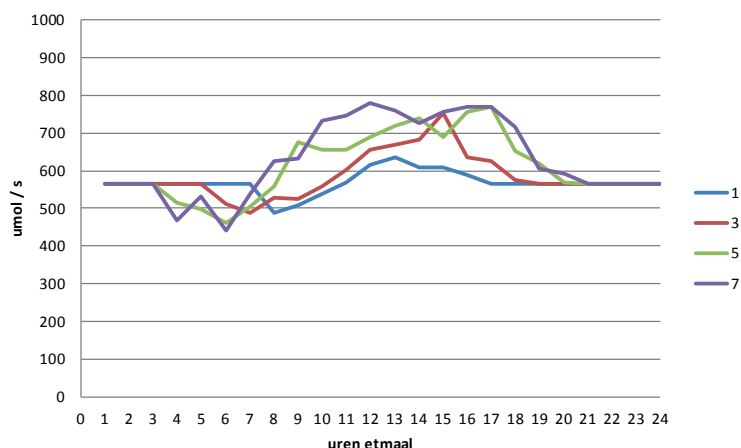


Figuur 19 Aantal dagen van het SEL jaar dat op een bepaald uur SON-T en LED lampen ingeschakeld zijn (straling $<250 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) (links) of dat alleen LED lampen aan zijn (rechts) in periode 1 – 7.



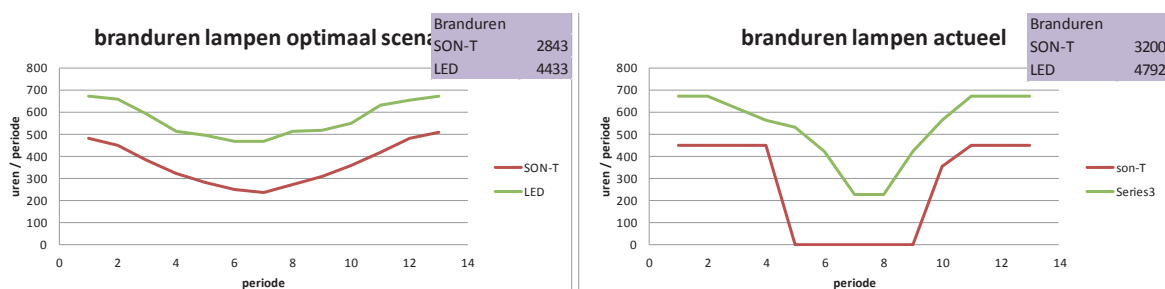
Figuur 20 Aantal dagen dat op een bepaald uur daglicht voldoende is (straling >500 , $<1000 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) (links) en aantal dagen dat geschermd moet worden (rechts) in periode 1 – 7.

Voor het SEL jaar is doorgerekend wat op basis van de genoemde criteria het aantal uren is dat er SON-T en/ of LED en/of er geschermd moet worden. Het totaal aan resulterende straling is berekend en is weergegeven in Figuur 21.



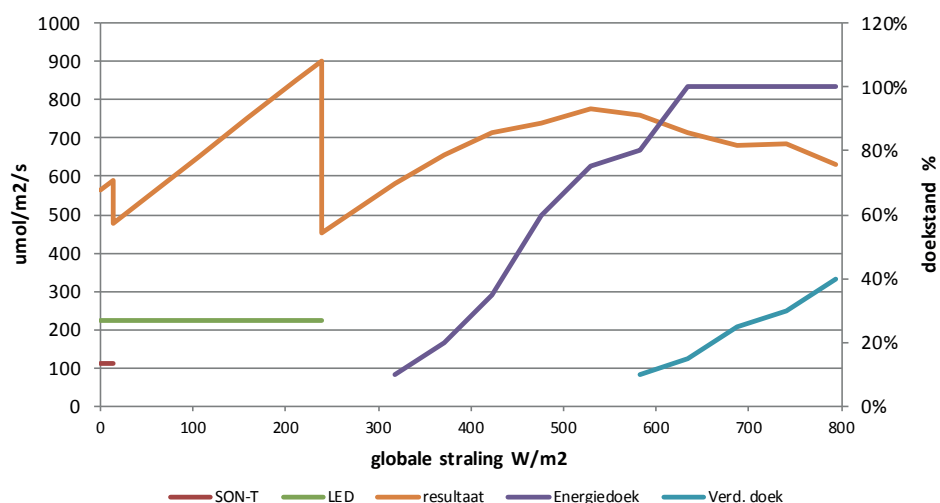
Figuur 21 Het resultaat aan PAR licht op de reactor, gebaseerd op de criteria van SON-T + LED bij <250, LED bij <550, scherm dicht >1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, berekend voor drie perioden (1, 3, 5, 7).

Uit verdere analyse van de data bleek dat vergeleken met het oude scenario, waarbij de lampen vol aan staan (echter maximaal 16 uur voor SON-T), er toch nog een aanzienlijk aantal uren lampen nodig zijn (Figuur 22). Als dit wordt vergeleken met het geoptimaliseerde scenario is er met SON-T nauwelijks verschil en met LED slechts een klein verschil. Klaarblijkelijk zijn er toch vrij veel uren dat de straling dusdanig laag is dat de setpoints voor het aansturen van de lampen worden onderschreden. Dit ligt voornamelijk aan de nachtperiodes, die een relatief grote invloed hebben op het totaal aantal uren en daarbij het grote aantal uren c.q. dagen dat de straling lager is dan de ingestelde setpoint van resp. 400 en 25 voor LED en SON-T.



Figuur 22 Het aantal uren belichting per periode, indien het geoptimaliseerde licht-regeling wordt toegepast (links) vergeleken met de eerder toegepaste instellingen.

Het resultaat van de berekeningen is toegepast in een belichtings-/schermdoek protocol voor de optimale situatie. Dat houdt dan in: Streven naar een lichtniveau van ca. 700 (= 350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ gemiddeld op de reactoren) en maximaal 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, door enerzijds maximaal gebruik te maken van natuurlijk licht en minimaal gebruik van lampen (branduren). De resultante van de sturing van licht en schermen is weergegeven in Figuur 23.



Figuur 23 De instellingen van setpoints op de klimaatcomputer voor de lampen (SON-T en LED) en de daaruit resulterende hoeveelheid PAR licht in $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, de setpoints voor de schermen (energiedoek en verduisteringsdoek) als percentage doekstand, en het resultaat van de instellingen uitgedrukt als PAR licht, alles weergegeven in afhankelijkheid van de globale straling in W/m^2 .

4.3.3 Experimenten verlaging lichtniveau / verhoging effectiviteit belichting

In een vervolg op het voorgaande is getracht een verdere optimalisering van het energieverbruik voor belichten door de hoeveelheid licht te verlagen, c.q. de effectiviteit van de belichting te verhogen. Dit laatste zou mogelijk zijn door een andere plaatsing van de lampen, waardoor een betere en hogere intensiteit van de hoeveelheid licht effectief in de buizen terecht komt. Met de huidige lampconfiguratie bleek de technische uitvoering een belemmering. Dit vooral vanwege de noodzakelijk uit te voeren koeling (sproeien). Wel zou voor een nieuw ontwerp van een teeltsysteem nagedacht moeten worden over andere LED systemen, waarbij het licht beter verdeeld wordt over de buizen.

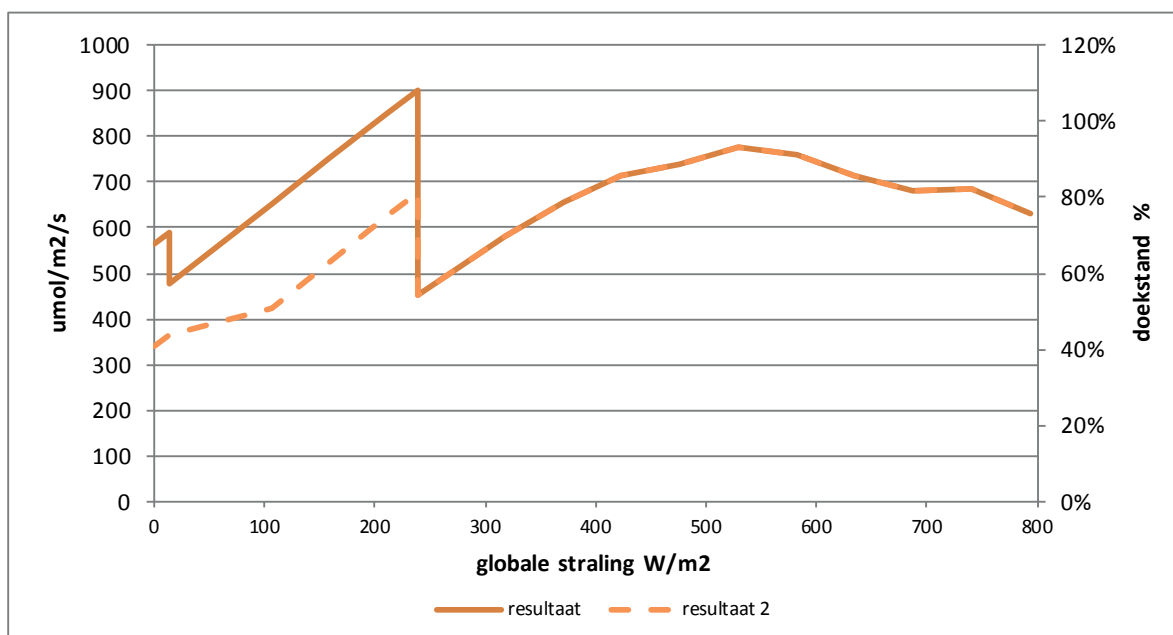
4.3.3.1 Positie LED

In het experimentele deel is nagedacht of een plaatsing van de lampen aan de voorzijde van de reactor, waarbij de lampen verticaal zijn geplaatst tot eenzelfde productie zou kunnen leiden als belichting van bovenaf. Het voordeel zou kunnen zijn dat door het verticaal plaatsen, alle buisniveaus worden bestraald, bovendien met reflectoren de effectiviteit (benutting per kWh) kan worden verhoogd. Er is driemaal een experiment uitgevoerd op deze manier. Uit de resultaten bleek een lichte daling van de productie t.o.v. de standaard configuratie (Figuur 24). Daar staat tegenover dat er met minder armaturen (4 i.p.v. 9) is belicht, dus een lager elektriciteitsverbruik.

4.3.3.2 Hoeveelheid LED

Een andere optie is het verminderen van het aantal LED armaturen. Hiermee wordt de hoeveelheid PAR licht uit LED gehalveerd, echter de totale PAR som van de LEDs ligt boven de waarde die als optimaal wordt beschouwd. Bovendien is er een economische factor die maakt dat een suboptimale belichting de productie wellicht enigszins beperkt, echter de elektriciteitskosten + vaste kosten (armaturen) gaan lineair omlaag.

De berekeningen als genoemd in de vorige paragraaf zijn opnieuw gedaan. Berekend is hoeveel licht er effectief op de reactor overblijft indien het aantal lampen wordt gemanipuleerd. Bij halvering van het aantal lampen blijft er nog relatief voldoende licht over voor stresscondities (Figuur 24).

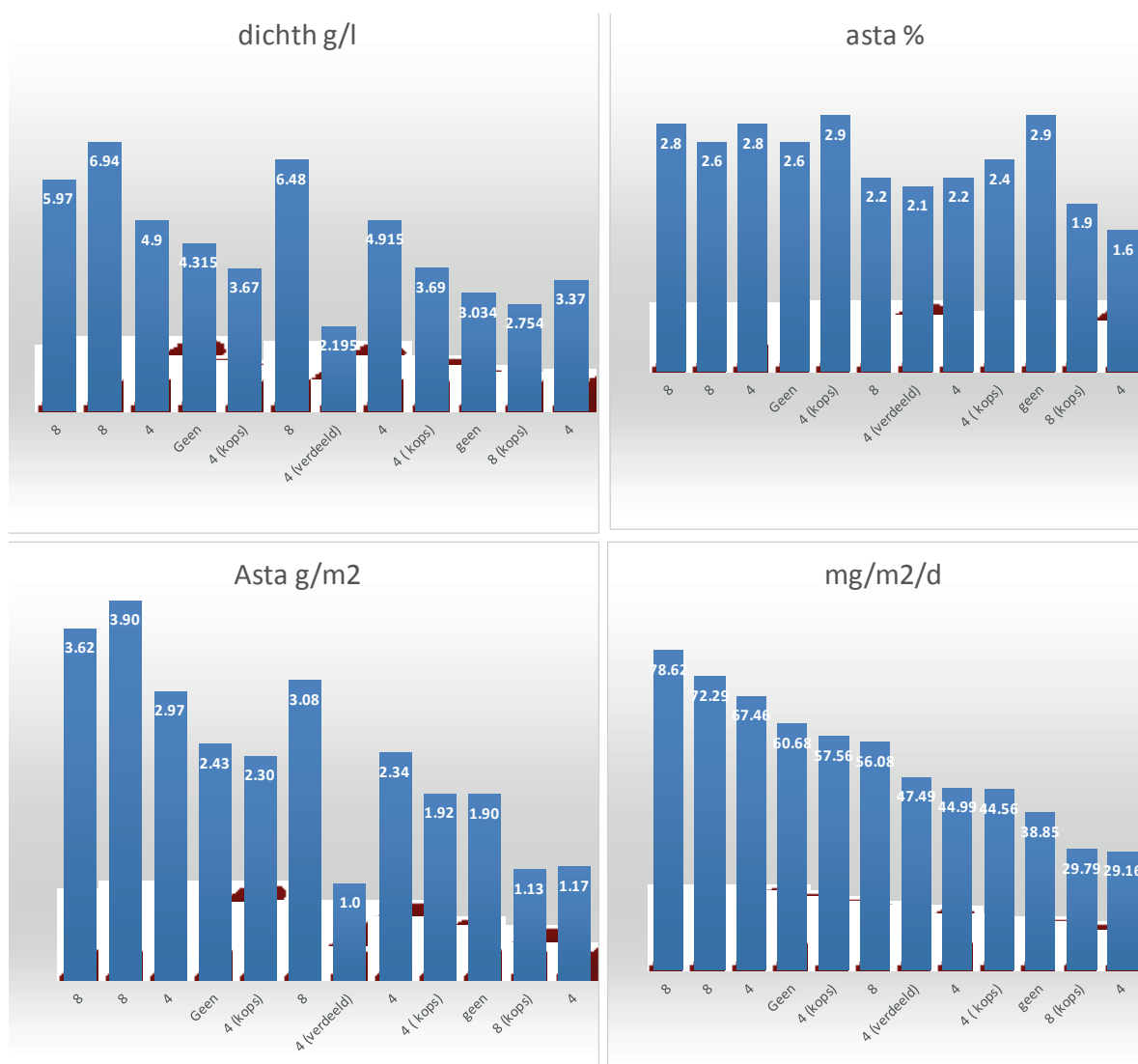


Figuur 24 Het resultaat van de regelingen van lampen en doeken als in Figuur 23, echter nu ook met halvering van het aantal LED armaturen.

Vervolgens zijn diverse teelten uitgevoerd met vier in plaats van acht lampen. Ook zijn er ter vergelijking teelten in de zomer uitgevoerd zonder additionele belichting.

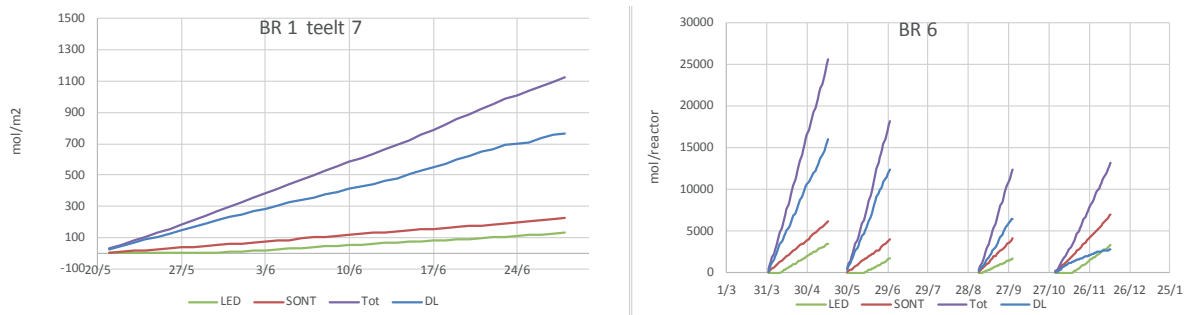
4.3.3.3 Resultaten licht en groei

De resultaten van alle teelten zijn geëvalueerd naar totaal groei biomassa (g/l), productie van astaxanthine (%) en productiesnelheid van astaxanthine (mg/m²/dag). De resultaten laten zien dat de productie aan algen of de productie aan astaxanthine geen duidelijk verband houdt met het aantal gebruikte lampen, of ook de plaatsing van de lampen. De resultaten zijn weergegeven als staafdiagrammen in Figuur 25. De uitkomsten zijn hierbij gerangschikt volgens productiesnelheid (mg/m²/d). De hoogste producties zijn dan behaald met 8 lampen, maar er zijn ook teelten met 8 lampen bij die lager in de reeks staan. Ook een teelt met 4 lampen en een zonder lampen staan echter in de top 5. Het is dus zeer aannemelijk dat andere factoren overheersen voor het totaalresultaat. Dit is sowieso een onderliggend probleem voor alle experimenten, de verschillen tussen de individuele reactoren, door standplaatseffecten (zijwaartse belichting en beschaduwning door constructie en naastgelegen compartimenten) en door individuele teelteffecten als grazers, concurrentie, infecties e.d. zijn dermate groot, dat vergelijking feitelijk onmogelijk is.



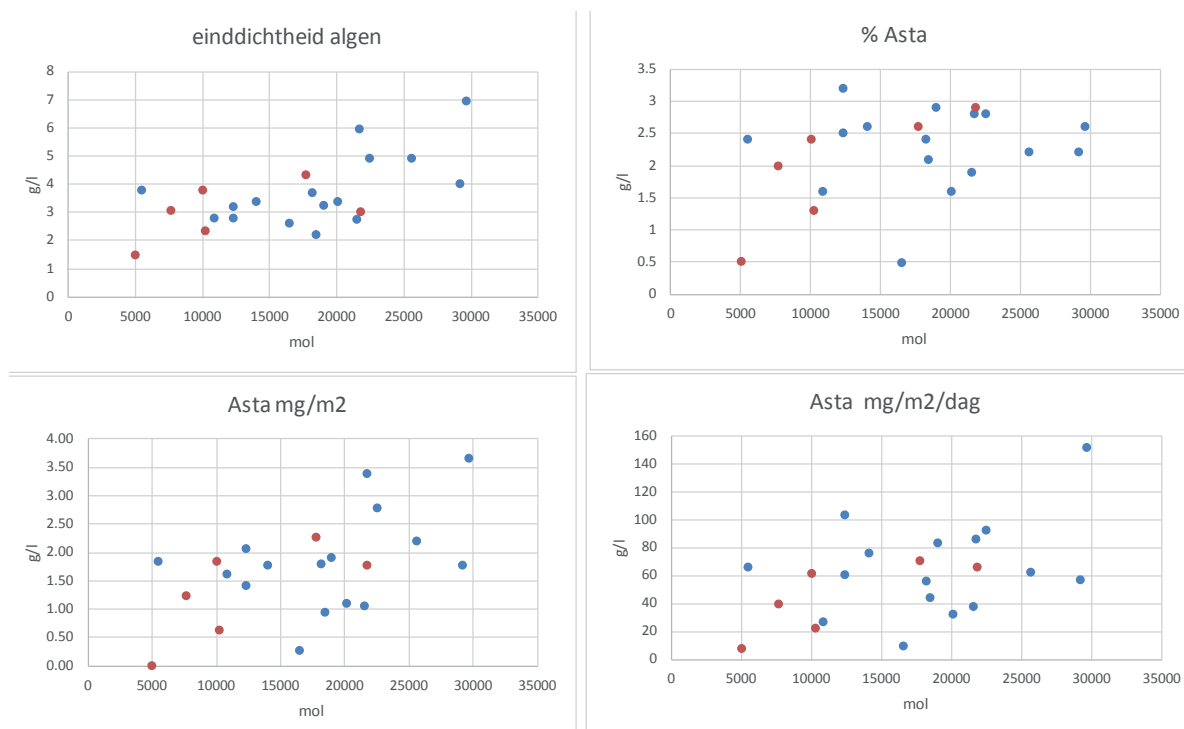
Figuur 25 De resultaten van groei (g/l), astaxanthine percentage, astaxanthine productie (g/m²) en astaxanthine productiesnelheid (g/m²/dag) bij 12 achtereenvolgende teelten met 8 lampen, 4 lampen, 4 lampen op de kopse kant of geen lampen.

Van de hiervoor genoemde teelten is ook berekend wat de totale lichtsom over de gehele teelt is geweest en of er verbanden zijn te zien tussen de groei en ontwikkeling en asta productie en de hoeveelheid aangeboden licht. Hiervoor zijn de 5 minuten waarden van de globale straling doorgerekend voor het licht op de reactor, waarbij rekening is gehouden met de kastransmissie, en positie van de schermdoeken met de specifieke transmissie voor de betreffende doeken. Vervolgens is de lichtsom van de SON-T en de LED lampen toegerekend. Omdat voor SON-T er geen schakeling was per reactor, maar alleen aan/uit voor de gehele kas is het evenredige deel per reactor genomen. Voor de LEDs is gerekend met het aan/uit voor elke individuele reactor en de schakeling van geen 4 of 8 lampen. Dit is gedaan voor de teelten uitgevoerd in 2017. Een voorbeeld van het verloop is weergegeven in Figuur 26. Het aandeel daglicht is bij het voorbeeld van de ene teelt in de linker figuur veruit het grootst. Bij de teelten die in de herfst/winter maanden worden uitgevoerd is het aandeel beduidend minder. Opvallend is dat het aandeel van de SON-T in alle teelten hoger is dan dat van de LED-belichting. Dit heeft te maken met de schakelingvolgorde. De SON-T lampen zijn ook aan als nachtbelichting in de groene fase toegepast.



Figuur 26 Het cumulatieve verloop van de hoeveelheid PAR licht uit daglicht, SON-T en LED-licht en de totaal som, van één typische teelt (links) en vier achtereenvolgende teelten.

De resultaten aan groei en asta productie zijn uitgezet tegen de verkregen gecumuleerde lichtsommen. De resultaten zijn weergegeven in Figuur 27. Er blijkt wel enig verband tussen de groei en de lichtsom. Voor de asta productie is het resultaat minder duidelijk, echter er is wel de tendens zichtbaar dat meer licht ook een hoger asta gehalte en een hogere productiesnelheid geeft. Ook voor deze resultaten geldt dat de oorzaak van de spreiding te maken heeft met de al eerder genoemde oorzaken van individuele groeiverschillen per reactor.

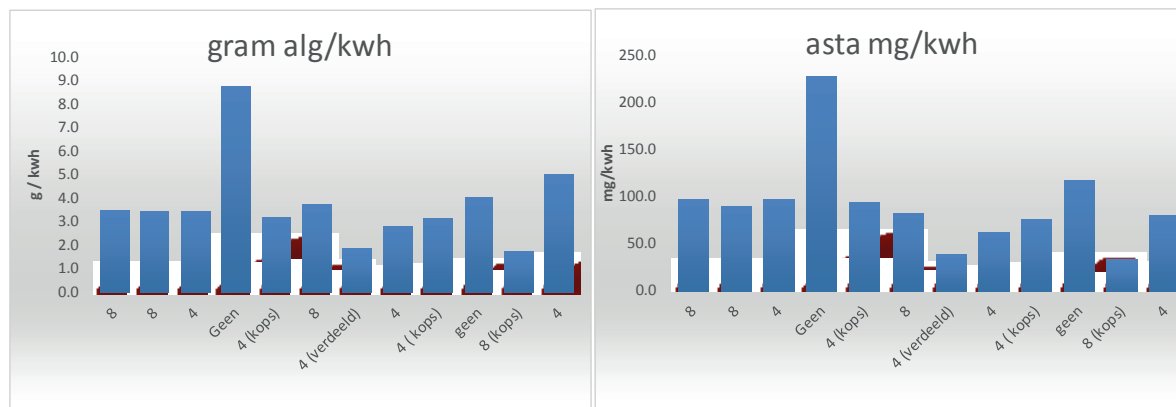


Figuur 27 Totale dichtheid aan algen (g/l), gehalte aan asta (%), en productie aan asta (mg/m²) en productiesnelheid (mg/m²/dag) uitgezet tegen de totaal som aan licht (mol/reactor). De rode punten zijn teelten zonder LEDs.

4.3.3.4 Resultaten licht en energieverbruik

Naast de effecten van de belichting zelf moet ook het energieverbruik meegewogen worden bij een evaluatie van het resultaat. Hiertoe is het energieverbruik bepaald aan de hand van het aantal branduren en een vaste conversie naar kWh. Voor SON-T is dat 600 W/lamp = 80 W/m². Voor de LED is dat 190 W/lamp = 76 W/m². De sommatie van het energieverbruik van de bovengenoemde teelten is weergegeven in Figuur 28. Het is direct zichtbaar dat er geen verband is tussen het energieverbruik en de productie aan algen of astaxanthine.

Logisch zou zijn dat teelten zonder LED het laagste energiegebruik per g alg laten zien. Dit is echter maar in één teelt duidelijk. Bij een andere teelt is dit vergelijkbaar met het energieverbruik van teelten met LEDs. Ook is het gebruik van 4 LEDs geen voorwaarde voor een lager verbruik dan met 8 lampen. Bovenop de hiervoor al genoemde groeiverschillen van individuele reactoren, is ook het gemeten percentage astaxanthine sterk verschillend geweest bij ogenschijnlijk vergelijkbare teelten.



Figuur 28 Het energieverbruik voor belichten afgezet tegen de productie aan algen (links), in kWh/g algen en productie aan astaxanthine, berekend als kWh/g astaxanthine.

4.4 Conclusies teelt en productie

Voor de opkweek is geëxperimenteerd met de groeifactoren licht en CO₂. Door het licht wat te dimmen, kon het aandeel licht gestreste cellen worden verlaagd. De continue CO₂-dosering bleek te lage pH waarden te geven. Het bleek dat een beperkte dosering van CO₂ ruim voldoende was voor de groei. Hygiëniseren van de opweekzakken met 2 ppm ClO₂ gaf veel minder uitval door besmettingen.

In de teelt bleek een lagere N dosering bij de start goed te voldoen, en is vervolgens in de volgende teelten gewerkt met 7 mmol/l aan NO₃. Na een screening van de literatuur over effecten van licht en lichtniveau's is de gehele belichting- en scherm cyclus van de teelt geanalyseerd. Dit mede met het oog op energiebesparing. Vervolgens is het teeltprotocol geoptimaliseerd. Voor de groene fase is een trapsgewijze toename van het lichtniveau opgenomen. Voor de rode fase is het aan- en uitschakelen van de SON-T en LED lampen aangepast en ook het inzetten van het energie- en verduisteringsscherm. Het blijkt echter dat door de natuurlijke lichtcyclus gedurende het jaar, een besparing door een meer gerichte schakeling beperkt is. Verder zijn er experimenten gedaan met het toepassen van lagere lichtniveaus, door het afschakelen van LED armaturen, en ook is een opstelling gemaakt waarbij het licht alleen aan de kopse kant werd aangeboden. Het bleek dat met minder licht ook stress kon worden opgewekt. De tendens is echter aanwezig dat meer licht ook een meerproductie geeft.

4.5 Totale astaxanthine productie

In totaal zijn er 59 teelten uitgevoerd. Hiervan zijn er 10% mislukt (6 teelten), 27% had een astaxanthine gehalte van minder dan 2%, 24% had een totale astaxanthine productie van minder dan 1 g/m² per teelt. Het slagingspercentage van alle teelten ligt dus op 73% en is daarmee lager dan verwacht. Van de mislukte teelten zijn er een aantal waar een technisch probleem de oorzaak is. Dit was een aantal keren uitval van een luchtpomp, en daarnaast storingen in de CO₂ voorziening, waardoor de pH extreem opliep. De teelten die niet gelukt zijn, zijn voornamelijk teelten die halverwege de rode fase een besmetting bleken te hebben. Deze besmetting was vaak een andere algensoort, die zich veel sneller ontwikkelde en de kweek 'overnam'. Daarnaast werden vaak grazers als allerlei protista waargenomen die zich zeer snel konden vermenigvuldigen. Het gevolg was dat het relatieve aandeel van *Haematococcus* in de kweek snel afnam, het % asta bleef steken of ook afnam.

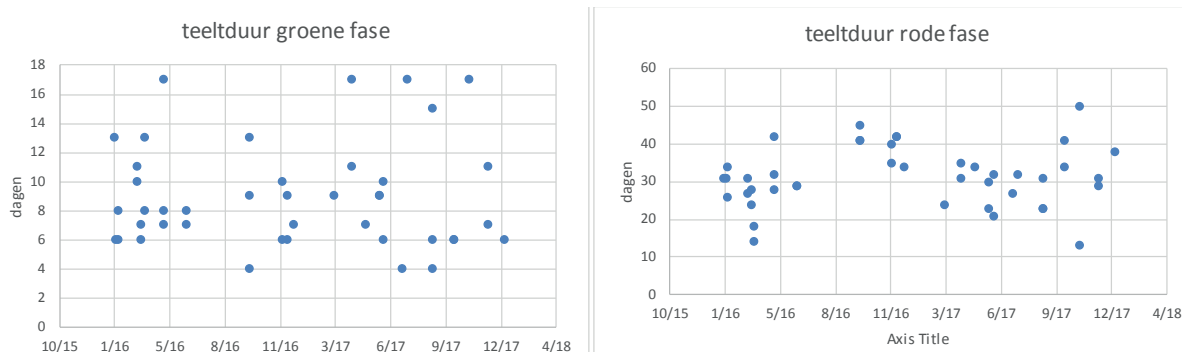
Alle testresultaten zijn weergegeven in Bijlage 2, een samenvatting is weergegeven in Tabel 7.

Tabel 7

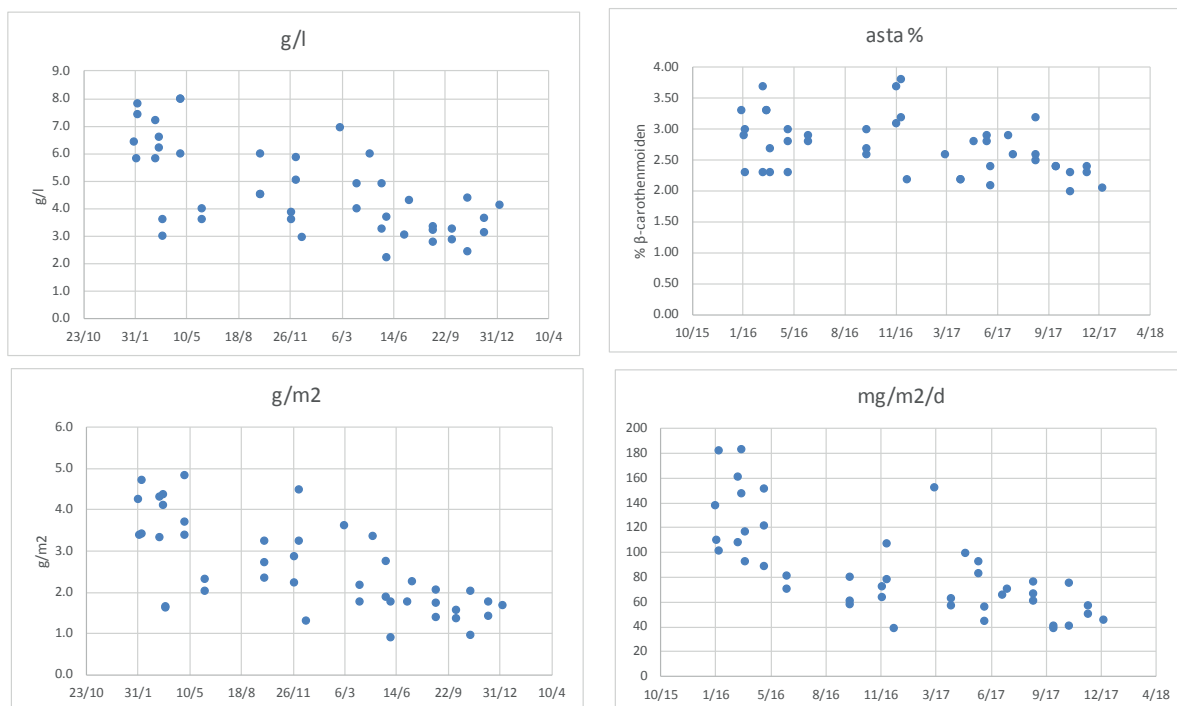
Gemiddelde teeltduur (d), dichtheid (g/l), biomassa productie (g/m²), groei snelheid (g/m²/d), astaxanthine gehalte (%), totale astaxanthine productie (g/m²) en de astaxanthine productiesnelheid (mg/m²/d) van de 10 beste, de 50% beste, de 75% beste en alle teelten tijdens experimenten in 2016-2018.

			gemiddelde 10 beste teelten	gemiddelde 50% beste teelten	gemiddelde 75% beste teelten	gemiddelde alle teelten
	Teeltduur totaal	d	43	40	40	37
Groene fase	Teeltduur	d	9,3	9,0	9,1	9,5
	Dichtheid	g/l	0,7	0,7	0,8	0,8
	Biomassa productie	g/m ²	13,3	14,2	15,7	15,2
	Groei snelheid	g/m ² /d	1,4	1,8	1,8	1,6
Rode fase	Teeltduur	d	33,2	31,2	31,3	28,1
	Dichtheid	g/l	5,5	4,8	4,7	4,1
	Biomassa productie	g/m ²	110,2	97,6	94,9	83,4
	Groei snelheid	g/m ² /d	3,5	3,3	3,2	2,9
	Astaxanthine gehalte	%	3,4	2,9	2,7	2,3
	Astaxanthine productie	g/m ²	3,7	2,9	2,6	2,1
	Astaxanthine productie snelheid mg/m ² /d		116,8	96,6	87,0	72,1

De teeltlengte bleek uiteindelijk behoorlijk verschillend, zowel voor de groene fase (varieerden van 4-17 dagen) als voor de rode fase (variërend van 13-50 dagen) (Figuur 29). Voor de groene fase zal dit grotendeels te maken hebben met verschillende hoeveelheden algen bij de start. Het bleek onmogelijk om de hoeveelheid algen die geïnoculeerd werden te normaliseren. Voor de rode fase zijn er naast de lichte hoeveelheden (4.3.3.3, 4.3.4.1, 4.3.4.2) en andere factoren, zoals hiervoor genoemd, de mate van besmetting met andere organismen. Ook de eind-dichtheid vertoont een behoorlijke spreiding (2,2-8,0 g/l) (Figuur 30). Dit zal deels samenhangen met de hiervoor genoemde oorzaken. Het valt op dat er een afname is in de dichtheid in de loop van de projectperiode. Dit heeft in ieder geval te maken met de bewust gekozen lagere N-dosering. Ook speelt mee dat in de tweede helft meer is geëxperimenteerd met belichting, met minder lampen of geen lampen, waarbij bleek dat er een lichte afname is aan groei bij minder licht (4.3.4.3) maar waarschijnlijk speelt ook mee dat in de tweede helft van de periode er vaker besmetting is opgetreden van de teelten.



Figuur 29 De teeltduur van de groene en de rode fase in dagen na start resp. na inoculatie.



Figuur 30 Totale dichtheid aan algen (g/l), % asta (%), totale productie aan astaxanthine (g/m²) en de productiesnelheid in (g/m²/d).

Op basis van de resultaten is een schatting gemaakt van de totale productiecapaciteit voor een kassysteem. Hierbij is in eerste instantie uitgegaan van de reactor configuratie zoals in de gebruikte onderzoekskas (10,2 l algenvolume op 125 m²). In tweede instantie is er rekening gehouden met een realistisch aantal reactoren in een kas van 1 ha (32,3 l algenvolume op 1 ha) (De Boer *et al.* 2015). Verschillende scenario's zijn berekend voor de 10 beste teelten, de 50% beste teelten, de 75% beste teelten en alle teelten. Een reel aantal dagen voor reinigen wordt met 7 dagen aangenomen, een minimaal aantal dagen voor reinigen met 5 dagen. De resultaten van deze scenario's zijn weergegeven in Tabel 9. In een realistisch scenario (gemiddeld alle teelten) kan in een aangenomen commerciële kas in 8,2 teelten een productie van 27,5 g/m² aan astaxanthine of 275 kg in totaal per ha per jaar worden gehaald. In dit scenario is er ook rekening mee gehouden dat een aantal teelten niet lukt, zoals daadwerkelijk gerealiseerd in de experimenten 2016-2018 in de kas in Bleiswijk. In het meest optimistische scenario kunnen 7,7 teelten met een productie van 45,5 g/m² of 455 kg in totaal per ha worden gerealiseerd.

Tabel 8

Kengetallen voor de jaarlijkse biomassa productie van *Haematococcus pluvialis* in fotobioreactoren in een kas en de productie van astaxanthine, geëxtrapoleerd naar een jaarcyclus in de kas in Bleiswijk en in een kas van 1 ha, gebaseerd op behaalde teeltresultaten van de 10 beste, de 50% beste, de 75% beste en alle gelukte teelten (zie Tabel 7).

	Gemiddeld alle teelten	Gemiddeld 75% beste teelten	Gemiddeld 50% beste teelten	Gemiddeld 10 beste teelten	Gemiddeld 10 beste teelten, 5 d i.p.v. 7 d schoonmaak
Kas in Bleiswijk (125 m ² kas, 20,2 l/m ² algenvolume)					
Productie cycli per jaar [#]	8,2	7,7	7,7	7,4	7,7
Biomassa productie [kg ds/m ² /y]	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9
Astaxanthine productie [g/m ² /y]	17,2	20,0	22,4	27,3	28,4
Totale biomassa productie [kg ds/y]	101	106	108	114	119
Totale astaxanthine productie [kg/y]	2,1	2,5	2,8	3,4	3,6
Commerciële kas (1 ha, 32,3 l/m ² algenvolume)					
Productie cycli per jaar [#]	8,2	7,7	7,7	7,4	7,7
Biomassa productie [kg ds/m ² /y]	1,3	1,4	1,4	1,5	1,5
Astaxanthine productie [g/m ² /y]	27,5	32,0	35,9	43,6	45,5
Totale biomassa productie [kg ds/y]	12,9	13,6	13,8	14,6	15,2
Totale astaxanthine productie [kg/y]	274,8	320,1	358,6	436,3	454,6

4.6 Hygiënisatie

4.6.1 Besmetting

Hygiëne tijdens alle fasen van *Haematococcus pluvialis* kweek (voorkweek, opkweek en teelt) is zeer belangrijk. Alhoewel tijdens alle voorbereidende activiteiten het streven is naar zo steriel mogelijk te werk gaan, blijkt het soms toch onmogelijk om besmetting met verschillende organismen te voorkomen in de teelt.

De meest voorkomende problemen zijn:

- Besmetting met andere algensoorten: meestal gaat het over sneller groeiende algen die relatief langzaam groeiende *Haematococcus pluvialis* wegconcurreren. Deze algensoorten groeien meestal optimaal onder andere omstandigheden dan *Haematococcus pluvialis* (bijvoorbeeld meer licht). Besmetting is meestal snel op te merken na het moment van begin stressfase tijdens de *Haematococcus pluvialis* teelt (meer licht toegelaten tot fotobioreactor, concurrentie voor stikstof).
- Besmetting met pathogenen/parasieten van *Haematococcus pluvialis*: In dit geval gaat het over organismen zoals (bacteriën, amoeben of schimmels) die pathogeen zijn voor *Haematococcus pluvialis*. Er zijn schimmels bekend die heel specifiek parasieten zijn van *Haematococcus pluvialis*. Voorbeeld daarvan is *Paraphysoderma sedebokerensis* (Gutman et al. 2009). Deze schimmel kan heel snelle afdoding van *Haematococcus pluvialis* veroorzaken (binnen 3-4 dagen), terwijl hij geen nadelige effecten heeft op groei van andere soorten algen. Aantal teelten van *Haematococcus pluvialis* in fotobioreactoren bij WUR Glastuinbouw zijn voortijdig gestopt in verband met schimmeligroei en *Haematococcus pluvialis* doding in bioreactoren.
- Besmetting met zoöplankton: Tijdens teelt kunnen ook aantal van aanwezige eencellige protista omhoog gaan. Deze organismen zijn voornamelijk grazers. Het lijkt dat deze besmetting niet direct leidt tot afdoden van *Haematococcus pluvialis*.

4.6.2 Hygieneprotocol

Voorkomen van besmetting is de belangrijkste randvoorwaarde. Alle aanvoerstromen worden daartoe zo mogelijk gefilterd via absoluut filters. Zie hiervoor de details in hoofdstuk 4.2.5.

Voor het reinigen en vervolgens ontsmetten van de algen fotobioreactoren in de kas is een protocol ontwikkeld. Dit is tijdens de uitvoering van het werkpakket door lering en aanpassing tot stand gekomen.

Na beëindigen van de teelt zijn de systemen afgeogst en leeg. In de buizen bevinden zich restanten van aangroei van algen, soms wat neerslag in de buis, organische resten, maar ook vaak een vettige laag aan de binnenkant van de reactoren. Het buffervat bevat aangroei van algen boven de waterlijn tot bovenin. Eerst vindt een grove schoonmaak plaats, dit wordt gedaan met pigs, dit kunnen pigs zijn die eerder gebruikt zijn. Daarbij kan gefilterd water uit de teelt worden gebruikt.

- Pigs worden ingesmeerd met wat ontvetter (afwasmiddel, teepol, allesreiniger). Onderin het systeem gebracht (of twee achter elkaar) en met waterdruk door het systeem geleid. NB de druk mag niet te hoog zijn om te voorkomen dat buizen barsten (bochten). Ook luchtdruk kan worden gebruikt (onze ervaringen hiermee waren niet positief).
- Ondertussen kan het buffervat gereinigd worden; hiervoor is een hogedrukreiniger het meest geschikt, maar is ook een borstel nodig.
- Het water wordt afgevoerd of opgeslagen en gezuiverd.
- Een volgende reiniging vindt plaats met een nieuwe pig en schoon water.
- Alle afsluiters, koppelingen, aansluitnippels aan de reactor en buffertank worden gedemonteerd, alle onderdelen zoveel mogelijk uit elkaar genomen. Losse onderdelen worden in een waterbad gedaan (24 h, 57°C).
- Na afloop worden onderdelen afgespoeld met demiwater, geïnspecteerd en een na reiniging met een doekje met 70% alcohol weer gemonteerd.
- ClO_2 oplossing: Er wordt gewerkt volgens voorschrift van 'twinoxide', een verdunde stockoplossing (3.000 ppm) wordt bereid uit (zonder te schudden) component B en A (vaste hoeveelheid op de fles) aan een fles met 1 liter water. Dit minimaal 3 uur laten staan. Hierna is de oplossing gereed voor gebruik. Fles schudden voor gebruik.
- Het systeem wordt in elkaar gezet, voor 2/3 vol gezet met schoon water, hieraan wordt nu 1 l ClO_2 oplossing (=6 ppm ClO_2) toegediend. Dit vooral om biofilm en restanten micro-organismen te doden.
- BR vullen en het systeem 24 uur laten draaien met de luchtpomp.
- Intussen wordt een vat met voedingsoplossing klaargemaakt, met de gewenste verdunning (afhankelijk van geconcentreerdheid: A en B oplossing 1:200 verdunnen). Hieraan wordt 0.5 ppm ClO_2 toegevoegd (90 ml van de 3.000 per 500 l). Dit is bedoeld om aanwezige micro-organismen te doden. Toedienen aan een vooraf gevuld vat van 500 l.
- Het water wordt verwijderd, en het teeltsysteem wordt vervolgens gevuld met het teeltmedium. Opnieuw laten circuleren, hiermee worden eventuele contaminatie met micro-organismen door het vullen gedood. Na een aantal uur wordt de pH op 7,3 gebracht, door bicarbonaat toe te voegen (2 mmol/l = 250 ml baskal per 450 l). Dit is nodig omdat de pH van de voeding licht zuur is (5,2 vanwege osmosewater én relatief veel P in H_2PO_4^- vorm). Na inoculeren zou dan de CO_2 -dosering niet op gang komen.
- ClO_2 wordt geoxideerd door licht- en CO_2 -dosering, eventueel blijft een geringe hoeveelheid actief ClO_2 over bij inoculatie, waardoor een klein deel van de ingebrachte algen dood gaat. Dit risico kan gelopen worden en is minder problematisch dan een rest-besmetting.
- De systemen zijn nu klaar voor de inoculatie.

4.7 Waterverbruik

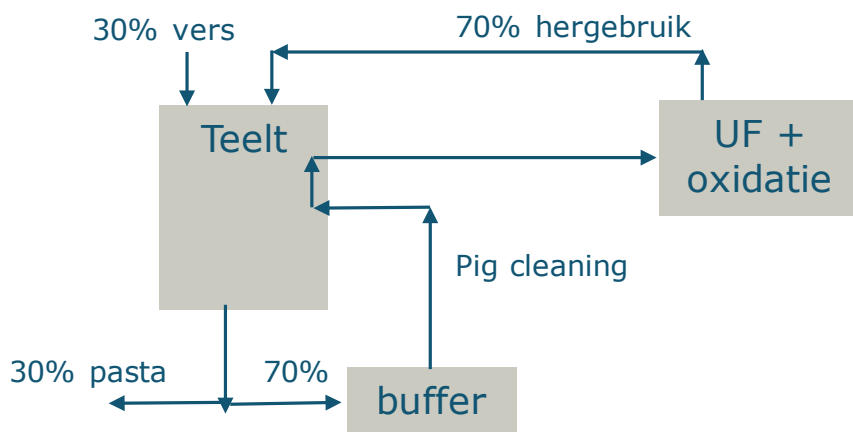
De glastuinbouw wordt geconfronteerd met strikte regelgeving voor het lozen van afvalwater uit de teelt (Stijger *et al.* 2014, Van Ruijven *et al.* 2015). Met name het lozen van stikstof en gewasbeschermingsmiddelen zorgt voor problemen voor de kwaliteit van het oppervlaktewater. Emissienormen stikstof en de zuiveringsplicht voor het verwijderen van gewasbeschermingsmiddelen zijn opgesteld om de kwaliteit van het oppervlaktewater in glastuinbouwgebieden te verbeteren. In de teelt van algen wordt (tot op heden) niet gewerkt met gewasbeschermingsmiddelen. De zuiveringsplicht is daarmee niet van toepassing op het kweken van algen.

Daarnaast geldt dat een onderdeel van het teeltprotocol is dat alle stikstof uit het water wordt opgenomen door de algen, waarna het tweede deel van het teeltproces volgt. Hierdoor is er wettelijk gezien ook geen beperking op het lozen van het gebruikte water. Mogelijk zal in de toekomst de wetgeving aangepast worden voor het lozen van fosfaat, maar in de huidige regelgeving wordt hier niet op gewezen.

In Tabel 9 wordt het waterverbruik in de teelt van *Haematococcus pluvialis* in fotobioreactoren in een kas weergegeven. In de huidige situatie, waarbij voor iedere stap uit het teeltproces (teelt + 3 reinigingsstappen, zie 4.5 hygiëniseren) vers water wordt gebruikt, wordt veel meer water gebruikt dan er aan regenwater beschikbaar is. Een aanvullende waterbron is hiervoor noodzakelijk, waarvoor afhankelijk van de kwaliteit van het bronwater een waterbehandeling met bijvoorbeeld omgekeerde osmose nodig is. Een aantal maatregelen kan de benodigde hoeveelheid water in het proces verminderen.

Een eerste optie is het hergebruiken van het teeltwater voor de teelt. Omdat vervuiling in het teeltproces het belangrijkste risico op het mislukken van de teelt is, is zeer grondige ontsmetting van het water noodzakelijk. Dit kan gedaan worden met bijvoorbeeld ozon. Er worden echter minder kosten bespaard door de verminderde vraag naar aanvullend water dan dat er extra kosten bijkomen door ontsmetten van het hergebruikte water. Er is gerekend met eenmaal per jaar volledig opnieuw starten met water voor de teelt.

Een tweede optie tot het verminderen van het waterverbruik is het cascaderen van teeltwater (Figuur 31). Het teeltwater wordt daarmee niet gebruikt voor de volgende teelt, maar wordt gebruikt voor het reinigen van de reactor met pigs. Bij het oogsten blijft 30% van het water achter in de algenpasta, 70% van het water kan worden gebruikt in de pig cleaning. Het water hoeft hiervoor niet eerst te worden behandeld, omdat het systeem in deze eerste reinigingsstap nog niet wordt ontsmet, maar alleen grof wordt gereinigd. Deze stap levert een besparing van 420 l per teelt op het waterverbruik op en daarmee ook op de kosten voor aanvullend water. Verder is er met deze maatregel geen risico op het vervuilen van het teeltsysteem. Er is gerekend met eenmaal per jaar volledig opnieuw starten met water voor alle stappen in de teelt. Hieruit blijkt dat het hergebruiken van water in de teelt nooit rendabel wordt.



Figuur 31 Cascadering van het teeltwater door het te gebruiken bij de pig cleaning.

Als volgende stap kan nog gekozen worden voor het hergebruiken van het reinigingswater in de overige twee reinigingsstappen. Dit kan aanvullend worden uitgevoerd naast hergebruik of cascadering van teeltwater. Om dit water te kunnen hergebruiken moet er in ieder geval worden gefilterd met een doekfilter. Aangenomen wordt dat in het proces in elke cyclus 50 l moet worden aangevuld in zowel de reiniging met baskal als de reiniging met hypochloriet. Dit levert een aanzienlijke besparing op waterverbruik op, maar verhoogt wel het risico op het niet volledig schoon krijgen van het systeem. Er is gerekend met eenmaal per jaar volledig opnieuw starten met water voor alle stappen in de teelt.

Er is nu echter een groot overschot aan regenwater beschikbaar en omdat lozing niet beperkend is, hoeft er minder water hergebruikt te worden. De laatste stap is het ontsmetten van het systeem met hypochloriet. Als hiervoor gebruik gemaakt wordt van vers water, dan is er nog steeds voldoende regenwater beschikbaar.

Hiermee bereiken we de meest optimale situatie: in de teelt wordt steeds gestart met vers water, na het oogsten blijft 30% achter in de algenpasta en wordt 70% gebruikt om de eerste pig reiniging uit te voeren. Vervolgens wordt baskal toegepast om het systeem nogmaals met een pig te reinigen en aangekoekt vuil los te maken. Dit water wordt opgevangen, gefilterd met een doekfilter (20 µm) en hergebruikt met 50 l verversing per teelt. Vervolgens wordt voor de laatste reinigingsstap (ontsmetting met hypochloriet) gebruik gemaakt van vers water. Deze inrichting van het systeem brengt de laagste kosten met zich mee.

Tabel 9

Totale waterverbruik en effect van hergebruik van deelstromen op totale waterverbruik in de teelt van Haematococcus pluvialis in fotobioreactoren onder glas, met verschillende mogelijkheden om de hoeveelheid benodigd water te verminderen.

	Huidige situatie	Hergebruik teeltwater	Cascadering teeltwater	Cascadering teeltwater + hergebruik baskal + hypochloriet	Cascadering teeltwater + hergebruik baskal
Waterverbruik					
Teeltoppervlak (m ²)	120	120	120	120	120
Aantal reactoren op teeltoppervlak (#)	12	12	12	12	12
Volume per reactor (l)	420	420	420	420	420
Waterverbruik per teelt (l/teelt)	1680	1386	1260	520	890
Aantal teelten per jaar (#/jaar)	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4
Waterverbruik per jaar (m ³ /ha/jaar)	14.112	11.936	10.584	5.528	8.266
Beschikbaarheid water					
Regenwater (m ³ /ha/jaar)	8.500	8.500	8.500	8.500	8.500
Aanvullend water nodig (m ³ /ha/jaar)	5.612	3.436	2.084	0	0
Kosten					
Omgekeerde osmose (1 €/m ³ , €/ha/jaar)	5.612	3.436	2.084	0	0
Doekfiltratie (€/m ³)	0	0	0	0,42	0,64
Doekfiltratie (m ³ /ha/jaar)	0	0	0	2.295	1.748
Ultrafiltratie (€/m ³)	0	2	0	0	0
Ultrafiltratie (m ³ /ha/jaar)	0	2.176	0	0	0
Ozonisatie (€/m ³)	0	1,85	0	0	0
Ozonisatie (m ³ /ha/jaar)	0	2.176	0	0	0
Kosten waterbehandeling (€/ha/jaar)	0	8.986	0	2.295	1.748
Besparing meststoffen (€/ha/jaar)	0	1.088	0	0	0
Kosten lozing (€/ha/jaar)	300	300	300	300	300
Totaal (€/ha/jaar)	5.912	11.634	2.384	2.595	2.048

Overigens is in dit project de effectiviteit van filtratie en ozonisatie voor het mogelijk maken van hergebruik en cascadering niet onderzocht.

5 Eindformulering (WP3)

5.1 Werkzaamheden

Bij Groen Agro Control is onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van eindformuleringen die aansluiten aan de wensen in de markt. Hiervoor is biomassa gebruikt uit de fotobioreactor in Bleiswijk. In dit project richten wij ons primair op het maken van een oleoresin. Er bestaat echter ook de mogelijkheid om een gevriesdroogd of gesproeidroogd poeder te maken.

Ontsluitings- en extractietechnologie is beschikbaar en is in het onderzoek geoptimaliseerd. Het is echter nodig dat er speciale maatregelen genomen worden om voortijdige oxidatie van astaxanthine te voorkomen, zowel tijdens de bereiding als tijdens opslag.

In overleg met potentiële afnemers zijn de specificaties bijgesteld en vastgelegd van de formulering in relatie tot de toepassing. Op de markt zijn een aantal eindproducten beschikbaar die als bulk worden verkocht. Dit zijn 2,5%, 5% en 10% astaxanthine als oleoresin, gesproeidroogd astaxanthine biomassa die als poeder wordt verkocht. Verder wordt er ook oleoresin verkocht in de vorm van capsules die als gezondheid bevorderende nutraceutical worden verkocht. Op dit moment is een eis die aan een oleoresin wordt gesteld dat het minimaal 5% of 10% astaxanthine bevat en gewonnen is m.b.v. superkritische CO₂-extractie.

Voor een succesvolle opwerking is het volgende belangrijk:

- Het juiste oogstmoment is bepaald met oog op een optimale astaxanthine productiviteit en het voorkomen van astaxanthine degradatie en cellysis. Verder is de meest praktische oogsttechniek geselecteerd en gekozen uit filtratie, centrifugatie of precipitatie.
- De methode om astaxanthine te ontsluiten uit de biomassa is geoptimaliseerd.
- Er zijn proefsamples geproduceerd, geanalyseerd voor belangstellende bedrijven.

Doelstelling is een gemakkelijk hanteerbaar eindproduct met een hoge concentratie astaxanthine, zonder ongewenste restanten van stoffen die eventueel bij de extractie en opwerking zijn gebruikt.

5.2 Materiaal en methodes

5.2.1 Materiaal

Als materiaal voor de studies om te komen tot een gewenste eindformulering is algenpasta gebruikt zoals die door WUR in Bleiswijk werd aangeleverd. Omdat dit veelal in de vorm van een vloeibare slurry was, werd dit gecentrifugeerd (15 min. 8000 rpm) en afgegoten, waarna de dikke algenpasta in porties werd opgeslagen bij -80°C en deels gevriesdroogd.

5.2.2 Analyse

Om de gehalten astaxanthine te kunnen bepalen werden twee methoden ontwikkeld:

1. Voor een relatief snelle bepaling van het totaalgehalte aan carotenoïden.
2. Voor een meer gedetailleerde bepaling waarin de gehalten werden bepaald van 9-*cis*-, 13-*cis*- en all-*trans*-astaxanthine.

In het eerste geval vond kwantificering plaats met behulp van een spectrofotometer, voor de tweede procedure werd een HPLC-DAD gebruikt.

5.2.3 Extractie

Extractie is een belangrijk aspect. Ten eerste is extractie op zich noodzakelijk (Sarada *et al.* 2006), omdat uit de literatuur is gebleken dat gebruik van de gedroogde alg in vergelijking met oleoresin tot snellere ontleding van de astaxanthine leidt. Dit is uiteraard niet wenselijk. Daarom moet gewerkt worden naar een eindproduct in de vorm van geïsoleerde astaxanthine, al dan niet in de vorm van een oleoresin. Handelspreparaten zijn vanwege het risico van ontleding vrijwel zonder uitzondering voorzien van tocoferol (vitamine E) als toevoeging, als antioxidant.

Een tweede aspect dat van belang kan zijn is of er gestreefd moet worden naar een preparaat met veresterde astaxanthine (zoals het voor ca. 95% voorkomt in de alg) (Grung *et al.* 1992), of een verzepte vorm, waarin de astaxanthine als vrij molecuul voorkomt. Dit laatste kan op twee manieren geschieden: chemisch of enzymatisch.

De eerstgenoemde methode gebruikt loog om de esters van het astaxanthine te splitsen. Dit heeft echter als nadeel dat er een groot risico op ontleding van het astaxanthine bestaat (o.a. Yuan & Chen, 1999). Bovendien komen met een chemische verzeeping alle in het materiaal aanwezige carotenoïden vrij in oplossing, ook de grotendeels aan eiwitten gebonden luteïne en β -caroteen (Mendes-Pinto *et al.* 2001). Deze laatste worden niet of in zeer geringe mate geëxtraheerd bij gebruik van oplosmiddel zonder voorafgaande verzeeping. Echt ongewenst zijn deze verbindingen niet, maar ze verlagen wel het aandeel van astaxanthine in het preparaat aan het gehalte totaal-carotenoïden.

Een enzymatische verzeeping verloopt veel milder en astaxanthine-esters worden hier goed door gesplitst. De kosten van zo'n behandeling zijn echter aanmerkelijk hoger, en de vraag rijst dan ook of dit alles wel de moeite waard is. Er zijn zelfs aanwijzingen dat veresterde astaxanthine een hogere radicaal scavenging-activiteit heeft dan het vrije astaxanthine.

Ten derde hangt veel af van de keuze van de extractieprocedure zelf. Te denken valt aan:

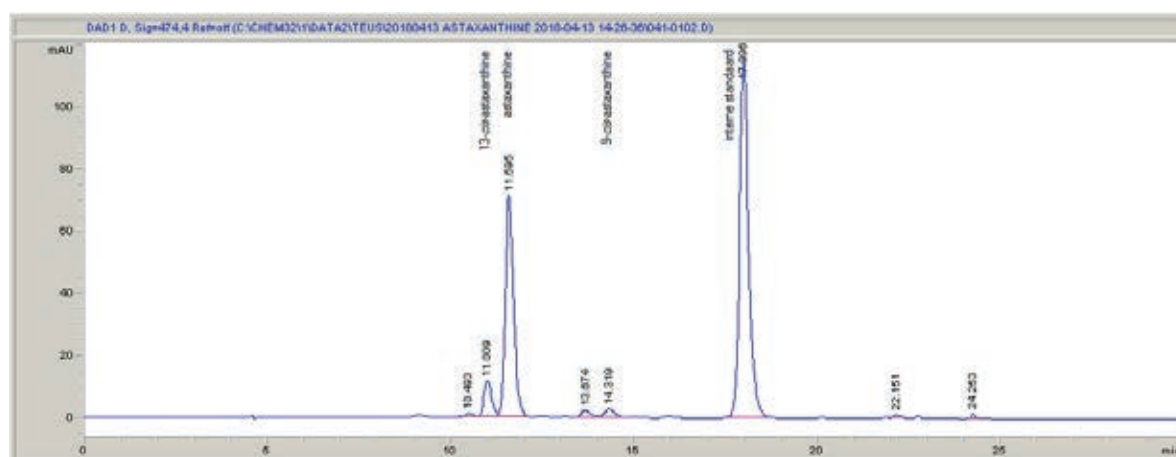
- Efficiëntie van het extractiemiddel om de astaxanthine vrij te maken uit de biomassa.
- Gestelde eisen aan oplosmiddelresiduen in voedingsmiddelen.
- Kosten van het extractiemiddel.
- Benodigde voorbewerking van de biomassa om de extractie zo efficiënt mogelijk te laten plaatsvinden.
- Selectiviteit van de extractie.
- Gemak waarmee de schaal van het proces kan worden vergroot.

De mogelijkheden langslopend is de keuze voor het extractiemiddel bepaald op ethanol, of superkritische kooldioxide. Deze zijn dan ook getest op een grote partij algenpoeder, in vergelijking met aceton om een indruk te verkrijgen van de efficiëntie van extractie. De voorkeur ligt bij extractie met superkritische CO₂, omdat ethanolextractie als "niet natuurlijk genoeg" wordt bestempeld.

5.3 Resultaten

5.3.1 Analyse

Op basis van een protocol voor de analyse van astaxanthine van Fuji Chemical Industry, Japan (Fuji, 2009) is een analyseprotocol geïmplementeerd. Een aantal kleine veranderingen ten opzichte van het oorspronkelijke protocol waren hiervoor nodig. Deze methode geeft een goed en reproduceerbaar beeld van de samenstelling voor wat betreft carotenoïden in algenextracten, inclusief het voorkomen van de (cis/trans) isomeren van astaxanthine (Figuur 13). Astaxanthine komt ook voor in 3 verschillende stereo-isomeren maar deze worden met deze HPLC-methode niet gescheiden (hiervoor is een chirale scheidingsmethode nodig). Dit aspect kan overigens wel van belang zijn om de bron van de astaxanthine aan te tonen omdat natuurlijk *Haematococcus pluvialis* exclusief de 3S,3'S-isomeer produceert, terwijl synthetisch astaxanthine bestaat uit een mengsel van 3R,3'R-, 3R,3'S- en 3S,3'S-isomeren (in verhouding 1:2:1). De verschillen tussen de antioxidatieve werkzaamheid van (esters van) de stereo-isomeren zijn het onderwerp van een voortgaande discussie: over het synthetische astaxanthine is geschreven dat het een 20x lagere antioxidantactiviteit zou bezitten en dat de andere stereochemie en de mogelijke aanwezigheid van restanten van intermediaire uit de synthese een gevaar zouden kunnen betekenen (o.a. Li *et al.* 2011, Shah *et al.* 2016), maar in een andere studie naar cardioprotectieve effecten van de verschillende stereo-isomeren kon geen duidelijk verschil in activiteit worden aangetoond (Lockwood & Gross, 2005). Afdoende bewijs is er dus (nog) niet, maar vanuit commercieel oogpunt verdient het de voorkeur om de natuurlijke herkomst van astaxanthine te benadrukken.



Figuur 32 HPLC chromatogram van verzeept *Haematococcus* extract. Ongelabelde pieken (zoals bij TR=10.49 min) zijn van onbekende carotenoïden.

5.3.2 Extractie

Vanwege het apolaire karakter van astaxanthine is het essentieel dat de algenpasta voorafgaand aan de extractie wordt gedroogd. Hiertoe is in een eerder stadium van het project al aangetoond dat vriesdrogen in dit opzicht effectief is, met het minste risico op ontleding van de astaxanthine.

Extractie voor de analyse van astaxanthine in algenmonsters vindt plaats met aceton, maar voor een grootschalige extractie is vooral gekeken naar extractie met ethanol en superkritische kooldioxide (scCO₂). Dit vanwege de eisen voor voedingsmiddelen met betrekking tot restante oplosmiddel (hoewel aceton in de zelfde categorie valt als ethanol). Voor extractie werden porties van ca. 50 g droge alg gebruikt. Omdat openbreken van de algencelwanden essentieel is voor een efficiënte extractie, werd gebruik gemaakt van Zirconia beads: deze werden toegevoegd aan het gedroogde materiaal vóór het schudden tijdens extractie in het gebruikte oplosmiddel. De gebruikte ratio tussen de massa van de te extraheren alg en het aantal Zirconia beads bleek hierin heel belangrijk. Bij te weinig beads werd de algenmassa onvoldoende 'gekraakt', en was de extractie van astaxanthine verre van volledig.

Voor de scCO_2 -extractie ligt de voorbereiding anders, omdat hiervoor niet geschud kon worden met oplosmiddel tijdens de eigenlijke extractie. Daarom werd van tevoren een portie droge alg in water behandeld met Zirconia beads (droog behandelen bleek onvoldoende effectief), waarna werd gevriesdroogd. Na scheiding van de beads werd de gemalen alg dan gebruikt voor de scCO_2 -extractie.

Het gehalte olie in de alg bleek van grote invloed op het extractieresultaat, althans op het gehalte van de astaxanthine in de geëxtraheerde oleoresin. In eerste instantie werd aan de nog in te dampen aceton- of ethanolextracten wat plantaardige olie toegevoegd om na afdampen de astaxanthine in oplossing te houden, maar al gauw bleek dat dat niet nodig was: de alg bevat reeds voldoende olie van zichzelf. Dat bleek daarmee overigens een bepalende factor in het eindresultaat voor wat betreft het astaxanthine gehalte van de geïsoleerde oleoresin: bij een hoog gehalte (mee geëxtraheerde) olie in de alg was het astaxanthine gehalte lager. Er was dus geen 'speelruimte' om het gehalte op een bepaalde waarde te brengen, althans niet of nauwelijks indien dit >7% moest zijn. Omdat er gemikt werd op een maximaal gehalte (om en nabij de 10%), is van verdere verdunning met plantaardige olie afgezien.

De scCO_2 -extractie, uitgevoerd bij Feyecon (Weesp) werd uitgevoerd met een erop volgende kolomzuivering om restanten ethanol (het gebruikte co-solvens) en mee geëxtraheerde olie kwijt te raken, maar het resultaat hiervan viel tegen: het uiteindelijke gehalte aan astaxanthine in de oleoresin was met 8.56% maar weinig hoger dan dat in een vergelijkbaar ethanolextract (7.40%). Wel claimde Feyecon een beter resultaat te kunnen verkrijgen bij extractie van een grotere hoeveelheid alg (nu 81 g DW). Dit zou inde toekomst in een nieuwe extractie moeten worden getest.

In Tabel 10 staan de data weergegeven van uitgevoerde extracties op grotere schaal. Samengevat een aantal conclusies die hieruit getrokken konden worden:

- In ax1 was de hoeveelheid gebruikte zirconia beads onvoldoende; omdat het algenmateriaal daardoor niet genoeg opengebroken is viel de astaxanthine-opbrengst tegen.
- In ax2 is er gepoogd door malen met zand in een mortier een alternatief te bieden voor de zirconia beads. Op zich lukt dat redelijk, maar de methode is zeer bewerkelijk en komt om die reden niet in aanmerking voor opschaling.
- Ax3 is bereid met voldoende gebroken algenmateriaal, en met een toevoeging van zonnebloemolie. Hierdoor is het astaxanthine gehalte in het uiteindelijk verkregen oleoresin ondanks een efficiënte extractie met 2,58% (te) laag.
- Ax4 is bereid als ax3 (met vergelijkbare efficiëntie), maar dan zonder toevoeging van extra olie. Hierdoor is het gehalte in de oleoresin behoorlijk.
- Ax5 geeft een net wat betere extractie te zien, mogelijk is dit het gevolg van een iets geringere oplosbaarheid van de in de alg aanwezige olie in de gebruikte ethanol. Er lijkt geen verschil in extractie van de astaxanthine te zijn t.o.v. aceton als solvens.
- Ax6 is een superkritisch kooldioxide-extract; bij deze extractie is verlies opgetreden, waardoor het teruggerekende astaxanthine gehalte tegenviel. Onduidelijk is vooralsnog waar en hoe dit verlies is opgetreden.

Tabel 10

Bereide algenextracten. Alle hebben betrekking op extracties van delen van één en dezelfde batch *Haematococcus pluvialis* (met astaxanthine gehalte 3,83%). In de meest rechter kolom staat het astaxanthine gehalte zoals teruggerekend uit de opbrengst na extractie.

extract	ml bereid	alg DW	solvens	behandeling	Astaxanthine (mg/l)	Astaxanthine % in DW alg ('terugvinding')
AX 1	70	60	hexaan	zirconia beads (16/g alg)	2.093	0,24
AX 2	33	60	hexaan	zand	14.686	0,81
AX 3	34	24	aceton	zirconia beads (160/g DW alg)	25.793	3,65
AX 4	26	48	aceton	zirconia beads (160/g DW alg)	66.845	3,63
AX 5	24	48	ethanol	zirconia beads (160/g DW alg)	74.018	3,73
AX 6	21,5	ca. 81	scCO ₂	zirconia beads (160/g DW alg)	85.557	2,27

5.4 Conclusie optimalisatie eindformulering

De formulering voor momenteel in de handel verkrijgbare astaxanthine preparaten is over het algemeen eenvoudig. Capsules bestaan uit astaxanthine, plantaardige olie, vitamine E, eventueel glycerine, en gelatine als capsulebasis. De dosering van astaxanthine ligt tussen 4 (Royal Green, Plantina) en 12 (BioAstin) mg per capsule. Ook zijn er tabletten op de markt (Source Naturals), deze bevatten 2 mg astaxanthine per tablet, met verder gebruikelijke tablethulpstoffen als microkristallijne cellulose en magnesiumstearaat.

Bij het opstellen van een plan voor een geschikte eindformulering was het in het kader van dit project van belang een keuze te maken in welke vorm de astaxanthine te verwerken. Zoals eerder aangegeven verdient het niet de voorkeur om intacte *Haematococcus* alg te verwerken in de formulering, omdat de stabiliteit van het astaxanthine hier onvoldoende voor is. Beter is om aan te sturen in de verwerking van een oleoresin. In deze vorm kan dan ook door toevoeging van antioxidanta als vitamine E een ontleding van astaxanthine tot een minimum worden beperkt.

Astaxanthine komt in *Haematococcus* voor ca. 95% voor in veresterde vorm: 70% als monoëster en 25% als diëster (Solovchenko, 2015 & daarin vermelde refs.). Bij de keuze voor het uiteindelijke product (de oleoresin) is ervoor gekozen de astaxanthine niet te verzeppen. Hoewel de biologische beschikbaarheid in het lichaam mogelijk iets hoger is voor de niet-veresterde astaxanthine (Coral-Hinostroza *et al.* 2004), lijkt verzeeping eerder nadelen dan voordelen op te leveren, omdat er tijdens de chemische verzeeping (bijv. met NaOH) astaxanthine verloren gaat en omdat enzymatische verzeeping dusdanig duur is dat de kosten voor het hele isolatieproces te ver oplopen.

Ook valt aan te bevelen om de astaxanthine in de oleoresin te handhaven voor formulering. Er zou gekozen kunnen worden voor een isolatie van de stof uit de olie, maar hier lijken alleen maar nadelen aan te kleven: de astaxanthine wordt aldus vatbaarder voor oxidatie, de stof is dan moeilijker te beschermen daartegen door middel van een toevoeging van antioxidans, en de formulering is eenvoudiger zonder voorafgaande isolatie vanwege een beter gegarandeerde homogeniteit.

In de opgave van ingrediënten van de meeste (zo niet alle) commerciële astaxanthine preparaten wordt de toevoeging van vitamine E (α -tocoferol) genoemd. Dit is een eenvoudige toevoeging die door de antioxidatieve werking een beschermende functie vervult. Inderdaad bleek bij de met vitamine E bereide astaxanthine-extracten de houdbaarheid bijzonder goed: bij kamertemperatuur bewaarde monsters gaven in elk geval na één maand bewaren geen aantoonbare afname van het astaxanthine gehalte te zien.

6 Markt en economie (WP4)

6.1 Werkzaamheden

Binnen dit werkpakket waren de volgende werkzaamheden voorzien:

- Markt blijven volgen, ontwikkeling en analyse aantal partijen in Europa en wereldwijd, marktperspectief blijven actualiseren.
- Kostenanalyse productie in eerder opgezet economisch model blijven actualiseren.
- Contacten leggen met bedrijven in afzet en downstream op bestaande markt voor astaxanthine.
- Contacten leggen met Nederlandse voedingsmiddelen bedrijven voor de afzet van algenproducten, dit niet alleen voor astaxanthine, maar ook de vraag naar andere hoogwaardige inhoudstoffen/producten, die gemaakt zouden kunnen worden uit algen. Astaxanthine heeft nu de meeste afzetmogelijkheden in pillen en poeders voor de "supplementen" markt, maar we denken dat er meer mogelijkheden zijn, die het waard zijn te onderzoeken.

6.2 Marktperspectief

Gedurende een aantal jaren neemt de omvang van de markt voor astaxanthine sterk toe. Dit geldt zowel voor het synthetische astaxanthine van DSM Nutritional products als ook voor het natuurlijke astaxanthine dat geproduceerd wordt door *Haematococcus pluvialis*. Het merendeel van het *Haematococcus* astaxanthine wordt geconsumeerd als nutraceutical in de vorm van capsules. Astaxanthine wordt hierbij gezien als *radicaal scavenger* dat effect heeft tegen veroudering, de weerstand stimuleert en ontstekingsremmend werkt, dat de vorming van kanker voorkomt en effectief is tegen oogziekten en de ziekte van Alzheimer. Ondanks dat het gerechtvaardigd is om je af te vragen of hierbij niet wat veel wordt gezinspeeld op de gezondheidshype, blijkt het een succesvolle benadering om de markt te vergroten.

Hiernaast vindt *Haematococcus*- astaxanthine aftrek als natuurlijke kleurstof in vitaminedrankjes, cosmetica en als kleurstof voor siervissen en siervogels.

In cosmetische producten wordt *Haematococcus* astaxanthine gebruikt in crèmes om veroudering van de huid tegen te gaan en de huid een gezond tintje te geven. Deze laatste toepassingen zijn sterk in opkomst, maar bij een beperkt aantal bedrijven, omdat deze zich een sterke octrooiopositie hebben verworven in deze markt. De verwachting is dat andere bedrijven deze markt niet makkelijk meer kunnen betreden.

In de aquaculture (productie van zalm, sea bream en garnalen) wordt veel astaxanthine afgenomen om de visproducten hun karakteristieke zalmroze kleur te geven. Dit is echter chemisch astaxanthine dat uit aardolieproducten wordt gemaakt. Het chemische astaxanthine bestaat uit een mengsel van astaxanthine en de synthese-bijproducten. Het hierin aanwezige astaxanthine bestaat uit een mengsel van cis-trans isomeren, waarvan op hun beurt weer verschillende enantiomeren bestaan. De verhouding waarbij deze enantiomeren in de natuur voorkomen in eetbare producten voor de mens (zalm, kreeft, garnalen), wijkt sterk af van het chemische astaxanthine en de herkomst van de astaxanthine is in deze producten goed te herleiden middels kolomchromatografie.

Op dit moment wordt de wereldwijde omzet in astaxanthine bevattende producten geschat op €200 – €250 miljoen en is er nog steeds sprake van een stijgende lijn. Doordat er steeds meer partijen in de markt stappen zoals Algalif (IJsland), Biolife (Oostenrijk), een aantal bedrijven in China, is er een duidelijke dalende trend van de prijs waarneembaar. Was een aantal jaren geleden de prijs ongeveer €10.000 /kg zuivere astaxanthine, bood Algalif onlangs partijen aan voor €6.500 /kg zuivere astaxanthine en zijn er zelfs gelegenhedaanbieders gesignaleerd die tot €4.500 /kg zuivere astaxanthine vroegen. De kostprijs ligt echter ergens boven de €4.000 /kg zuivere astaxanthine maar is in de praktijk waarschijnlijk nog wat hoger, waarbij is uitgegaan van het teeltregime zoals aangeven in Bleiswijk, maar waarbij een astaxanthine gehalte van 5% astaxanthine wordt gehaald op basis van droge stof.

Een marge van een factor 2 klinkt gunstig tussen kostprijs en productieprijs, maar gezien de zeer hoge investeringen voordat tot productie kan worden overgegaan en de dalende marktprijs die zorgen voor een onzeker toekomstperspectief, wordt het steeds minder aantrekkelijk om in deze business te stappen: de terugverdientijd wordt hierdoor (te) lang in een (te) onzekere markt.

Op dit moment worden een aantal astaxanthine bevattende producten op de markt aangeboden door een tiental grote spelers. Deze verkopen gedroogd biomassa-poeder met variërend astaxanthine gehalte en oleoresin die 2,5%, 5% en 10% astaxanthine bevatten. Uit contacten in de markt blijkt dat een oleoresin met 10% astaxanthine de huidige norm is. Extractie met scCO_2 wordt in de markt vereist om de astaxanthine het predicaat "natuurlijk" te laten houden. Dit laatste is een relatief duur proces: extractie met ethanol is een stuk makkelijker en goedkoper, maar wordt door de markt niet geaccepteerd omdat altijd spoortjes ethanol in het eindproduct aanwezig blijven. Dit doet (gevoelsmatig) afbreuk aan het gezondheid bevorderend aspect van het innemen van astaxanthine.

De ontwikkeling van nieuwe producten zou de markt kunnen vergroten, vooral als kleurstof in de voedings- en drankenindustrie. Nadeel is echter dat astaxanthine gewonnen wordt in de vorm van een olie en het economisch niet mogelijk is om deze als zuivere stof te winnen. De in het preparaat aanwezige olie beperkt de toepassingen en heeft ook een duidelijke bijmaak. Dit beperkt vooral de toepassingen in de drankindustrie.

Samenvattend neemt is er nog steeds sprake van een toenemende vraag, maar door de sterk toenemende productie is er nu sprake van een (sterk) dalende prijs op de markt. Het zoeken naar nieuwe toepassingen wordt beperkt door de formulering van astaxanthine en de apolaire eigenschappen van het astaxanthine molecuul.

6.3 Kostenanalyse productie

6.3.1 Economische kengetallen algenteeltsystemen in Bleiswijk

Om de kostprijs van algenproductie in Nederlandse kassen te berekenen is eerder een economisch model ontwikkeld waarin alle vaste en flexibele kosten zijn opgenomen (De Boer *et al.* 2015). Het eerder in De Boer *et al.* (2015) gepresenteerde model werd herzien en waar nodig aangepast. Als input voor de berekeningen werd de algenproductie zoals gerealiseerd in een kas in Bleiswijk in 2016-2018 (teeltduur, biomassa productie, astaxanthine productie) (zie Bijlage II), de vaste en de flexibele kosten van het algenproductie systeem (voor- en opkweek, kaskweek in fotobioreactoren), de vaste en flexibele kosten van de klimaatcel, de kas en de nodige inrichting genomen, alle vaste en flexibele kosten voor de downstream en de op eigen bedrijf nodige lab kosten. Er werd in alle berekeningen met een afschrijving over 10 jaar gerekend, een rente van 5% en een onderhoudspercentage van 4% op materiaalkosten.

6.3.1.1 Algenproductie in Bleiswijk

De algenproductie in de algenteeltsystemen in Bleiswijk werd in 2016-2018 in diverse teelten vastgesteld (Bijlage II, samenvatting zie **Tabel 7**). In de economische berekening werden een aantal scenario's (kengetallen zie Tabel 9) bekeken. Berekeningen van de kostprijs voor *Haematococcus pluvialis* biomassa, astaxanthine poeder en astaxanthine oleoresin werden uitgevoerd.

6.3.1.2 Vaste kosten algenproductiesysteem in Bleiswijk

De totale vaste kosten van een bioreactor (BR) inclusief installatie was €15.080. Een opdeling van de totale kosten van een bioreactor in verschillende onderdelen was niet bekend, maar werd geschat en weergegeven in Tabel 11. Elk BR bestaat uit 8 lagen van twee buizen á 10 m met een totale buislengte van 160m. De totale materiaalkosten werden geraamd op €11.600 en de installatiekosten werden aangenomen als 30% van de totale materiaalkosten, namelijk €3.480. De totale investeringskosten voor 6 bioreactoren waren €90.480 of €724 per m² teeltoppervlak. De afschrijvingskosten zijn €94 per m² teeltoppervlak per jaar.

Tabel 11

Vaste kosten van de bioreactoren en verschillende onderdelen voor een bioreactor in Bleiswijk.

Componenten bioreactor	Kosten (€)
Transparante buis per m	€ 35
Recirculatiepomp	€ 300
Fittings, kleppen, tank	€ 900
Leidingen	€ 600
Luchtpomp	€ 200
Sensoren	€ 2.000
Instrumentatie en regeling	€ 2.000

6.3.1.3 Vaste kosten voor kas en inrichting in Bleiswijk

De totale vaste kosten van het kas compartiment met een teeltoppervlak van 125 m² in Bleiswijk werd geschat op €13.938 of €112 per m². De kosten voor materiaal en bouw van een typische glazen Venlo-kas werd aangenomen (KWIN 2016-2017). De kas voorzien van verwarming, koeling (sprinklersysteem) en een scherminstallatie. Voor assimilatiebelichting waren daarnaast 16 SONT-T lampen (600 W, 75 W/m²) en 4 of 8 LED modules per reactor (190 W, 30 W/m² of 60 W/m²) in de kas geïnstalleerd. De kosten hiervoor waren €13.120. De vaste kosten voor alle kasonderdelen wordt weergegeven in Tabel 12. De totale vaste kosten kas en belichting waren €216 per m² teeltoppervlak. De afschrijvingskosten zijn €22 per m² teeltoppervlak per jaar.

Tabel 12

Vaste kosten kas en nodige inrichting in Bleiswijk (bron: KWIN 2016-2017).

Componenten kas	Kosten (€/m ²)
Kasconstructie en diffuus glas [€/m ²]	€ 45
Betonnen vloer [€/m ²]	€ 35
Verwarming [€/m ²]	€ 16
Klimaatcomputer [€/m ²]	€ 3,50
Scherf [€/m ²]	€ 8
Koeling c	€ 4,00
Belichting SON-T (75W/m ²) [€/m ²]	€ 45
Belichting LED (30 W/m ² of 60 W/m ²) [€/m ²]	€ 23 of € 46

6.3.1.4 Vaste kosten voor grond

De berekeningen zijn uitgevoerd met en zonder de kosten voor de grond waarop de kas staat. In het geval dat de grondkosten meegenomen zijn, werd met een 20% groter benodigd oppervlak gerekend en met kosten van €55 per m² in rekening gebracht.

6.3.1.5 Flexibele kosten voor algenteelt in Bleiswijk

De flexibele kosten voor de algenteelt in Bleiswijk werden berekend op basis van de prijzen parameters vermeld in Tabel 13. De gebruiksparemeters voor warmte, water, CO₂ en arbeid werden gemeten en omgerekend op jaarbasis. Het elektriciteitsverbruik van de lampen is aangenomen voor 16 SON-T á 600 W met gemiddeld 16 h belichting tijdens ca. 200 dagen per jaar (totaal 3.200 h per jaar) en voor 4*6 of 8*6 LED modules á 190 W bij gemiddeld 20 h belichten tijdens de stressfase van gemiddeld 30 dagen en 8 teelten per jaar (totaal 4.800 h per jaar). In Tabel 13 wordt een overzicht van de totale flexibele kosten voor de algenteelt in Bleiswijk gepresenteerd.

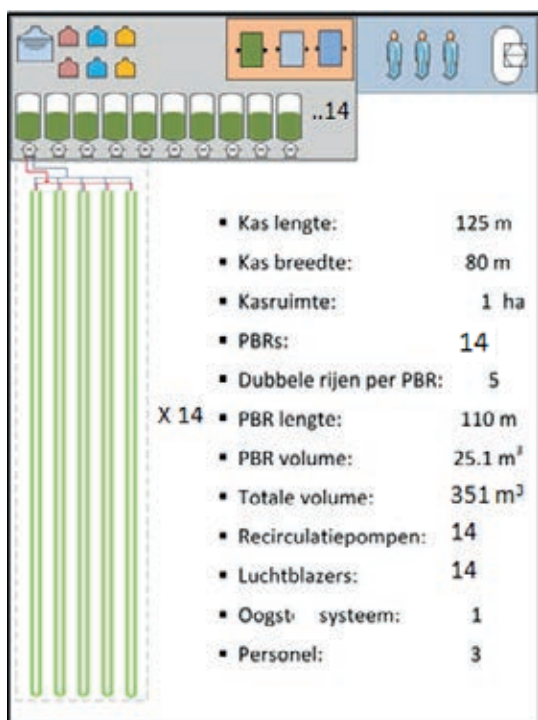
Tabel 13

Prijzen voor flexibele kosten arbeid, energie, CO₂, water en nutriënten en verbruik per m² in algenteelt Bleiswijk tijdens 1 jaar.

Kosten	Waarde
Arbeidskosten per uur [€/h]	€ 40,00
Prijs elektriciteit [€/kWh]	€ 0,05
Prijs gas [€/m ³]	€ 0,25
Prijs CO ₂ [€/kg]	€ 0,06
Prijs water [€/m ³]	€ 0,50
Prijs nutriënten en chemische middelen [€/kg]	€ 1,50
Arbeid benodigd [h/jaar]	1.500
Elektriciteitsverbruik pompen, kas [kWh/m ² /jaar]	201
Elektriciteitsverbruik lampen SON-T (75W/m ²) [kWh/m ² /jaar]	246
Elektriciteitsverbruik lampen LED (30 W/m ² of 60 W/m ²) [kWh/m ² /jaar]	175 of 350
Gasverbruik verwarming [m ³ /m ² /jaar]	26
CO ₂ verbruik [kg/m ² /jaar]	1,72
Water verbruik (teelt, reinigen, koelen) [m ³ /m ² /jaar]	1,56
Verbruik nutriënten en chemische middelen [m ³ /m ² /jaar]	0,47

6.3.2 Economische kengetallen commercieel algenteeltsystemen 1 ha

Om de kostprijs van de algenproductie te berekenen voor een grootschalige kas van 1 ha is de lay-out van de bioreactoren op het teeltoppervlak in de heroverwogen (Figuur 33). Voor een kas van 1 ha zijn 14 soortgelijke bioreactoren naast elkaar aangenomen, elk een volume van 2.51 m³ van algen cultuur. In totaal een installatie van 32,3 l/m² per m². Hiermee is een 77% efficiëntie van de benutting van het teeltoppervlak verondersteld.



Figuur 33 Lay-out van bioreactoren op een teeltoppervlak van 1 ha voor economische berekeningen van een grootschalige algen productie unit.

6.3.2.1 Vaste kosten algenproductie in kas op 1 ha

Voor een kas van 1 ha met 14 bioreactoren zijn de kosten per bioreactor €162.240 rekening houdend met relatief lagere kosten door schaalvoordelen. De totale vaste kosten voor het algenproductiesysteem voor 1 ha zijn €2.577.640 of €258 per m² teeltoppervlak, de afschrijvingskosten zijn €26 per jaar.

Voor een commerciële algenproductie zijn additionele componenten en apparaten nodig die in het huidige systeem in Bleiswijk niet werden gebruikt, zoals additionele pompen, een automatisch oogststelsel, additionele tanks etc. Daarnaast kosten voor opkweek en downstream. De kosten voor deze additionele componenten en apparaten zijn weergegeven in Tabel 14 en zijn in totaal €573,950 per ha of €57 per m², de afschrijvingskosten zijn €6 per jaar.

De kosten voor de kas zelf zijn vergelijkbaar met de kosten zoals onder 6.3.1.3 aangegeven voor de kas in Bleiswijk. De totale kosten voor 1 ha zijn €1.115.000 voor kas en inrichting en €928.400 voor de belichtingsinstallatie. De totale kosten per m² teeltoppervlak zijn €204, de afschrijvingskosten zijn €20 per jaar.

Tabel 14

Vaste kosten algenproductiesystemen en additionele componenten voor opkweek en downstream in een kas van 1 ha.

Componenten per bioreactor	Kosten per bioreactor (€)*
Transparante buis per m (voor 14 BR)	13
Recirculatiepomp	1.200
Fittings. kleppen. tank	1.800
Leidingen	900
Luchtpomp	1.500
Sensoren	3.000
Instrumentatie en regeling	2.000
Additionele componenten algenteeltsystemen	Kosten per bedrijf [€/ha]
Nutriënten doseerunit	22.000
Water desinfectie	55.000
Centrifuge Westfalia	133.000
Opslagtank oogst	17.600
Bead miller*	150.000
Sproeidroger	50.000
Verpakkingslijn*	20.000
Laboratorium*	150.000
Klimaatkamer opkweek*	53.900

* Volume 25,1 m³ per BR, 14 stuks op 1 ha

6.3.2.2 Flexibele kosten algenproductie in kas op 1 ha

De flexibele kosten voor een commercieel algenproductie systeem van 1 ha of groter werden berekend volgens de prijzen en verbruikskosten weergegeven in Tabel 13, rekening houdend met het groetere teeltoppervlak van 1 ha en de benuttingsefficiëntie van 77%.

Daarnaast is er rekening gehouden met de flexibele kosten voor de downstream. De eerste stap in de verwerking is het zeven of centrifugeren van de algensoep met als resultaat een algenpulp met ca. 30% biomassa. Deze wordt dan gevriesdroogd met als resultaat een gevriesdroogd algenpoeder. De kosten hiervoor zijn aangenomen met €0,20 per kg algenpulp. De kosten voor de aansluitende hexaan of ethanol extractie zijn aangenomen met €2 per kg drogestof. Alternatief zijn de kosten voor superkritische CO₂ extractie €30 per kg drogestof. De uiteindelijke kosten hangen af van de exact gekozen verwerkmethode.

6.4 Resultaten

6.4.1 Kengetallen algenproductie in Bleiswijk

Diverse teelten werden in de algenreactoren in Bleiswijk in 2016-2018 geproduceerd. Een overzicht van de resultaten wordt gegeven in Bijlage II en Tabel 7. Gebaseerd op alle gerealiseerde teeltresultaten werden de kengetallen van diverse scenario's geproduceerd en weergegeven in en Tabel 8, gebaseerd op het gemiddelde van alle teelten, van de 75% beste teelten, van de 50% beste teelten en van de 10 beste teelten.

6.4.2 Jaarlijkse kosten algenteelt

Een typische kostenverdeling voor een jaarrond *Haematococcus pluvialis* productie in de algenreactoren in Bleiswijk wordt aan hand van het realistische scenario (gemiddelde alle teelten) weergegeven in Tabel 15. De benutting van het teeltoppervlak van 125 m² in de kasafdeling in Bleiswijk is reaal 42%. Omdat het aannemelijk is dat op hetzelfde teeltoppervlak van 125 m² het dubbele aantal algenreactoren geïnstalleerd zou kunnen worden, wordt ook de situatie van een benutting van het teeltoppervlak met 83% geanalyseerd. De kostenverdeling van de eerste situatie (reëel 42%) is weergegeven in Tabel 15.

In dezelfde Tabel 15 wordt de typische kostenverdeling voor een jaarrond *Haematococcus pluvialis* productie in een grootschalig algenteeltsysteem op 1 ha weergegeven. Hiervoor zijn de kosten zoals gemaakt in Bleiswijk theoretisch opgeschaald naar 1 ha. Een kostenverdeling is ook weergegeven in

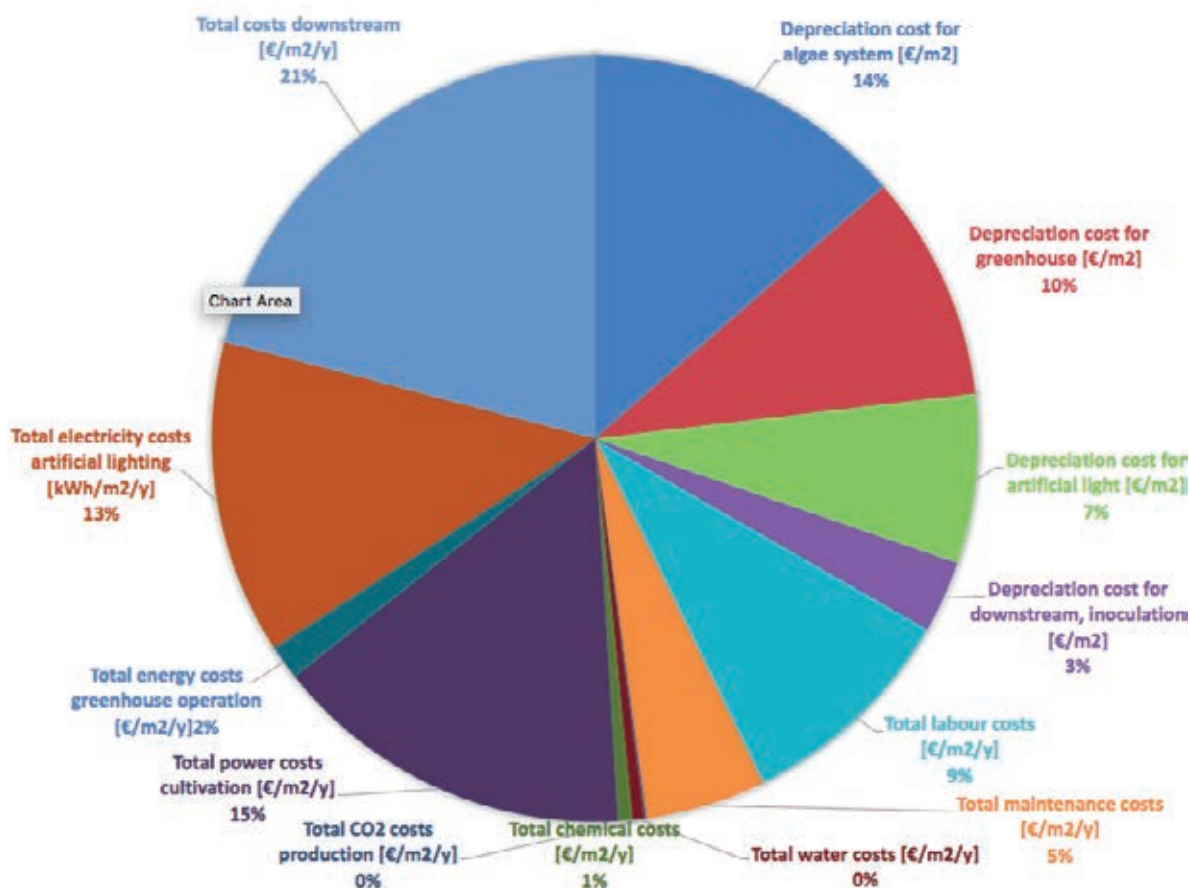
Het valt op dat de afschrijvingskosten algensysteem en kas samen, de elektriciteitskosten voor het algenteeltsysteem en voor de belichting tijdens de teelt en de kosten voor de downstream het grootste aandeel in de kosten uitmaken. Telen in afgeschreven kassen, efficiënter gebruik van de assimilatiebelichting en extractie met hexaan/ethanol in plaats van scCO₂ zouden potentiële kostenbesparingen opleveren. Uiteraard gaan de kosten per kg ds algen en per kg ds astaxanthine omlaag bij gelijktijdig hogere productie.

Tabel 15

Totale jaarlijkse kosten algenteelt in een 125 m² kas in Bleiswijk en in een commerciële kas van 1 ha, gebaseerd op de gemiddelde kengetallen van de productie van alle teelten zoals gerealiseerd in de kas in Bleiswijk in 2016-2018 (realistisch scenario).

	Kas 125 m ² in Bleiswijk		Kas 1 ha commercieel	
	Totaal [€]	Per m ² [€/m ²]	Totaal [€]	Per m ² [€/m ²]
Afschrijvingskosten				
Algenteeltsysteem	€ 11.718	€ 93,74	€ 257.764	€ 25,78
Kas, inrichting en grond	€ 2.258	€ 18,07	€ 180.800	€ 18,08
Belichting	€ 1.312	€ 10,50	€ 135.680	€ 13,57
Opkweek en downstream	-*	-*	€ 57.395	€ 5,74
Afschrijvingskosten totaal	€ 13.976	€ 111,81	€ 495.959	€ 49,60
Flexibele kosten				
Arbeid	€ 48.000	€ 384,00	€ 180.000	€ 18,00
Onderhoud	€ 2.784	€ 22,27	€ 96.268	€ 9,63
CO ₂	€ 13	€ 0,10	€ 1.654	€ 0,17
Water	€ 98	€ 0,78	€ 9.499	€ 0,95
Nutriënten en chemicaliën	€ 89	€ 0,71	€ 11.410	€ 1,14
Elektriciteit algensysteem	€ 1.083	€ 8,67	€ 289.792	€ 28,98
Elektriciteit kas	€ 358	€ 2,86	€ 28.600	€ 2,86
Elektriciteit belichting	€ 1.981	€ 15,85	€ 251.176	€ 25,12
Downstream (drogen, scCO ₂ extractie)			€ 396.964	€ 39,70
Flexibele kosten totaal	€ 54.405	€ 435,24	€ 1.265.363	€ 126,54
Jaarlijkse kostprijs [€/kg ds algen]		€ 678		€ 136
Jaarlijkse kostprijs [€/kg ds astaxanthine]		€ 34.168		€ 6.858
Jaarlijkse kostprijs [€/kg oleoresin]		€ 1.708		€ 343

* niet meegenomen



Figuur 34 Verdeling van de totale jaarlijkse kosten algenteelt in een commerciële kas van 1 ha gebaseerd op de gemiddelde kengetallen van de productie van alle teelten zoals gerealiseerd in de kas in Bleiswijk in 2016-2018 (realistisch scenario).

6.4.3 Kostprijs scenario's algenteelt

In Tabel 16 wordt de kostprijs van de algenproductie in het realistische scenario (gemiddelde kengetallen alle teelten) met minder belichting, dus minder installatiekosten en minder elektriciteitskosten berekend, met een teelt in afgeschreven kassen, dus geen kosten voor land en kas en met hexaan/ethanol extractie in plaats van scCO_2 . Scenario's worden afzonderlijk en in combinatie weergegeven. De combinatie van deze maatregelen reduceren de kostprijs om een derde.

In Tabel 17 wordt de kostprijs van de algenproductie voor verschillende productie scenario's weergegeven, gebaseerd op de kengetallen het gemiddelde van alle teelten, van de 75% beste teelten, van de 50% beste teelten en van de 10 beste teelten. De tabel geeft de kostprijs per kg ds *Haematococcus pluvialis*, per kg ds astaxanthine en per kg 5% astaxanthine in oleoresin.

Tabel 16

Totale jaarlijkse kosten algenteelt in een commerciële kas van 1 ha, gebaseerd op de gemiddelde kengetallen van de productie van alle teelten zoals gerealiseerd in de kas in Bleiswijk in 2016-2018 (realistisch scenario), met een teelt in een afgeschreven kas, een teelt met de helft van de LED belichting, met ethanol extractie en een combinatie van alle maatregelen.

Scenario's	Jaarlijkse kostprijs per teeltoppervlak [€/m ² /y]	Kostprijs per biomassa [€/kg ds algen]	Kostprijs per astaxanthine [€/kg ds astaxanthine]	Kostprijs per oleoresin [€/kg oleoresin]
Gemiddeld alle teelten	€ 176	€ 136	€ 6.858	€ 343
Teelt in afgeschreven kas	€ 158	€ 122	€ 6.154	€ 308
Teelt met helft LED belichting	€ 164	€ 126	€ 6.369	€ 318
Teelt met ethanol extractie	€ 140	€ 108	€ 5.447	€ 272
Combinatie van bovenstaande scenario's	€ 109	€ 84	€ 4.254	€ 213

Tabel 17

Totale jaarlijkse kosten algenteelt in een commerciële kas van 1 ha, gebaseerd op de gemiddelde kengetallen van de productie van alle teelten (realistisch scenario), de 75% beste teelten, de 50% beste teelten en de 10 beste teelten (optimistisch scenario) zoals gerealiseerd in de kas in Bleiswijk in 2016-2018.

Scenario's	Jaarlijkse kostprijs per teeltoppervlak [€/m ² /y]	Kostprijs per biomassa [€/kg ds algen]	Kostprijs per astaxanthine [€/kg ds astaxanthine]	Kostprijs per oleoresin [€/kg oleoresin]
Gemiddeld alle teelten	€ 176	€ 136	€ 6.858	€ 343
75% beste teelten	€ 178	€ 130	€ 5.958	€ 298
50% beste teelten	€ 179	€ 129	€ 5.338	€ 267
10 beste teelten	€ 181	€ 124	€ 4.442	€ 222

6.5 Conclusies markt en economie

- Huidige kostprijs voor gemiddelde van 10 beste teelten met hoogste astaxanthine productie is ca. €222 per kg oleoresin (met 5% astaxanthine), of €4.442 per kg ds astaxanthine (optimistisch scenario), of €343 per kg oleoresin (met 5% astaxanthine), of €6.858 per kg ds astaxanthine ook rekening houdend met alle niet gelukte teelten en alle bijhorende kosten (realistisch scenario).
- In het marktonderzoek is vastgesteld dat oleoresin met 5% astaxanthine voor ca. €600 op de markt wordt verkocht en astaxanthine met €6.500-10.000.

7 Opschaling (WP5)

In de praktijk wordt *Haematococcus* gekweekt in open vijvers, of in een gesloten systeem (groene fase) gevolgd door een open systeem (rode fase), of in een gebouw volledig in PBR's (met belichting) (Algalif). Afhankelijk van de plaatselijke omstandigheden zoals de hoeveelheid beschikbaar licht, klimaat en energiekosten werd gekozen voor het economisch het meest aantrekkelijke model.

In dit project is ervan uitgegaan om *Haematococcus* in op grote schaal in buizenreactoren (photobioreactors = PBR's) in tuinderskassen te gaan cultiveren. Toch is het belangrijk om vooraf te onderzoeken of het logisch is om astaxanthine op deze manier te gaan produceren.

De investeringen om een tuinderskas te gebruiken (grond en opstanden) zijn hoog. *Haematococcus* is niet bestand tegen hoge temperaturen ($>25^{\circ}\text{C}$), welke op een zomerdag in een kas snel bereikt kunnen worden en kunnen leiden tot productieverliezen. Ook te lage temperaturen geven productieverliezen, maar kunnen worden ondervangen door verwarming met de bijhorende kosten. Een nauwkeurige controle van de hoeveelheid licht op de PBR's is noodzakelijk: in de groene fase zal een grote oppervlakte overdag moeten worden geschermd om overbelichting te voorkomen en in de nacht worden bijbelicht voor een snellere groei, terwijl in de rode fase vaak bijbelicht moet worden.

In Oostenrijk heeft Biolife Science besloten om de astaxanthine productie uit te gaan voeren in van binnenuit belichte stalen reactoren voor een grote beheersbaarheid van het productieproces en de daarmee samenhangende hoge reproduceerbaarheid van een product met gelijke kwaliteit van de biomassa. Het is nog onduidelijk of het ook onder kasomstandigheden altijd mogelijk is om de door de afnemer vereiste reproduceerbaarheid te halen. De eisen kunnen namelijk verschillen per productcategorie. Laten we niettemin uitgaan van de originele insteek, namelijk de buizen fotobioreactor zoals deze gebruikt is in dit project.

Bij de inrichting van een *Haematococcus* productie bedrijf kan globaal worden uitgegaan van de volgende indeling:

1. Een bedrijfsintern laboratorium met de meest elementaire voorzieningen om de dagelijkse (infectie) controles te doen en de voorkweken te bereiden. Er kunnen hier ook eindproduct-analyses plaatsvinden om het astaxanthine gehalte te meten of andere door de klant gewenste eigenschappen. Het is aan te raden om de meer geavanceerde analyses uit te besteden aan een analyselaboratorium.
2. De tuinbouwkas die voorzien is van klimaatbeheersing (verwarming, koeling) en lichtcontrole (schermen, belichting) van voldoende omvang. Het is belangrijk om de omvang te berekenen op basis van de target producties zoals genoemd in het bedrijfsplan bij volledige productie. Begin met een beperkt aantal PBR's en breidt deze uit naarmate de klandizie of de afzet toeneemt. Afhankelijk van de beoogde productie zal deze investering al gauw enige miljoenen bedragen, zie Hoofdstuk 6.
3. Een opwerkingsruimte waar de biomassa wordt verwerkt tot een eindproduct of halffabricaat. Nagenoeg alle *Haematococcus* producerende bedrijven verwerken de biomassa tot oleoresin met verschillende gehalten astaxanthine of gesproeidroogde poeders. Een enkel productiebedrijf verwerkt de oleoresin in capsules die aan de groothandel wordt aangeboden. Zoals eerder is aangegeven wordt aan de opwerking speciale eisen gesteld. Het scheiden van de biomassa van het medium kan plaatsvinden m.b.v. centrifugatie of filtratie en is niet zo kostbaar, het drogen van de biomassa middels sproeidrogen is ook nog te overkomen, maar de bereiding van de oleoresin vraagt al een investering voor een kogelmolen om de biomassa te ontsluiten en van €600.000 - €800.000 voor de aanschaf van de apparatuur die nodig is voor scCO_2 -extractie.
4. Opslagruimte waar de producten of halffabricaten gekoeld kunnen worden opgeslagen. Dit moeten vooral gekoelde ruimten zijn.

Na uitvoerige discussie vonden de in het project betrokken ondernemers het lastig om een zekere businesscase te maken voor de productie van natuurlijke astaxanthine in Nederlandse kassen. Dit wordt bepaald door een onzekere markt en onzekere prijzen voor het eindproduct, resterende onzekerheden in het productieproces en onbekendheid met een nieuwe markt.

Literatuur

Coral-Hinostroza GN *et al.* (2004).

Plasma appearance of unesterified astaxanthin geometrical E/Z and optical R/S isomers in men given single doses of a mixture of optical 3 and 3'R/S isomers of astaxanthin fatty acyl diesters. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 139: 99-110.

De Boer, Lex, Jelle van den Bos, Frans Bunnik, Sander Hazewinkel, Silke Hemming, René van Hoorn, Cees van der Lans, Jacob Limbeek, Laura Olthof, Eugene Roebroek, Jim van Ruijven, Marta Streminska, Joost van de Ven, Gerrit Vermeer, Wim Voogt, Wilko Wisse (2015).

Duurzame astaxanthine productie uit algen in de tuinbouw. Report Wageningen UR Glastuinbouw GTB-5096.

Evens, T.J., Niedz, R.P. and Kirkpatrick, G.J. (2008).

Temperature and irradiance impacts on the growth, pigmentation and photosystem II quantum yields of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J Appl Phycol* 20:411-422.

Fábregas, J., Otero, A., Maseda, A., Domínguez, A. 2001.

Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *J.Biotechnol.* 89 (1): 65-71.

Fuji (2009).

Spectrophotometric and HPLC analysis method for determining astaxanthin content in AstaREAL® L10. Fuji Chemical Industry Co., Ltd. May19, 2009.

Gómez, Patricia I., *et al.* (2013).

From genetic improvement to commercial-scale mass culture of a Chilean strain of the green microalga *Haematococcus pluvialis* with enhanced productivity of the red ketocarotenoid astaxanthin. *AoB Plants* 5.

Grung M., D'Souza F. M., Borowitzka M., Liaaen-Jensen S. 1992.

Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. *Journal of Applied Phycology*, 4(2): 165-171.

Gutman J., Zarka A. Boussiba S., 2009.

The host-range of *Paraphysoderma sedebokerensis*, a chytrid that infects *Haematococcus pluvialis*. *Eur J. Phycol* 44: 509-514

Kang, C.D., Lee, J.S., Park, T.H., Sim, S.J. (2010).

Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:987-994.

Kumar Saha S., McHugh E., Hayes J., Moane S., Walsh D., Murray P. 2013.

Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*, *Bioresource Technology* 128: 118-124.

KWIN 2016-2017.

Kwantitatieve informatie Nederlandse glastuinbouw. Wageningen University & Research.

Li J, Zhu D, Niu J, Shen S, Wang G (2011).

An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotech Adv* 29: 568-574.

Lockwood SF and Gross GJ (2005).

Disodium Disuccinate Astaxanthin (Cardax™): Antioxidant and Antiinflammatory Cardioprotection. *Cardiovasc Drug Rev* 23: 199-216.

Mendes-Pinto MM, Raposo MFJ, Bowen J, Young AJ, Morais R (2001).

Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *J Appl Phycol* 13: 19-24.

Nichols H.W., Bold H.C. 1969.

Trichsarcina polyinorpha gene. et sp. *Eur. J. Phycol.* 1, 34-38.

Park, J.C., Choi, S.P., Hong, M.-E., Sim, S.J. (2014).

Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. *Bioprocess Biosyst Eng* 37:2039-2047.

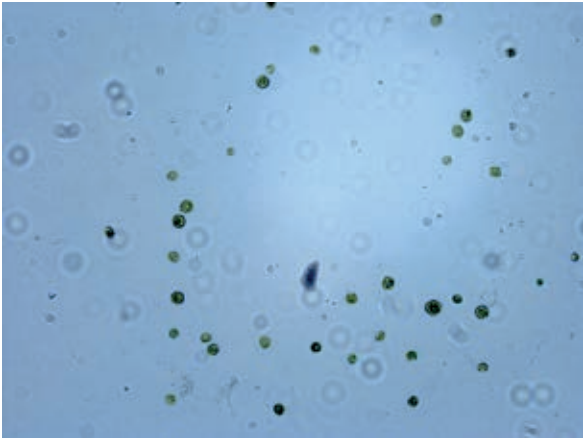
Sarada R., Vidhyavathi R., Usha D., Ravishankar G. A. 2006.

An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20): 7585-7588.

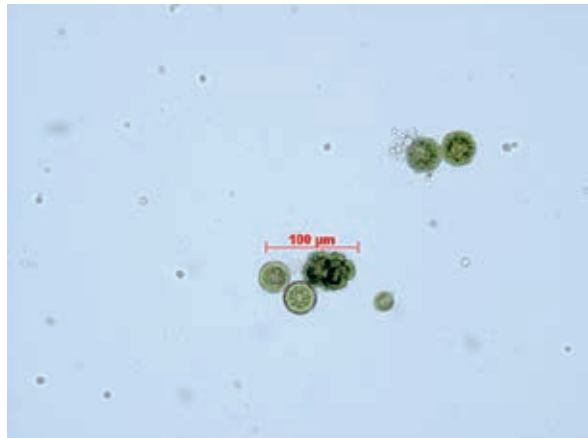
- Scibilia, L., Girolomoni, L., Berteotti, S., Alboresi, A., Ballottari, M. (2015).
Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research* 12:170-181.
- Shah MR, Liang Y, Cheng JJ, Daroch M (2016).
Astaxanthin-producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Front Plant Sci* 7: 1-28.
- Solovchenko AE (2015).
Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell. *Photosynth Res* 125: 437-449.
- Stijger I., Van Os E., Van Marrewijk D., Klein M. 2014.
Onderzoek naar de effectiviteit van ontsmettingsapparatuur en –middelen. Rapport Wageningen UR Glastuinbouw GTB 1316.
- Van Ruijven J., Beerling E., Van Os E., Van der Staaij M. 2015.
Evaluatie zuiveringstechniek voor verwijdering gewasbeschermingsmiddelen II. Rapport Wageningen UR Glastuinbouw GTB-1334.
- Wang J., Han D., Sommerfeld R., Lu C., Hu Q., 2012.
Effect of initial biomass density on growth and astaxanthine production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* (2013) 25: 253–260.
- William H., Thomas, Carl H., Gibson 1990.
Effects of small-scale turbulence on microalgae. Scripps Institution of Oceanography, Applied Mechanics and Engineering Sciences Department University of California, San Diego, CA 92093, USA.
- Xi, T., Kim, D.G., Roh, S.W., Choi, J.-S., Choi, Y.-E. (2016).
Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology* 11(14): 6231-6238.
- Yuan J-P, Chen F (1999).
Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *J Agric Food Chem* 47: 31-35.

Bijlage 1 Ontwikkelingsstadia *Haematococcus pluvialis*

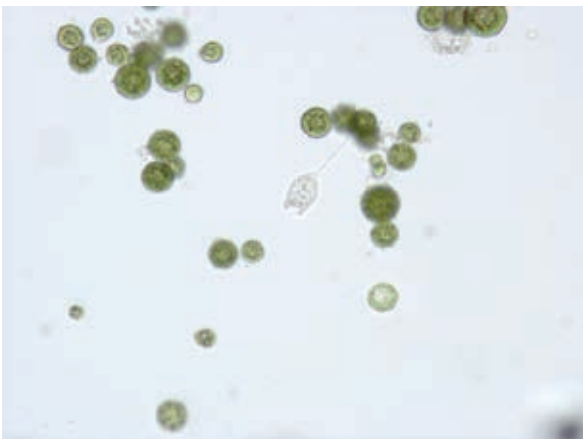
Beelden gemaakt met een binoculair met een vergroting van 75 – 600 van ontwikkelingsstadia tijdens een teeltcyclus en optredende besmettingen.



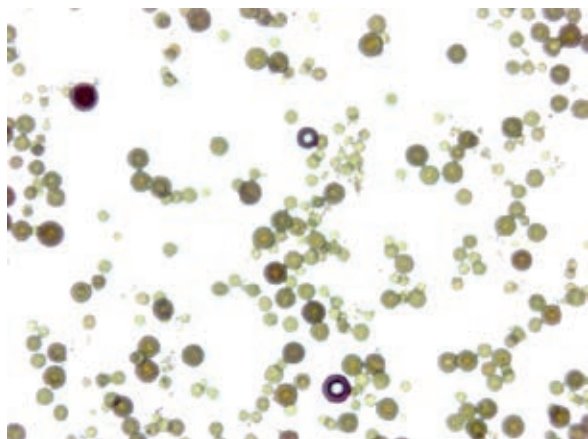
Dag 5 Alleen zweemcellen (75 x).



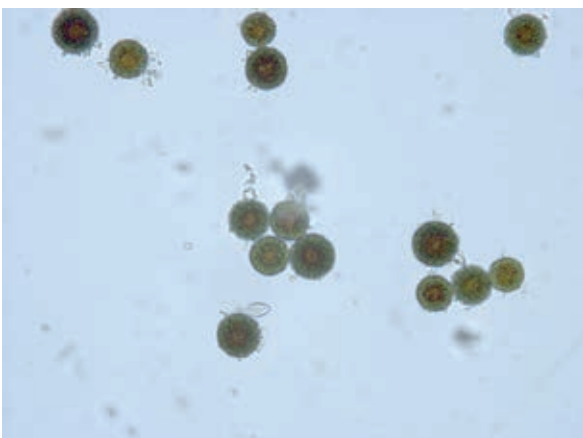
Dag 5 Uitvergroot (600 x).



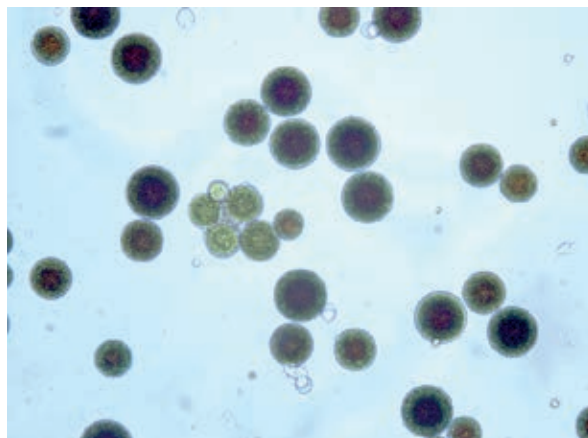
Dag 8 Zwemcellen (125 x).



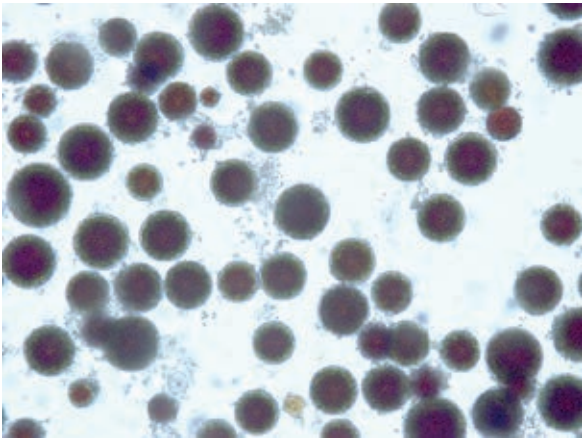
Dag 11 Zwemcellen en palmella's; begin van astaxanthine vorming (75 x).



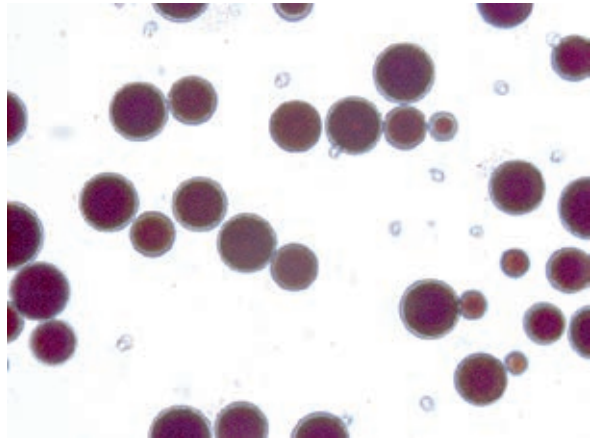
Dag 14 Palmella's met oranje kernen (125 x).



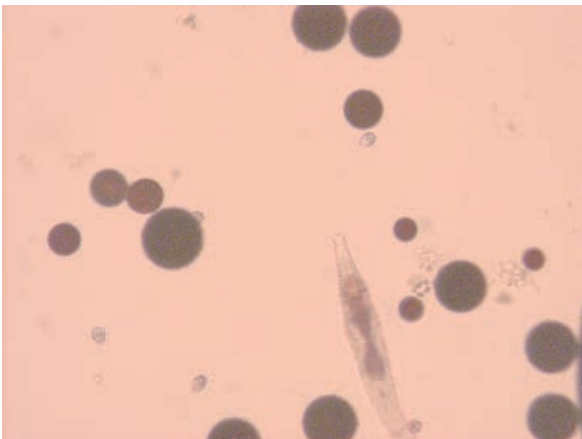
Dag 16 Palmella's met grotere rode kernen (125 x).



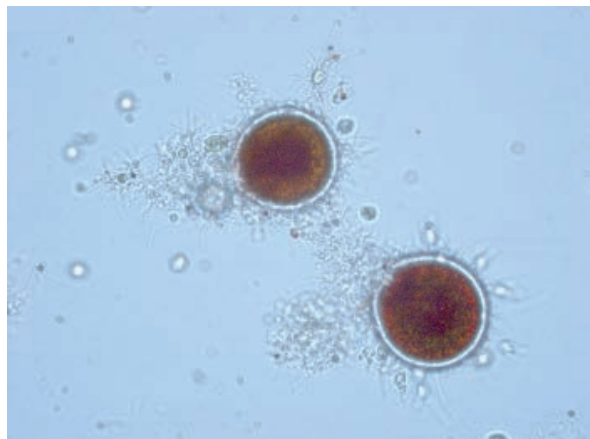
Dag 21 Palmella's met volledig rode kernen (125 x).



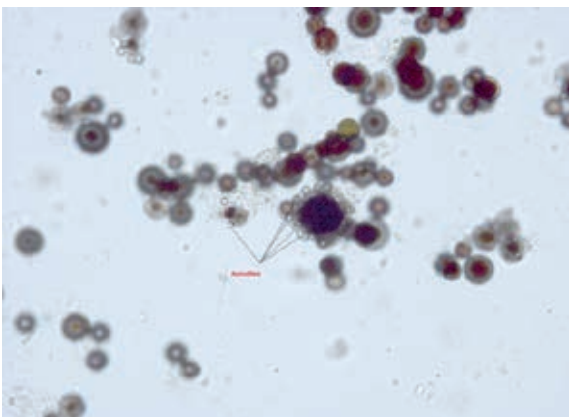
Dag 31 Volledig doorgekleurde palmella's (125 x).



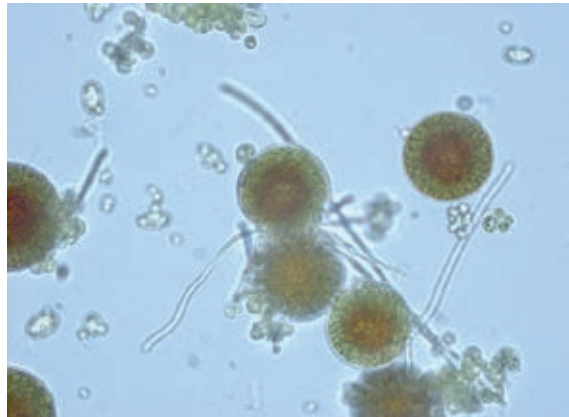
Eencellig organisme temidden van palmella's (125 x).



Uiteenvallen van palmella's met parasiterende eencelligen (600 x).



Palmella's met 'aanvallende' organismen (75 x).



Palmella's met schimmeldraden (600 x).

Bijlage 2 Teeltresultaten *Haematococcus pluvialis*

Bio-reactor	Teelt nr.	Start teelt datum	Einde teelt datum	Groene fase				Rode fase							
				Teeltduur totaal d	Teeltduur d	Dichtheid g/l	Biomassa productie g/m²	Groei snelheid g/m²/d	Teeltduur d	Dichtheid g/l	Biomassa productie g/m²	Groei snelheid g/m²/d	Astaxan-thine gehalte %	Astaxan-thine productie g/m²	Astaxan-thine productie snelheid mg/m²/d
4	6	7/12/16	1/2/17	56	14	0,9	17,2	1,2	42	5,9	118,2	2,8	3,8	4,5	106,9
1	2	11/3/16	13/4/16	33	6	0,4	7,1	1,2	27	5,8	117,2	4,3	3,7	4,3	160,5
1	6	28/11/16	18/1/17	51	11	0,6	12,5	1,1	40	3,9	78,4	2,0	3,7	2,9	72,5
3	2	18/3/16	17/4/16	30	6	0,2	4,0	0,7	24	6,6	133,3	5,6	3,3	4,4	183,2
2	1	29/1/16	7/3/16	38	7	0,9	18,2	2,6	31	6,4	129,3	4,2	3,3	4,3	137,6
4	2	18/3/16	21/4/16	34	6	0,2	4,0	0,7	28	6,2	125,2	4,5	3,3	4,1	147,5
3	6	7/12/16	31/1/17	55	13	0,9	17,2	1,3	42	5,0	102,0	2,4	3,2	3,3	77,7
4	10	29/8/17	8/10/17	40	9	1,0	19,8	2,2	31	3,2	64,5	2,1	3,2	2,1	66,6
2	6	28/11/16	17/1/17	50	15	1,0	21,2	1,4	35	3,6	72,3	2,1	3,1	2,2	64,0
1	3	28/4/16	5/6/16	38	6	0,6	12,1	2,0	32	8,0	161,6	5,1	3,0	4,8	151,4
3	1	5/2/16	12/3/16	36	10	1,2	24,2	2,4	26	7,8	157,6	6,1	3,0	4,7	181,7
5	5	30/9/16	1/12/16	62	17	0,2	4,0	0,2	45	4,5	90,9	2,0	3,0	2,7	60,6
1	1	2/2/16	8/3/16	35	4	0,8	16,2	4,0	31	5,8	117,2	3,8	2,9	3,4	109,6
5	4	8/6/16	16/7/16	38	9	0,5	10,1	1,1	29	4,0	80,8	2,8	2,9	2,3	80,8
2	8	23/5/17	21/6/17	29	6	0,6	11,2	1,9	23	3,3	65,9	2,9	2,9	1,9	83,0
3	9	4/7/17	7/8/17	34	7	0,0	0,0	0,0	27	3,0	61,3	2,3	2,9	1,8	65,8
2	3	28/4/16	30/5/16	32	4	0,3	7,1	1,8	28	6,0	121,2	4,3	2,8	3,4	121,2
4	8	28/4/17	8/6/17	41	7	0,6	12,6	1,8	34	6,0	120,6	3,5	2,8	3,4	99,3
1	8	23/5/17	29/6/17	37	7	0,4	8,8	1,3	30	4,9	99,0	3,3	2,8	2,8	92,3

Bio- reactor	Teelt nr.	Start teelt datum	Einde teelt datum	Groene fase				Rode fase							
				Teeltduur totaal	Teeltduur d	Dichtheid g/l	Biomassa productie g/m²	Groei snelheid g/m²/d	Teeltduur d	Dichtheid g/l	Biomassa productie g/m²	Groei snelheid g/m²/d	Astaxan- thine gehalte %	Astaxan- thine productie g/m²	Astaxan- thine productie mg/m²/d
6	4	8/6/16	16/7/16	38	9	0,5	10,1	1,1	29	3,6	72,7	2,5	2,8	2,0	70,2
4	5	30/9/16	23/11/16	54	13	1,0	20,2	1,6	41	6,0	121,2	3,0	2,7	3,3	79,8
5	2	24/3/16	15/4/16	22	8	0,6	12,1	1,5	14	3,0	60,6	4,3	2,7	1,6	116,8
1	7	3/3/17	9/4/17	37	13	0,2	3,8	0,3	24	6,9	140,2	5,8	2,6	3,6	151,8
6	5	30/9/16	27/11/16	58	17	0,4	8,1	0,5	41	4,5	90,9	2,2	2,6	2,4	57,6
1	9	14/7/17	21/8/17	38	6	0,8	15,8	2,6	32	4,3	87,2	2,7	2,6	2,3	70,8
5	10	29/8/17	30/9/17	32	9	3,7	74,1	8,2	23	3,4	67,8	2,9	2,6	1,8	76,6
6	10	29/8/17	30/9/17	32	9	1,5	30,1	3,3	23	2,8	56,1	2,4	2,5	1,4	60,9
5	8	1/6/17	14/7/17	43	11	0,3	6,3	0,6	32	3,7	74,5	2,3	2,4	1,8	55,9
3	11	7/12/17	11/1/18	35	4	0,4	8,7	2,2	31	3,7	74,0	2,4	2,4	1,8	57,2
1	10	6/10/17	22/11/17	47	6	0,5	10,6	1,8	41	3,3	65,7	1,6	2,4	1,6	38,5
2	10	6/10/17	15/11/17	40	6	0,5	10,8	1,8	34	2,9	57,9	1,7	2,4	1,4	40,9
3	3	28/4/16	17/6/16	50	8	1,1	23,0	2,9	42	8,0	161,6	3,8	2,3	3,7	88,5
4	1	5/2/16	20/3/16	44	10	0,4	8,1	0,8	34	7,4	149,5	4,4	2,3	3,4	101,1
2	2	11/3/16	17/4/16	37	6	0,4	7,1	1,2	31	7,2	145,4	4,7	2,3	3,3	107,9
6	11	3/11/17	23/12/17	50	7	0,4	8,2	1,2	50	4,4	88,7	1,8	2,3	2,0	40,8
6	2	24/3/16	19/4/16	26	8	0,6	12,1	1,5	18	3,6	72,7	4,0	2,3	1,7	92,9
4	11	7/12/17	13/1/18	37	8	0,4	7,2	0,9	29	3,1	62,9	2,2	2,3	1,4	49,8
6	7	3/4/17	25/5/17	52	17	2,5	49,5	2,9	35	4,9	99,3	2,8	2,2	2,2	62,4
5	7	3/4/17	21/5/17	48	17	3,3	65,9	3,9	31	4,0	80,8	2,6	2,2	1,8	57,3
5	6	19/12/16	2/2/17	45	11	0,8	15,4	1,4	34	2,9	59,6	1,8	2,2	1,3	38,5
6	8	1/6/17	29/6/17	28	7	0,6	11,7	1,7	21	2,2	44,3	2,1	2,1	0,9	44,3

Bio-reactor	Teelt nr.	Start teelt datum	Einde teelt datum	Groene fase				Rode fase							
				Teeltduur totaal d	Teeltduur d	Dichtheid g/l	Biomassa productie g/m²	Groei snelheid g/m³/d	Teeltduur d	Dichtheid g/l	Biomassa productie g/m²	Groei snelheid g/m²/d	Astaxan-thine gehalte %	Astaxan-thine productie g/m²	Astaxan-thine productie mg/m²/d
1	11	5/1/18	22/2/18	48	10	0,9	17,6	1,8	38	4,1	83,5	2,2	2,1	1,7	45,0
5	11	3/11/17	22/11/17	19	6	0,5	9,1	1,5	13	2,4	48,8	3,8	2,0	1,0	75,1
3	5	9/9/16	21/10/16	42	7	0,2	4,0	0,6	35	3,5	70,7	2,0	1,9	1,3	38,4
3	8	28/4/17	27/5/17	29	7	0,6	12,7	1,8	22	2,8	55,6	2,5	1,9	1,1	48,0
5	12	12/2/18	10/3/18	26	11	1,1	21,7	2,0	15	4,3	87,1	5,8	1,8	1,6	104,4
6	1	12/2/16	22/3/16	39	12	0,8	16,2	1,3	27	3,6	72,7	2,7	1,8	1,3	48,5
6	6	19/12/16	6/2/17	49	18	1,4	27,9	1,5	31	4,9	99,3	3,2	1,7	1,7	54,4
2	5	8/9/16	20/10/16	42	14	0,2	4,0	0,3	28	3,5	70,7	2,5	1,7	1,2	42,9
2	9	14/7/17	23/8/17	40	6	0,8	15,4	2,6	34	3,4	68,1	2,0	1,6	1,1	32,0
4	4	8/6/16	6/7/16	28	9	1,2	24,2	2,7	19	4,0	80,8	4,3	1,5	1,2	63,8
2	11	5/1/18	12/2/18	38	10	0,8	16,2	1,6	28	2,3	46,9	1,7	1,5	0,7	25,1
3	10	29/8/17	1/10/17	33	13	1,2	24,3	1,9	20	2,3	47,4	2,4	1,3	0,6	30,8
5	1	12/2/16	24/2/16	12	12	1,2	24,2	2,0	0	2,2	44,4	0,0	0,8	0,3	0,0
1	5	8/9/16	17/10/16	39	14	1,6	32,3	2,3	25	2,0	40,4	1,6	0,5	0,2	8,4
4	9	4/7/17	27/7/17	23	7	0,0	0,0	0,0	16	2,6	52,8	3,3	0,5	0,3	15,8
2	7	3/3/17	20/3/17	17	17	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	7	17/3/17	30/3/17	13	6	0,0	0,0	0,0	7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	7	17/3/17	28/3/17	11	5	0,0	0,0	0,0	6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

To explore
the potential
of nature to
improve the
quality of life



Wageningen University & Research,
BU Glastuinbouw
Postbus 20
2665 ZG Bleiswijk
Violierenweg 1
2665 MV Bleiswijk
T +31 (0)317 48 56 06
F +31 (0) 10 522 51 93
www.wur.nl/glastuinbouw

Rapport WPR-808

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.