



Technische Universität München

Fakultät für Chemie

Werner-Siemens-Lehrstuhl für Synthetische Biotechnologie

NUTZUNG VON ALGENRESTMASSE ZUR ERZEUGUNG VON BIOGAS

Timm Adamietz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation

Vorsitzender		apl. Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich
Prüfer der Dissertation	1.	Prof. Dr. Thomas Brück
	2.	Prof. Dr. Tom Nilges

Die Dissertation wurde am 27.04.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 19.05.2020 angenommen.

I. Abstract

In this current thesis, the biogas process design, yields and chemical composition using biomass of the green microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* as the sole substrate were experimentally investigated. The biogas processes were examined in batch and continuous modes, while the best performance processes in terms of techno-economic parameters were determined.

In a batch setting fresh and dried biomass of the freshwater algae *Chlorella vulgaris* was sequentially fermented to yield raw biogas. The *Chlorella* biogas production provided 537.9 l_N kg⁻¹ VS and 443.6 l_N kg⁻¹ VS for dried and fresh algae biomass respectively, while the corn silage standard generated 650 l_N kg⁻¹ VS [1].

In a continuous fermentation setting, the *Chlorella vulgaris* biomass addition was continuously increased. The fermentation process was stable, even though the efficiency of gas production decreased with increasing organic load rate (OLR). At an OLR of 1 kg VS m⁻³ d⁻¹ the specific average daily gas production was 507 l_N kg⁻¹ VS, whereas at an OLR of 3 kg VS m⁻³ d⁻¹ the specific average daily gas production was only 340 l_N kg⁻¹ VS.

To evaluate the influence of the salt load on the biogas production, batch experiments with oil-extracted biomass of the brackish water algae *Scenedesmus obliquus* were carried out. Up to a salt content of 5 % (w NaCl/v) in the algae suspension no effect on the gas yield could be determined, the gas yield was about 335 l_N kg⁻¹ VS. Only at a salinity of 10 % (w NaCl/v) in the algae suspension the gas yield was reduced to merely 315 l_N kg⁻¹ VS. At a set salinity of 3 % (w NaCl/v) on the total mixture, gas production stopped almost completely (30.7 l_N kg⁻¹ VS). The methane content decreased with increasing salinity from 61.5 % (v/v) to 59.4 % (v/v) at 10 % (w NaCl/v) salinity. In the approach with 3 % (w NaCl/v) salt related to the total approach, the methane content was only 21.6 % (v/v).

Likewise to consider the effects of an increasing salt content on the gas yield, the mono-fermentation of *Scenedesmus obliquus* was tested in a continuous flow-through experiment. The OLR was increased from initially 1 kg VS m⁻³ d⁻¹ to finally 1.5 kg VS m⁻³ d⁻¹, the salinity of the algae suspension was increased in several steps from 5 % w/w to 20 % w/w. From a salinity of 10 % w/w on, the gas yield decreased at the same OLR. An increase of the OLR resulted in slightly more gas, but the specific gas production (related to the weighed algae mass) decreased, i.e. the substrate was degraded less.

II. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gas- und Methanerträge der Mikroalgen *Chlorella vulgaris* und *Scenedesmus obliquus* im Rahmen von Satzprozessen und halb-kontinuierlichen Versuchen im Vergleich experimentell untersucht.

In einem Satzprozess mit *Chlorella vulgaris* wurde die Süßwasseralge in getrockneter und frischer Form vergoren. Dabei erzielte sie bezogen auf Normliter mit 537,9 l_N/kg oTS (getrocknete Algenmasse) bzw. 443,6 l_N/kg oTS (frische Algenmasse) beachtliche Methanausbeuten im Vergleich zu Mais (650 l_N/kg oTS [1]).

In einem kontinuierlichen Durchflussversuch mit *Chlorella vulgaris* wurde die Zugabe von *Chlorella*-Biomasse gleichmäßig gesteigert. Der Gärprozess verlief dabei stabil, auch wenn sich mit steigender Raumbelastung eine abnehmende Gasproduktionseffizienz zeigte. So betrug bei einer Raumbelastung von 1 kg oTS/(m³*d) die spezifische durchschnittliche tägliche Gasproduktion 507 l_N/kg oTS, während bei einer Raumbelastung von 3 kg oTS/(m³*d) die spezifische durchschnittliche tägliche Gasproduktion lediglich 340 l_N/kg oTS betrug.

Zur Evaluation des Einflusses der Salzfracht auf die Biogasproduktion wurden Satzprozesse mit ölextrahierter Biomasse der Salzwasseralge *Scenedesmus obliquus* durchgeführt. Bis zu einem Salzgehalt von 5 % (w NaCl/v) in der Algensuspension konnte kein Effekt auf den Gasertrag festgestellt werden, der Gasertrag lag bei rund 335 l_N/kg oTS. Erst ab einem Salzgehalt von 10 % (w NaCl/v) der Algensuspension war der Gasertrag geringer, bei nur 315 l_N/kg oTS. Bei einem eingestellten Salzgehalt von 3 % (w NaCl/v) auf den Gesamtansatz stoppte die Gasproduktion fast vollständig (30,7 l_N/kg oTS). Der Methangehalt sank mit steigendem Salzgehalt von 61,5 % (v/v) auf 59,4 % (v/v) bei 10 % (w NaCl/v) Salzgehalt. Im Ansatz mit 3 % w/w Salz bezogen auf den Gesamtansatz lag der Methangehalt nur noch bei 21,6 % (v/v).

Ebenso zur Betrachtung der Auswirkungen eines steigenden Salzgehaltes auf die Gasausbeute wurde im Rahmen eines kontinuierlichen Durchflussversuches die Monovergärung von *Scenedesmus obliquus* getestet. Die Raumbelastung wurde von anfänglich 1 kg oTS/(m³*d) auf zuletzt 1,5 kg oTS/(m³*d) gesteigert, der Salzgehalt der Algensuspension in mehreren Schritten von 5 % w/w auf 20 % w/w erhöht. Ab einem Salzgehalt von 10 % (w NaCl/v) ging der Gasertrag bei gleichbleibender Raumbelastung zurück. Eine Erhöhung der Raumbelastung brachte zwar etwas mehr Gas, die spezifische Gasproduktion (bezogen auf die eingewogene Algenmasse) ging jedoch zurück, d.h. das Substrat wurde insgesamt schlechter abgebaut.

III. Danksagung

An erster Stelle und besonders herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Brück bedanken. Ohne Dich, Thomas, hätte es dieses spannende Projekt AFK nicht gegeben. Ich bedanke mich bei Dir außerordentlich dafür, dass Du darauf vertraut hast, dass wir als KMU (conys GmbH) und ich in persona mit dieser daraus entstandenen Dissertation die Ziele des AFK-Projektes mit ins Ziel bringen konnten.

Ich bedanke mich weiter sehr herzlich bei meinem Mitautor Wojciech Jurkowski, der mit seiner Biogas-Expertise, aber auch mit seinem fundierten Grundlagenwissen entscheidend zum Gelingen der Publikationen beigetragen hat.

Wiederum ein besonderes herzliches Dankeschön gilt meinem langjährigen Wegbegleiter und Drittautor Dr. Jan Adolph, der das Projekt AFK von Anfang an begleitet hat und für die entsprechende praxisnahe und wissenschaftliche Tiefe gesorgt hat.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Daniel Garbe für ein hervorragendes Projektmanagement im Projekt AFK und der damit verbunden organisatorischen und auch fachlichen Unterstützung.

Ferner möchte ich mich herzlich bei Dr. Farah Qoura für die administrative Unterstützung bedanken.

Außer der Reihe möchte ich hier meinem „Mentor im Stillen“ Prof. Dr. Arnulf Melzer danken. Ohne Dich, lieber Arnulf, hätte ich wohl nicht den Ehrgeiz entwickelt, diese Dissertation zu beenden (im Übrigen hattest schon mal in den 1990ern entscheidend beigetragen, dass ich mein Vordiplom an der TUM ins Ziel gebracht habe!)

Ein weiteres herzliches Dankeschön gebührt an dieser Stelle Dr. Jan Lorenzen. Jan: besten Dank für die Unterstützung im Umstrukturieren, Redigieren und Formatieren bei dieser Arbeit!

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei meinem Geschäftspartner Peter Braun, dass wir diesen gemeinsamen Weg als KMU gehen konnten, sowie, dass Du mir - trotz unserem operativen Geschäft - die Zeit gegeben hast, diese Arbeit ins Ziel zu bringen.

Der größte und allerherzlichste Dank geht aber an meine Familie! Ungefragt haben meine Eltern und meine Schwester hinreichend beigestanden und fleißig redigiert. Aber herausragend beigetragen hat meine liebe Frau Ljuba mit unseren drei Kindern Xenia, Felix und Maxim. Danke, dass Ihr alle dieses nunmehr 7-jährige Projekt „Doktorarbeit“ neben unserem operativen Alltag mitgetragen habt!

IV. Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Einführung und Motivation.....	1
1.2.	Projekt „AlgenFlugKraft“ (AFK).....	3
1.3.	Prozessvorteile und Systematik der Algen	7
1.4.	Im AFK-Projekt eingesetzte Grünalgen	9
1.5.	CO ₂ -Fixierung durch Algen.....	10
1.6.	Algenbiotechnologie als Werkzeug zur Entwicklung neuer Biogasprozesse.....	11
1.7.	Grundlagen der Biogastechnologie	12
1.8.	Grundlagen der Biogaserzeugung.....	14
1.9.	Industrielle Verwertung von Biogas in Biogasanlagen	17
2.	Methoden.....	19
2.1.	Versuchsaufbau Satzprozess / kontinuierliche Fermentation.....	19
2.2.	Substrat: <i>Chlorella vulgaris</i>	20
2.3.	Substrat <i>Scenedesmus obliquus</i>	20
2.4.	Satzprozess Versuche <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i>	21
2.5.	Kontinuierliche Fermentation <i>Chlorella vulgaris</i>	22
2.6.	Kontinuierliche Fermentation <i>Scenedesmus obliquus</i>	23
3.	Publikationen	24
3.1.	Zusammenfassung der anhängenden Publikationen	24
3.2.	Original Publikationen	26
4.	Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick	44
4.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse	44
4.2.	Diskussion.....	45
4.3.	Ausblick.....	47
5.	Abdruckgenehmigung	52
6.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	53
7.	Referenzen	54

V. Abkürzungsverzeichnis

AFK	Algen-Flug-Kraft
BHKW	Blockheizkraftwerk
C	elementarer Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
CH ₄	Methan
CNG	compressed natural gas
CO ₂	Kohlendioxid
d	Tage (englisch: day)
EEG	Erneuerbare-Energien-Gesetz
FM	Frischmasse (deutsch), fresh mass (englisch)
FOS	Flüchtige organische Säuren (englisch: VOA)
g	Gramm
H ₂	Wasserstoff
ha	Hektar
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
ICP-MS	inductively-coupled-plasma mass-spectrometry
KWK	Kraft-Wärme-Kopplung
kg	Kilogramm
l	Liter
l _N	Normliter
KWK	Kraft-Wärme-Kopplung
LNG	liquified natural gas

m ³	Kubikmeter
max.	maximal
mg	Milligramm
min.	minimal
MW _{el.}	Mega Watt (elektrisch)
MT	Megatonnen
N	Stickstoff
NaWaRo	Nachwachsende Rohstoffe
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ ⁺	Ammoniumion
Ø	Durchmesser
oTS	Organische Trockensubstanz
pH	Wasserstoffionenkonzentration
t	Zeit
T	Temperatur
TAC	Gesamter anorganischer Kohlenstoff (englisch: TIC)
TIC	total inorganic carbon (deutsch: TAC)
TS	Trockensubstanz
VOA	volatile organic acid (deutsch: FOS)
VS (engl.)	volatile solids (deutsch: oTS)
v/v	Volumenprozent
w/v	Massenkonzentration
w/w	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Einführung und Motivation

Die hier vorgelegte These entstand innerhalb des vom bayerischen Staat geförderten Drittmittelprojektes „AlgenFlugKraft“ (AFK) [2] (siehe Fig. 1). Die Motivation des Projektes AFK beruht auf der Notwendigkeit, an der wohl größten Herausforderung der Menschheit im 21. Jahrhundert, der Reduktion der CO₂-Emission zur Abwendung eines menschengemachten Klimawandels mitzuwirken. Hierzu wird die Erzeugung regenerativer Kraftstoffe für die Flugindustrie sowie aus den dadurch anfallenden Reststoffen die Gewinnung von regenerativen Energien durch die Erzeugung von Biogas betrachtet. Mit dem Pariser Klimaabkommen vom 12. Dezember 2015 haben sich 197 Staaten auf eine Beschränkung der Erderwärmung, im Vergleich zum vorindustriellen Niveau, auf unter zwei Grad Celsius und möglichst unter 1,5 Grad Celsius [3, 4] verpflichtet. Um dieses Ziel zu erreichen, dürfen in der zweiten Hälfte dieses Jahrhunderts nicht mehr klimaschädliche Gase ausgestoßen werden, als der Atmosphäre durch sogenannte Senken, also etwa Wälder, entzogen werden [5]. Diese Treibhausgas-Neutralität lässt sich nur durch eine wesentliche Reduktion des Verbrauches fossiler Energieträger und durch einen signifikanten Zuwachs an regenerativen Energien erzielen. Zu den regenerativen Energien zählen heute im industriellen Maßstab die Sonnen-, Wind-, Wasser- und Bioenergie. Um die oben genannten Ziele zu erreichen, müssen dementsprechend Kraftwerke, die auf Basis fossiler Energieträger betrieben werden, durch regenerative Alternativen ersetzt werden. Allerdings stellt dieser Wandel auch eine Herausforderung in der Stromverfügbarkeit dar. Bislang konnten Kraftwerke mit Kernspaltung und fossilen Brennstoffen, wie Braun- oder Steinkohle, eine kontinuierliche Grundlast in der Stromeinspeisung gewährleisten, während Erdgas-Kraftwerke auch zum Teil Spitzenlast-Bedarf abdecken konnten. Diesen Komfort bietet eine reine Versorgung mit Sonnen- und Windkraftanlagen nicht, da deren Stromerzeugung auf entsprechend günstige Wetterbedingungen angewiesen ist. Der „worst case“ für die Netzbetreiber ist die sogenannte „Dunkelflaute“, d.h., dass an einigen wenigen Tagen im Jahr weder die Sonne hinreichend scheint, noch ausreichend viel Wind weht. Hier gibt es verschiedene Ansätze, diese Zeiten mit alternativen Stromerzeugungen zu überbrücken (überstaatlicher Netzausbau, Pumpspeicherkraftwerke, Laufwasserkraftwerke, Netzersatzanlagen, Batteriespeicher, etc. [6]). Einen entscheidenden Beitrag zur grund- und spitzenlastfähigen Stromgewinnung kann die Bioenergie, insbesondere die Biogas-Produktion leisten.

Die Energiewende muss nicht nur im Strommarkt vollzogen werden. So stellt der Anteil an regenerativen Energien im deutschen Strom-Mix Stand März 2020 zwar beachtliche 42,1 % dar, aber er beträgt in den Bereichen Wärme lediglich 14,5 % und vor allem im Verkehr sogar

nur 5,6 % [7]. Eine besondere Herausforderung im Bereich Verkehr ist dabei dem Luftverkehr der Zukunft gezollt. Da der Flugverkehr stetig zunimmt und - im Gegensatz zur Straßenmobilität - Brennstoffzellen- oder Batterie-Technologien besonders für Langstreckenflüge in naher Zukunft nicht abbildbar sind, wurde 2011 das Projekt AFK [2] ins Leben gerufen. Das AFK-Projekt umfasst erstmalig eine abfallfreie Bioraffinerie-Technologieplattform zur holistischen Umsetzung von hochgradig ölhaltiger Algenbiomasse in flüssige Flugkraftstoffe (Biokerosin), Biogas und CO₂ adsorbierende Baustoffe. Dabei wurden Technologien zur direkten Umwandlung von Mikroalgen basierten Lipiden in flüssige, „drop-in“ Flugkraftstoffe, bei gleichzeitiger Verwertung der entölten Algenrestbiomasse in Biogasanlagen untersucht. Im AFK-Projekt wird das aus Algenrestbiomasse gewonnene Biogas direkt in der thermokatalytischen Umwandlung des Algenöls genutzt, um Alkan basierte Flugkraftstoffe zu generieren, die von Ihren physikochemischen Eigenschaften äquivalent zu bestehenden petrochemischen Kerosinprodukten sind [8]. Diese prozessintegrierte stoffliche Nutzung von Algenöl und Biogas ist eine der massen- und ökoeffizientesten Nutzungsrouten dieser erneuerbaren Eduktströme, hin zu einer ökologisch und ökonomisch sinnvollen Biokerosin Produktion. Über die Nutzung von Algenrestbiomasse basierendem Biogas zur Darstellung von erneuerbaren Flugkraftstoffen hinaus, hat die Etablierung von alternativen Biomassesubstraten in der Diversifizierung und im Ausbau einer in Deutschland etablierten Biogasinfrastuktur eine essentielle Rolle [9]. In diesem Kontext zeigen eingehende Studien klar, dass die aktuelle Biogaserzeugung aus landwirtschaftlichen Rohstoffen wie Mais nicht nur mit der Nahrungsmittelproduktion konkurriert, sondern sowohl energetisch als auch ökonomisch negative Akzente setzt [10, 11]. Die Etablierung von Abfall- und alternativen Biomasse-Rohstoffströmen, die nicht mit der Nahrungsmittelproduktion konkurrieren und keinen intensiven Dünger- und Pflanzenschutz eintragen bedürfen, stehen daher aktuell im Fokus einer Biogasproduktion der nächsten Generation [12]. Da Mikroalgen durch Ihre effiziente Photosynthese zwischen 10 bis 100-fach [2, 13, 14] schneller wachsen als terrestrische vaskuläre Pflanzen und auf Brachflächen kultiviert werden können, konkurriert die Algenbiomasseproduktion in keiner Weise mit landwirtschaftlichen Aktivitäten. Darüber hinaus bedarf die Algenkultivierung keines intensiven Düngereintrages und ist frei von Pflanzenschutzmaßnahmen, was sich positiv auf die Energie- und Ökobilanz der Algenkultivierung auswirkt. Algenbiomasse, insbesondere nach einer Extraktion der intrazellulären Wertstoffe, ist daher ein sehr interessantes Substrat für die Biogasproduktion. Generell zeichnet sich ab, dass der Biogasproduktion eine Schlüsselrolle für die Sicherung der erneuerbaren Energieversorgung als auch für die Bereitstellung von erneuerbaren Grundchemikalien in Deutschland durch Ihre Substrat- und Skalenflexibilisierung zukommt.

Unter den erneuerbaren Energien zeigt Biogas das größte Potential. Biogas kann sowohl über Kraft-Wärme-Kopplung (KWK) Elektrizität und Wärme erzeugen, als auch, nach einer

Aufbereitung, im Erdgasnetz gespeichert werden. Das gespeicherte Gas kann dann, ebenfalls mittels KWK, bedarfsgerecht zur Erzeugung von Strom und Wärme abgerufen werden. Alternativ kann das aufgereinigte Biomethan als Kraftstoff zur Substituierung von Erdgas verwendet werden. Als einer der vielversprechendsten Ansätze für die Kopplung von fluktuierender und grundlastfähiger Energieerzeugung wird zudem die sogenannte „Windgas“-Erzeugung gesehen [15]. Überschüssige elektrische Energie aus Photovoltaik und Windkraftanlagen wird dabei über Elektrolyse Verfahren in Wasserstoff überführt. Dieser wird gemeinsam mit CO₂ (rückgewonnen z.B. aus der Biomethanaufbereitung) zu Methan (CH₄) synthetisiert, das wiederum einfach über bestehende Infrastruktur speicherbar und transportabel ist [16, 17]. So sind die in Deutschland installierten Biogasanlagen bereits heute eine wesentliche Stütze des Stromnetzes [18]. Durch die gezielte Förderung im Rahmen des Erneuerbaren-Energien-Gesetzes (EEG) seit dem Jahr 2000 wurde die Anzahl der bestehenden Biogasanlagen in Deutschland von 1.050, mit einer Leistung von wenigen MW_{el.}, auf 9.200 Anlagen, mit einer installierten Leistung von insgesamt 4.200 MW_{el.}, im Jahr 2012 erhöht. [19]. Im gleichen Zeitraum stieg die Anbaufläche für Energiepflanzen für Biogasanlagen auf 1.350.000 ha in 2018, wobei der Anteil an Mais ca. 2/3 betrug [20]. Diese enorme Zunahme der Maisanbauflächen („Vermaisung der Landschaft“) für die Biogasproduktion wird kritisch betrachtet, da zum einen diese Nutzung in Konkurrenz zur Nutzung des Maises als Futtermittel steht und zum anderen große Maismonokulturen einen Rückgang der biologischen Diversität nach sich ziehen [21]. Aus diesem Grund wurde im EEG 2017 ein „Maisdeckel“ in Form von maximal 50 % Nutzung (degressiv bis 2021 max. 44 %) von Mais als Einsatzstoffe eingeführt. Somit gewinnen alternative Energiepflanzen wie die Durchwachsene Silphie, Miscanthus, Gras oder verschiedene Wildpflanzen an Bedeutung. Im EEG 2017 werden insbesondere Güllekleinanlagen und Bioabfallanlagen gefördert. Diese Bioabfallanlagen sind im Speziellen von hohem Interesse, da es in Deutschland ein hohes Aufkommen an Lebensmittelabfällen gibt [22], aus denen hochwertiges Biogas erzeugt werden kann. Zusammengefasst kann man festhalten, dass Biogas entscheidend zur Erreichung der Ziele des Pariser Abkommens, bezüglich Stromproduktion, beitragen kann. Dies gilt insbesondere für die Biogaserzeugung aus Abfallstoffen. Auch aus Mikroalgen kann Biogas hergestellt werden, umso sinnvoller, wenn dieses aus Abfallstoffen von Mikroalgen nach deren Veredelung produziert wird.

1.2. Projekt „AlgenFlugKraft“ (AFK)

Durch die aktuelle Klimaproblematik, sowie der Verknappung fossiler Energieträger, ist es ein vorrangiges Ziel der Luftfahrtindustrie, Technologien zu entwickeln, die ein nachhaltiges Wachstum ermöglichen. Trotz eines steten Wachstums von 5 % pro Jahr fordern die EU Legislative und die Industrie selbst ein Nachhaltigkeitsziel in der Luftfahrtindustrie bis 2050.

Hierzu dient das Jahr 2005 bzgl. Klimaneutralität als Neutralitäts-Referenzszenario .[23–25] In diesen Strategiepapieren ist klar dargelegt, dass technologische Verbesserungen von Antriebstechnologie und Hüllstruktur alleine diese Nachhaltigkeitsziele nicht erfüllen können. Nur die Integration von CO₂ neutralen bzw. negativen Kraftstofflösungen ermöglicht eine mittelfristige CO₂ Neutralität dieses Industriesektors bis 2050 und darüber hinaus. Wasserstoff- und Elektroantriebe können aus technischen Gründen vorläufig keine Alternativen darstellen. Daher kommt der Entwicklung von flüssigen, bio-basierten, „drop-in“ Flugkraftstoffen eine große Bedeutung zu, da eine Konformität mit etablierten Antriebstechnologien besteht und flüssige Biokraftstoffe die bereits feinabgestimmte Infrastruktur zur Lagerung und Verteilung von Kerosin nutzen können [26]. Allerdings müssen diese Biokraftstoffe den hohen Standards von derzeitigen Flugkraftstoffen genügen, um die aktuellen Antriebstechnologien weiter nutzen zu können. Daher ist es unverzichtbar, dass biobasierte Rohstoffe, wie Triglyceride (pflanzliche/ mikrobielle Öle/Fette) oder auch Bioalkohole durch fein abgestimmte thermokatalytische Prozesse in Alkan basierte „drop-in“ Treibstoffe umgewandelt werden [27–30]. Die hieraus resultierenden flüssigen Produkte enthalten oft einen sehr eng umrissenen Anteil an C8-C16 verzweigten- und unverzweigten aliphatischen Alkanen als Hauptbestandteil. Darüber hinaus werden durch thermokatalytische Zyklisierung auch 6-8 % (v/v) an Aromaten generiert, die für die Verbrennungsleistung in der Turbine essentiell sind. Nur die exakte Abmischung von aliphatischen und aromatischen Kraftstoffbestandteilen ermöglicht eine Zertifizierung des erneuerbaren Flugkraftstoffes und garantiert damit die gleiche operative Sicherheit und Verbrennungseigenschaften wie konventionelle auf Petroleum basierten Flugkraftstoffen [31, 32]. Aufgrund des enormen Bedarfs der für den Flugverkehr in Mio. MT bemessenen Menge an erneuerbaren Flugkraftstoffen müssen mögliche Produktionsprozesse im industriellen Maßstab zeitnah realisiert werden. Daher bedarf es grundlegend neuer Lösungsansätze mit einem Fokus auf Vermeidung von Emissionen durch neue Flugkraftstoffe, um ein weiteres, nachhaltiges Wachstum der Flugindustrie zu gewährleisten. Die Grundidee des AFK-Projektes hat diese komplexen Themen aufgegriffen und mit Kompetenzträgern aus der Großindustrie (Airbus SE, Clariant Produkte (Deutschland) GmbH), KMU's (conys GmbH; BBSI UG) und Akademie (Technische Universität München (TUM), Bauhaus-Luftfahrt e.V.) innovative Lösungen zur industriellen Produktion von nachhaltigen Flugkraftstoffen entwickelt.

Algen_Flug_Kraft: Eine integrierte Kerosin-Bioraffinierie

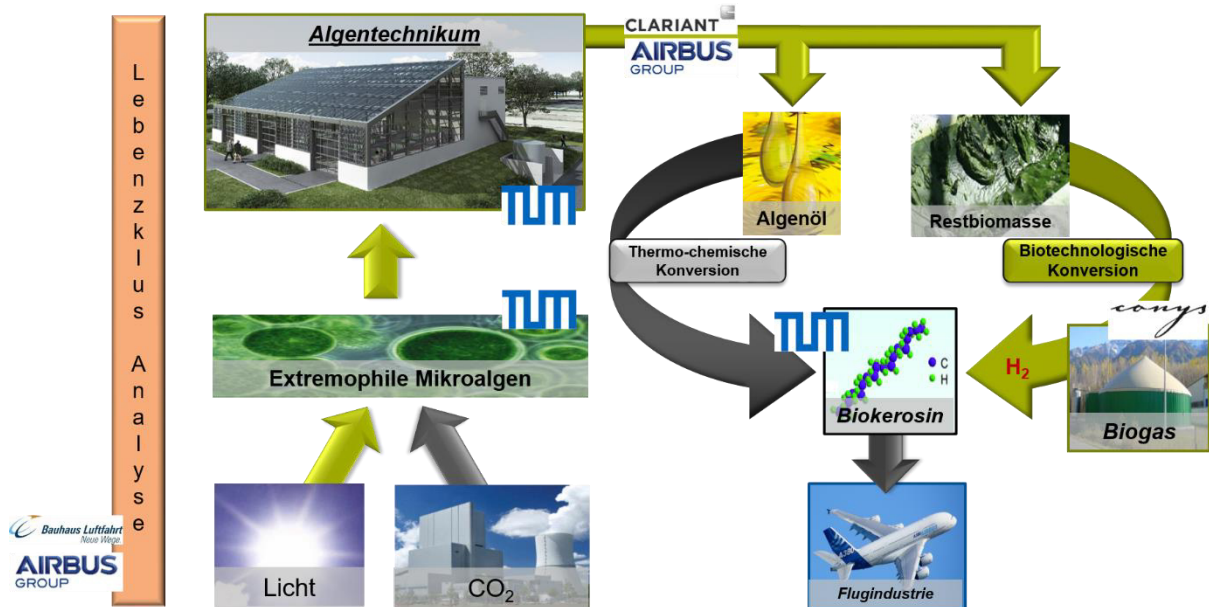


Abbildung 1: Algenproduktion für die Biokerosinherstellung im AFK Projekt.

Das Konzept umfasst einen geschlossenen Stoffkreislauf zur Herstellung, Ernte und Umwandlung von Algenbiomasse in Flugkraftstoffe, Biogas (Methan, Wasserstoff) und CO₂-bindende Baustoffe. Da erneuerbare Flugkraftstoffe in Zukunft voraussichtlich dezentral in verschiedenen Regionen der Welt produziert werden, war ein zentraler Baustein des Projektes die Untersuchung, unter welchen Klimabedingungen Algenbiomasse produktiv wachsen kann [33]. In diesem Zusammenhang sollten speziell Algenstämme identifiziert werden, die eine konstante Biomasseproduktion über ein breites Temperaturspektrum aufweisen und deren Kultivierung optimiert werden. Ziel dieser Arbeiten war es, erstmalig eine globale Machbarkeitsstudie für Algenprozesse, in Abhängigkeit von verschiedenen Algenstämmen und Klimazonen, sowie Kultivierungstechnologien, zu erstellen. Der innovative Ansatz, wässrige Biomasse direkt in Flugkraftstoffe umzusetzen, sorgt zusätzlich für eine Minimierung der Aufbereitungskosten.

In der industriellen Algenzucht ist die entkoppelte Biomasse- und Lipidproduktion unter etablierten Wachstumsbedingungen eine große Herausforderung [34]. Daher werden zumeist Algenstämme kultiviert, die sich durch eine gleichbleibend hohe Biomasseproduktion auszeichnen, deren Lipidgehalte jedoch mit 20-30 % (w/w) für die industrielle Kraftstoffproduktion nicht geeignet sind [35–37]. Eine ganzheitliche Verwertung der resultierenden Biomasse durch thermokatalytische Verfahren ist hier nicht angebracht, da es durch den hohen Proteingehalt der Algenbiomasse (bis zu 30 % (w/w)) mittelfristig zu einer Katalysatordeaktivierung kommen würde [38, 39]. Allerdings kann eine gezielte mechanische und chemo-enzymatische Auftrennung der Algenbiomasse in eine Lipid- und

Restbiomassefraktion mit zuckerreichen Zellwand- und photosynthetischen Pigmenten zu einem ökonomisch und ökologisch effizienten Gesamtprozess ausgebaut werden. Während die Lipidfraktion direkt über thermokatalytische Verfahren zu Alkan basierten Kraftstoffen umgewandelt werden kann, muss für die Algenrestbiomasse ein alternativer, wertschöpfender Verwertungsweg entwickelt werden. Die einfachste Lösung ist hier die Verwendung dieses Reststoffes als Biogassubstrat, um erneuerbares Methan zu generieren. Ziel des AFK-Projektes war eine wertsteigernde stoffliche Verwertung des Methanstromes zusammen mit der Lipidfraktion in der thermokatalytischen Umsetzung hin zum Biokerosin, während in konventionellen Bioraffinerieansätzen dieses Biogas lediglich zur prozessinternen Energieerzeugung verbrannt wird.

Im Hinblick auf die Masseneffizienz des AFK-Projektes ist festzuhalten, dass, je nach genutztem Algenstamm und dessen Kultivierungsbedingungen, die Algenbiomasse hohe Konzentrationen an industriell relevanten Wertstoffen, wie Lipiden (20-70 % (w/w) Zellmasse) enthält. Die nach der Lipidextraktion für die Biogaserzeugung zur Verfügung stehende Algenrestbiomasse setzt sich hauptsächlich aus polymeren, teils hochgradig funktionalisierten Hexosen- (z.B. Cellulose, Hemicellulose, Fucoidan, Alginat, Pektin) und Pentosepolymeren (z.B. Xylan, Arabinoxylan), sowie Proteinen zusammen [13]. Im Gegensatz zu lignocellulosehaltigen Reststoffen, wie Getreidestroh, bei dem die Zuckerpolymeren meist in hochkristalliner Form vorliegen, sind die Zuckerpolymeren in der Algenzellwand meist amorpher Natur. Daher bedarf es weder einer energieintensiven, hydrothermalen Vorbehandlung, noch einer vorgeschalteten enzymatischen Hydrolyse um die algenbasierten Zuckerpolymeren im Biogas-Fermentationsprozess für die vorliegenden Mikroorganismen verwertbar zu machen. Im Gegensatz zu lignocellulosehaltigen Rohstoffen enthält Algenbiomasse auch kein Lignin, was im Biogasprozess weder aufgeschlossen noch metabolisch in Biogas-Bestandteile umgesetzt werden kann. Das Fehlen von Lignin, aber auch die Vorlage von amorphen Zuckerpolymeren in der Algenbiomasse, lässt daher eine sehr hohe Konversionseffizienz dieses Substrates in konventionellen Biogasprozessen erwarten. Dies sollte sich durch eine hohe Biogasausbeute und einer reduzierten Masse an verbleibenden festen Gärresten am Ende des Prozesses manifestieren. Sowohl die erhöhte Biogasausbeute als auch der reduzierte Gärrest können als ökonomische und ökologische Vorteile der algenbasierten Biogasproduktion angesehen werden. Da technologische Einfachheit, Prozessstabilität und niedrige Investitionskosten für gewerbliche Betreiber von größter Bedeutung sind, ist die direkte Biogaserzeugung aus der Algenrestbiomasse ein unkomplizierter Weg für die stoffliche und / oder energetischen Verwertung dieser Restbiomasse durch Einsatz von etablierter Biogas Technologie [40, 41].

1.3. Prozessvorteile und Systematik der Algen

Mikroalgen, die als phototrophe pro- (Cyanobakterien oder grünblaue Algen) und eukaryotische Mikroorganismen umfasst werden, wandeln Sonnenlicht, das Klimagas CO₂ und anorganische Nährstoffe (z.B. Stickstoff, Phosphor und Eisen und andere Spurenelemente) in werthaltige Biomasse um [42, 43]. Algenbasierte Wertstoffe finden potentiell sowohl in der Chemie-, Kosmetik-, Pharma-, und Nahrungsmittelindustrie als auch in hochvolumigen Anwendungen zur Bioenergieproduktion Einsatz. Kommerziell kommen aktuell aber nur etwa 10 Stämme für die Produktion von hochpreisigen Produkten für die Lebensmittel-, Kosmetik- und Pharmaindustrie zum Einsatz [44]. Der industrielle Einsatz von Algen zur nachhaltigen Produktion von großvolumigen aber niederpreisigen Gütern, wie Biokraftstoffen, erfordert eine konsequente technische und ökonomische Optimierung der Biomassegenerierung, Extraktion und Konversion [45]. Dieser Ansatz war auch ein zentraler Gegenstand des AFK-Projektes. Es ist jedoch festzuhalten, dass die Photosynthese-Effizienz von Mikroalgen etwa 2-3 mal so hoch ist wie bei terrestrischen Pflanzen, was sich in einer bis zu 10 fach- höheren Biomasseertrag manifestiert [13, 46]. Da das Algen-Biomasseprodukt direkt mit der CO₂ Fixierung korreliert, stellen phototrophe Mikroalgen eines der effizienten biotechnologischen Werkzeuge für die langfristige Bindung und werthaltige Konversion des Klimagases CO₂ dar. Zusätzlich können Algen auf Brackflächen und mit Abwasser-, Brack- oder Meerwasser kultiviert werden. Es besteht damit keine Rohstoff-, Landflächen- oder Produktionskonkurrenz zur Agrarindustrie in Bezug auf die Nahrungsmittelproduktion. Mikroalgen können sogar zur Aufbereitung von kommunalen und landwirtschaftlichen Abwässern beitragen, was die Recyclingfähigkeit der immer knapper werdenden Süßwasser Ressourcen verbessert [47, 48]. In Bezug auf diese umfassenden Nachhaltigkeitsaspekte werden Mikroalgen daher oft als Biomasse der dritten Generation bezeichnet [49, 50].

Während wie beschrieben aktuell nur etwa 10 Algenspezies Eingang in kommerzielle Prozesse gefunden haben, gibt es eine große Vielzahl von Algenspezies, die bisher nur wenig oder überhaupt nicht auf Ihre industrielle Nutzbarkeit überprüft wurden [44, 51]. Auch dieser Aspekt war ein Forschungsthema in dem hier beschriebenen AFK-Projekt. Um diesen Forschungsschwerpunkt im Kontext der jeweiligen Produktbildung auch näher zu beleuchten, wird hier schlaglichtartig die doch recht komplexe biologische Systematik von Mikroalgen ausgeführt.

Die Anzahl der Gattungen der Algen wird auf etwa 30.000 – 1 Mio. Arten geschätzt [52]. Die pflanzliche, aquatische Biomasse teilt sich auf in Makro- und Mikroalgen sowie Seegräser. Die Gruppe der Mikroalgen unterteilt sich in Grünalgen (*Chlorophyta*), Braunalgen (*Phaeophyta*) und Rotalgen (*Rhodophyta*).

Im Gegensatz zu Makroalgen zeichnen sich Mikroalgen durch eine geringere Organisationsstruktur aus. Sie kommen sowohl schwimmend als auch festsitzend vor. Daher können sie z.B. marin in Küstengewässern und im offenen Meer als Phytoplankton siedeln, wo sie signifikant zur Primärproduktion von Biomasse beitragen.

Mikroalgen sind in der Evolution sehr früh entstanden und haben sich sehr schnell diversifiziert. Laut Kaltschmitt sind Grünalgen z.B. mit den Kieselalgen weniger miteinander verwandt als der Mensch mit einem Schwamm [53]. Die Stoffwechselwege und ihre Regulation unterscheiden sich bei den verschiedenen Algenklassen deutlich voneinander. Aufgrund der hohen Artenvielfalt gibt es intensive Bestrebungen, Mikroalgen besser zu untersuchen und auch wirtschaftlich zu nutzen.

Die wichtigsten Algengattungen und die von Ihnen gebildeten Produkte werden hier kurz dargestellt:

Prokaryotische Algen:

Die industriell wichtigsten Vertreter der Cyanobakterien sind die Gattungen *Spirulina*, *Synechocystis* und *Synechococcus*. Da Cyanobakterien als Prokaryoten einfach genetisch zu manipulieren sind, werden sie insbesondere für die zukünftige Entwicklung von biogenen Kraftstoffen, wie der Stärke basierte Bioethanol Produktion, in Betracht gezogen [54, 55].

Eukaryotische Algen:

Die Biotechnologie fokussiert sich hier auf drei Gruppen, obwohl in der Evolution noch viele andere Mikroalgenklassen entstanden sind.

Diatomeen sind biotechnologisch sehr interessant, da sie in großem Umfang Lipide speichern und auch in Brack- oder Salzwasser kultiviert werden können. Ferner bauen Diatomeen Kieselschalen auf, deren Verwendung in der Nanotechnologie intensiv erforscht wird. Diatomeen basierte Prozesse zielen ab auf die Darstellung von Nahrungsergänzungsmitteln, die reich an langkettigen ungesättigten Fettsäuren (Omega- 3 und 6 Fettsäuren) sind. [56].

Ähnlich wie die Diatomeen lassen sich die Eustigmatophyceen gut in Brack- und Salzwasser kultivieren und bilden in großer Menge Lipide, die zur Herstellung alternativer Kraftstoffe als Grundstoff dienen können.

Grünalgen mit Ihren Chlorophyll–Photosynthese-Pigmenten und Chloroplasten ähneln höheren Pflanzen am stärksten. Die wichtigsten Gattungen der Grünalgen sind die im Forschungsprojekt verwendeten Vertreter *Chlorella* und *Scenedesmus*, aber auch die Gattungen *Chlamydomonas*, *Haematococcus*, *Dunaliella*, *Ostreococcus* und *Botryococcus*.

Chlamydomonas wird hauptsächlich zur Herstellung von Biomasse für die energetische Nutzung kultiviert aber auch zur Gewinnung von Wasserstoff beforscht [57].

Haematococcus wird aufgrund ihrer roten Färbung für die Herstellung von Astaxanthin produziert. Dieses wird z.B. in der Fischkultur eingesetzt um das Fleisch von Salmoniden rötlich zu färben [58].

Dunaliella wird zur Erzeugung von Carotinoiden (β -Karotin) und Proteinen kultiviert.

Ostreococcus und Botryococcus können langkettige Terpen basierte Lipide, sogenannte Botryococceen, sekretieren, was eine Aufarbeitung und Umsetzung zu Biokraftstoffen erleichtert [59].

1.4. Im AFK-Projekt eingesetzte Grünalgen

Eine der am besten untersuchten Süßwasseralgenstämme ist die Grünalge *Chlorella vulgaris*, die bereits als proteinreiches Nahrungsergänzungsmittel kommerziell Einsatz findet [60]. Die Kultivierungs- und Ernteprozesse für diesen Algenstamm sind weitgehend optimiert und die metabolischen Prozesse zur Optimierung der Biomasseinhaltsstoffe bereits aufgeklärt. Daher bietet sich *Chlorella vulgaris* als Modellsystem für die Optimierung eines Algen basierten Biogasprozesses an [61]. Die mit *Chlorella vulgaris* generierten Daten zur Biogas-Prozessgestaltung werden durch weitere Testung mit der im AFK-Projekt isolierten Brackwasser Grünalge *Scenedesmus obliquus* im Hinblick auf Biogas Produktivität und Salzstress validiert und diversifiziert [62, 63]. *Scenedesmus obliquus* ist eine ölbildende Alge, die unter Stickstofflimitierung bis zu 30 % (w/w) der Biotrockenmasse als intrazelluläre Triglyceride einlagert [64]. Sie ist damit besonders für die anvisierte Biokraftstoffproduktion im AFK-Projekt geeignet. Weiterhin kann diese Alge mit Brack- oder Abwasser kultiviert werden, was sich besonders positiv auf die Ökoeffizienz des Gesamtprozesses auswirkt, da keine Ressourcenkonkurrenz mit der Nahrungsmittelproduktionskette besteht. Um eine maximale Valorisierung der *Scenedesmus obliquus* Biomasse in dem hier untersuchten Biogasprozess zu untersuchen, wird die Ganzbiomasse und die Restbiomasse nach Triglycerid (Algenöl) Extraktion als Substrat getestet [65, 66]. Neben der Biogasausbeute in Bezug auf Ganzzell- und extrahierter Restbiomasse wird auch der Einfluss des Salzgehaltes auf den Biogasprozess bewertet. Da *Scenedesmus obliquus* im technischen Maßstab in salzhaltigem „Model“-Brackwasser (2,3 %w NaCl/v) in einem kommerziellen Flachplattenphotobioreaktor angezogen wurde, ist es erstrebenswert, dass die extrahierte und salzhaltige Biomasse ohne weitere Waschschrte mit Süßwasser direkt im Biogasprozess genutzt werden kann [67]. Die Notwendigkeit für weitere Waschschrte mit wertvollem Süßwasser würde die energetische, ökonomische und ökologische Effizienz des Gesamtprozesses negativ beeinflussen. Daher ist

die Salztoleranz des untersuchten Biogasprozesses essentiell für eine ganzheitliche Bewertung der Biogas-Nutzung im AFK-Projekt.

Um die Eignung der beiden Algenstämme für einen potentiellen Biogasprozess näher zu betrachten, werden im Folgenden die Biomasse basierten Eigenschaften dieser Stämme näher ausgeführt.

Chlorella vulgaris ist eine einzellige Mikroalgenpezies, deren Name sich vom griechischen *chloros* = grün, gelbgrün und *-ella* = klein ableitet. Die Gattung *Chlorella* gehört zu den am intensivsten erforschten Mikroalgen überhaupt. Sie wird bereits im industriellen Maßstab als Nahrungsergänzungsmittel produziert und zeichnet sich durch eine hohe Biomasseproduktion mit großen Anteilen an Proteinen, Mineralstoffen, sowie essentiellen Fettsäuren aus [68]. *Chlorella vulgaris* weist selbst in einfachen, offenen Teichsystemen im Freien unter Verwendung von kommunalem Abwasser eine hohe Produktionsrate auf [69, 70]. Somit ist *Chlorella vulgaris* nicht nur eine potenzielle Quelle für Bioenergie, sondern verringert zusätzlich bei der Abwasserbehandlung durch die Aufnahme von Nährstoffen eine Eutrophierung der Gewässer [71, 72]. Bei der Verwendung von Algenkulturen, anstelle der konkurrierenden Anamox-Verfahren [73], wird Stickstoff in der Biomasse biochemisch fixiert [74, 75].

Scenedesmus obliquus ist Bestandteil des Phytoplanktons in nährstoffreichen Binnengewässern. Die Grünalge lagert unter Stickstoffmangel vermehrt Carotinoide in die Zellwand ein und bildet intrazellulär Triglyceride, die in spezialisierten Lipidvesikeln gespeichert werden [76, 77]. Dabei sind Lipidausbeuten von über 30 % (w/w) unter kontrollierten Bedingungen keine Seltenheit [78]. Für dieses Forschungsprojekt wurde diese Alge eingesetzt, da sie schnell wächst, einen hohen Lipidanteil erreicht und sich durch eine hohe Toleranz gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen auszeichnet.

1.5. CO₂-Fixierung durch Algen

Als photoautotrophe Organismen bilden Algen die Basis der aquatischen Nahrungskette und sind somit essentiell für ein intaktes, marines Ökosystem. Durch ihre photosynthetische Aktivität tragen sie zu einem erheblichen Teil an der weltweiten Sauerstoffproduktion und der gleichzeitigen CO₂-Fixierung bei. So zeigen beispielsweise Auswertungen aus den 1980er Jahren von Satellitenbildern der NASA, die auf der Detektion von Chlorophyll beruhen, dass jährlich ca. 45 bis 50 Milliarden Tonnen Kohlenstoff aus atmosphärischem CO₂ in Phytoplankton-Biomasse gebunden werden. Abgestorbenes Phytoplankton, welches in die Tiefsee absinkt, sorgt dafür, dass der Atmosphäre jährlich ca. 8 Mrd. t CO₂ dauerhaft entzogen wird. Ohne diese Kohlenstoffsенke läge die CO₂-Konzentration in der Atmosphäre statt bei 365 ppm bei ca. 565 ppm [76]. Dank des Phytoplanktons bilden die Meere somit den weltweit

größten CO₂ Speicher. Viele Geo-Engineering-Strategien zielen darauf ab, diese Kohlenstoffsенke verstärkt zu nutzen. Eine dieser Strategien ist die Eisendüngung, da die Produktion von Biomasse durch Zugabe des Spurenelements Eisen erheblich gesteigert werden kann. Allerdings wäre ein solcher Ansatz auch mit großen Risiken verbunden, da eine großflächige, intensive Düngung zu einer Eutrophierung führen könnte. Durch den hohen Anteil der abgestorbenen Biomasse entstünde ein Sauerstoffmangel, der wiederum die Produktion von Lachgas und Methan, also Treibhausgasen, begünstigen würde. Daher ist diese Methode weiter zu erforschen und Stand heute im industriellen Maßstab verboten [77].

1.6. Algenbiotechnologie als Werkzeug zur Entwicklung neuer Biogasprozesse

Ein vielversprechender Ansatz zur Umwandlung des Treibhausgases CO₂ in industrielle Wert- und Kraftstoffe ist die photoautotrophe Algenkultivierung. Im Vergleich zu Landpflanzen zeichnen sich photosynthetische Mikroalgen durch einen 10- bis 100-fach höheren Biomasseertrag, bezogen auf die Anbaufläche, aus [2, 13, 14]. Dabei konkurrieren sie nicht mit der Nahrungsmittelproduktion und können als aktive Senke des Treibhausgases CO₂ fungieren. Darüber hinaus haben besondere ölbildende Algenstämme, wie sie auch im Rahmen dieses AFK-Projektes untersucht wurden, eine bis zu 30-mal höhere Lipidausbeute pro Hektar Landmasse im Vergleich zu Landpflanzen [79–81]. Da Algenbiomasse im Gegensatz zu Landpflanzen kein Lignin enthält, wird erwartet, dass Ihre Anwendung in der Biogasproduktion zu einer höheren Biomassekonversion und damit erhöhten Biogaserträgen führt [82]. Durch die deutlich höheren Wachstumsraten von Mikroalgen werden in Deutschland bereits Biomasseausbeuten von ca. 100 Tonnen Trockenmasse pro Hektar und Jahr in geschlossenen Reaktorsystemen produziert [83]. Ferner ist die Produktion von Algenbiomasse mit einer minimalen Landnutzung von 2 m² / GJ verbunden (im Vergleich zu 258 m² / GJ für Rapsöl) [84]. Durch die Verwendung von geschlossenen Systemen wird eine gleichbleibende Qualität der Biomasse bei einer kontinuierlichen Produktion gewährleistet [85]. Ebenso können die Stoffströme, wie Nährstoffe und Wasser, im Kreislauf genutzt werden, so dass der Bedarf an Dünger und Süßwasser geringer ist als bei konventionellen Energiepflanzen [86]. Mikroalgen können des Weiteren auf nicht landwirtschaftlich genutzten Flächen mit Ab-, Brack- oder Meerwasser kultiviert werden [87]. Eine Kultivierung von Süßwasseralgenstämmen in offenen Systemen ist aufgrund von Temperatur- und Bestrahlungsschwankungen, sowie der Einführung terrestrischer Kontaminanten, wie Bakterien und Pilzen, oft nicht prozessstabil. Die letztgenannten Kontaminationsprobleme können kontrolliert oder beseitigt werden, wenn halophile Algenstämme zur Herstellung von Wertschöpfungsprodukten, wie Lipiden, verwendet werden [88]. Darüber hinaus umgeht die Verwendung von halophilen Algen den Bedarf an Süßwasserressourcen, was zu einer Reduzierung der Prozesskosten führt und den Wettbewerb mit der Landwirtschaft verhindert. Interessanterweise werden nach der Extraktion

von Algenbiomasse mit überkritischem Kohlendioxid nur minimale Mengen an Salzen in das Ölprodukt übertragen [65]. Daher verbleibt der größte Teil des Salzes in den extrahierten Algenbiomasse-Rückständen, die hauptsächlich aus den Zellwänden und intrazellulären Proteinen bestehen. Im Allgemeinen ist das Problem des Salzstresses während der anaeroben Vergärung nicht nur für halophile Algen und deren Nebenprodukte relevant, sondern erstreckt sich auch auf andere Biogassubstrate, wie Deponiesickerwasser, das hohe Konzentrationen an Ammoniumchlorid und Natriumhydrogencarbonat enthält [89]. Ebenso weisen Meeresfischzuchtschlamm [90], Küchenabfälle [91], Nebenprodukte der Fleischverarbeitung [92] oder Milchabwässer [93] einen hohen Salzgehalt auf, der die Leistung des Biogasprozesses beeinflusst. Frühere experimentelle Beweise zeigen, dass niedrige Salzkonzentrationen die Methanogenese fördern [94], während ein erhöhter Salzgehalt schließlich zu einer vollständigen Hemmung und sogar zu einer Verschiebung zur Carboxylatproduktion führt [95]. Wie bei vielen hemmenden Wirkungen kann ihr Ausmaß durch langsame Anpassung der in der Fermentation vorhandenen Mikroorganismen begrenzt werden, wie bereits für die Zugabe von Natriumchlorid gezeigt wurde [96, 97].

Aus den oben genannten Gründen kann Algenrestbiomasse, im Vergleich zu Kraftstoffen aus Erdöl (1. Generation) und terrestrischer Pflanzenbiomasse (2. Generation), auch als Rohstoff der 3. Generation für zukünftige, biotechnologische Prozesse, wie Biogas, angesehen werden [25].

1.7. Grundlagen der Biogastechnologie

Biogas, welches hauptsächlich aus Methan besteht, entsteht in der Natur bei vollständigem Abbau von Biomasse in Abwesenheit von freiem Sauerstoff. Der zu Grunde liegende Gärungsprozess kann in Mooren und Sümpfen, im Grundschlamm von Seen, im Pansen von Wiederkäuern, im Dick- und Blinddarm von allen Pflanzenfressern, sowie Dickdarm von Menschen und Tieren beobachtet werden [98]. Nur eine kleine, hochspezialisierte Gruppe von Bakterien ist in der Lage, Methan durch Methanogenese zu erzeugen. Dabei sind die Methanbildner das letzte Glied in der Kette der Mikroorganismen, die Biomasse vollständig umsetzen. Die Fähigkeit zur Methanbildung ist evolutionär in dieser Gruppe stark konserviert und existiert schon seit Millionen von Jahren [99].

Die Biogastechnologie blickt auf eine über 100-jährige Geschichte zurück. 1906 entstanden im Ruhrgebiet Reinigungsanlagen für Abwasser, allerdings vorrangig zur Verringerung der Abfälle als zur Erzeugung von Biogas. Ab den 1920er Jahren jedoch wurde das Biogas gezielt aufgefangen und in das städtische Gasnetz eingespeist [100]. In den 1950ern war auch die Verwendung als Motorentreibstoff verbreitet, jedoch ging die Bedeutung aufgrund niedriger Erdölpreis rapide zurück. [101]. Eine Renaissance der industriellen Biogaserzeugung erfolgte

mit der Energiekrise in den 1970ern, welche aber durch bald fallende Erdölpreise erneut gebremst wurde. Allerdings nahm nun die Anzahl an landwirtschaftlichen Biogasanlagen stetig zu. Dabei lag das Augenmerk darauf, bei einer möglichst geringen Verweilzeit des Gärsubstrates eine möglichst vollständige Vergärung der Biomasse zu erzielen, um hierdurch eine möglichst hohe Gasausbeute zu erreichen [102].

Zur Erzeugung von Biogas eignet sich nahezu jede Art von leicht umsetzbaren, organischen Substanzen. Bis zum Ende des letzten Jahrhunderts wurden überwiegend kostengünstige Substrate, wie organische Abfälle aus der Lebensmittelherstellung und -verarbeitung, kommunaler Grünabfall und Ausscheidungen von Nutztieren eingesetzt.

Mit dem Stromeinspeisungsgesetz vom 7. Dezember 1990 wurde es möglich, dass kleine, dezentrale Stromerzeuger (neben Biogasanlagen auch Anlagen, welche Strom aus Sonne, Wind und Wasser produzierten), ihren erzeugten Strom erstmalig in das öffentliche Netz einspeisen konnten. Mit dem Inkrafttreten des darauf nachfolgenden Gesetzes, des Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG) vom 29. März 2000 [103], wurden diese Stromerzeuger sogar vorrangig in der Einspeisung gegenüber bestehender Stromerzeuger gestellt und darüber hinaus entsprechend ihrer Produktionskosten vergütet. Durch die Novellen EEG 2004 und insbesondere EEG 2009 haben sich vor allem nachwachsende Rohstoffe, im speziellen der Mais als Energiepflanze, durchgesetzt. Damit einher ging ein rasanter Anstieg im Bau von Biogasanlagen, welche zunehmend öffentlich kritisiert wurden (Stichworte wie „Übermaischung der Landschaft“ und „Teller-Tank-Diskussion“). Letztendlich wurde diese Entwicklung seit dem EEG 2012 abrupt gestoppt, so dass nur noch wenige Neuanlagen entstanden sind.

Die Biogasbranche besinnt sich seit der Rezession ab 2012 wieder auf ihren Ursprung und verstärkt ihr Augenmerk in der Biogaserzeugung aus biogenen Reststoffen aus der Tierhaltung, da insbesondere Güllekleinanlagen gefördert werden. Ein weiterer Trend zeichnet sich ab, indem bestehende NaWaRo-Biogasanlagen in die Flexibilisierung übergehen. Dies bedeutet, dass zwar die installierte Leistung durch Zubau von BHKWs erhöht wird, aber - aufgrund der Möglichkeit der Gasspeicherung in den Fermenterhauben - die Verstromung des Biogases bedarfsgerecht erfolgt. So werden z.B. die BHKWs zu Spitzenbedarfszeiten auf Volllast gefahren, während bei Stromüberschüssen im Versorgungsnetz (witterungsbedingt durch Photovoltaik oder Windkraft) die BHKWs in ihrer Leistung reduziert oder sogar abgeschaltet werden, aber das weiter kontinuierlich produzierte Biogas für späteren Strombedarf gespeichert wird.

1.8. Grundlagen der Biogaserzeugung

Gärprozess

Bei der mikrobiellen Umsetzung von Gärsubstraten, unter dem Entzug von Sauerstoff, werden organische Substanzen in aufeinanderfolgenden, biochemischen Prozessen in ein brennbares Gasgemisch und einen trockensubstanzhaltigen Gärrückstand (weitgehend bestehend aus Lignozellulose) umgewandelt. Je nach eingesetztem Substrat schwankt der Methan-Gehalt (CH_4) zwischen 50 % und 70 % (v/v). Die zweite große Fraktion ist CO_2 , welches 30 bis 50 % (v/v) ausmacht. Im geringeren Anteil finden sich noch O_2 (bei intakten Biogasanlagen ohne Sauerstoffschlupf) mit maximal 1 % (v/v), sowie im ppm-Bereich H_2S und H_2 .

Der Gärprozess ist durch vier aufeinanderfolgende biochemische Prozesse definiert:

Stufe 1 Hydrolyse: Hochmolekulare, organische Stoffe wie einfache, oligomere Kohlenhydrate, Proteine und Fette (Triglyceride), sowie teilweise auch polymere Zucker wie Stärke, Pektin und Cellulose, werden mittels bakteriell sekretierter Enzyme (hydrolytische Exoenzyme, wie Amylasen, Pektinasen, Cellulasen, Hemicellulase, Proteasen und Lipasen) in niedermolekulare, fermentierbare organische Verbindungen, wie Glycerin, freie Fettsäuren, Monomere-Zucker (z.B. Glukose, Mannose, Galactose, Xylose, Galacturonsäure) und Aminosäuren, gespalten. Im Gesamtprozess der Vergärung ist diese Stufe die zumeist langsamste Reaktion der Biogaserzeugung und beeinflusst somit signifikant die Verweilzeit des Substrates im Reaktor.

Stufe 2 Acidogenese: In diesem Prozessschritt wandeln die Bakterien die zuvor genannten Zwischenprodukte in Carboxylsäuren (Buttersäure, Propionsäure, z.T. Essigsäure) und Alkohole um. In dieser Versäuerungsstufe entstehen auch geringe Mengen an CO_2 und H_2 .

Stufe 3 Acetogenese: In dieser Phase bauen die säurebildenden Mikroorganismen Propionsäure und Buttersäure in größerem Maßstab zu Essigsäure sowie CO_2 und H_2 ab.

Stufe 4 Methanogenese: Im letzten Schritt wird von den methanbildenden Archaeen und anaeroben, methanotrophen Bakterien Methangas gebildet. Dies geschieht entweder durch die Spaltung von Essigsäure zu CH_4 und CO_2 oder durch die Verbindung von H_2 mit CO_2 .

Methanobacteria:	Substrat
<i>Methanobacterium formicium</i>	H ₂ , Formiat
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> (65°C)	H ₂
<i>Methanobacterium thermoalcaliphilum</i> (60°C)	H ₂
<i>Methanobacterium ruminantium</i>	H ₂ , Formiat
Methanomicrobia: Coccen und Stäbchen, Zellwände aus Protein, Glycoprotein oder Heteropolysacchariden	
<i>Methanomicrobium mobile</i>	H ₂ , Formiat
<i>Methanogenium limicola</i>	H ₂ , Formiat
<i>Methanospirillum hungatei</i>	H ₂ , Formiat
<i>Methanosarcina barkeri</i>	H ₂ , Methanol

Tabelle 1: Methanogene Bakterien und die von ihnen genutzten Substrate [104].

Die letzte Stufe der Umwandlung von Biomasse in Methan ist hochspezialisierten Arten, wie den Archaeen vorbehalten, die sehr sauerstoffempfindlich sind. Die folgenden Tabellen zeigen Arten von methanbildenden Bakterien, sowie die jeweiligen Substrate, die von Ihnen umgesetzt werden.

H ₂ und CO ₂ :	4 H ₂ + CO ₂	⇒	CH ₄ + 2 H ₂ O
Formiat:	4 HCOOH	⇒	CH ₄ + 3 CO ₂ + 2 H ₂ O
Methanol:	4 CH ₃ OH	⇒	3 CH ₄ + CO ₂ + 2 H ₂ O
Methylamin:	4 CH ₃ NH ₂ Cl + 2 H ₂ O	⇒	3 CH ₄ + CO ₂ + 4 NH ₄ Cl
Trimethylamin:	4 (CH ₃) ₃ NCl + 6 H ₂ O	⇒	9 CH ₄ + 3 CO ₂ + 4 NH ₄ Cl
Acetat:	CH ₃ COOH	⇒	CH ₄ + CO ₂
Kohlenmonoxid:	4 CO + 2 H ₂ O	⇒	CH ₄ + 3 CO ₂

Tabelle 2: Methanogene Substrate und ihre Umsetzung [104].

Normalerweise finden die vier genannten Stufen in der Praxis gleichzeitig in einem geschlossenen und gerührten Fermenter statt. Die Parameter für eine effektive Biogaserzeugung sind die Verweilzeit der Substrate (die Verweilzeit sollte nicht weniger als 20 Tage betragen), eine adäquate Faulraumbelastung (zwischen 2 bis 5 kg oTS/(m³*d)) und mesophile Bedingungen (Temperatur zwischen 35 und 48 Grad Celsius) [104].

Gaszusammensetzung und Gasreinigung

Biogas als Rohgas besteht durchschnittlich aus 50 % (v/v) – 70 % (v/v) CH₄ und 30 % (v/v) - 45 % (v/v) CO₂. Ferner lassen sich geringere Mengen an Wasser, Sauerstoff sowie im ppm-Bereich H₂ (Wasserstoff) und H₂S (Schwefelwasserstoff) nachweisen.

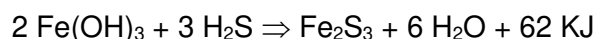
In folgender Tabelle werden die physikalischen Eigenschaften von Biogas und seinen Bestandteilen aufgeführt:

Eigenschaft		Bestandteile				Gemisch ca. 60 % (v/v) CH ₄ 40 % (v/v) CO ₂
		CH ₄	CO ₂	H ₂	H ₂ S	
Vol. – Anteil	% (v/v)	55 - 70	27 – 44	< 1	< 3	100
Heizwert	MJ/Nm ³	35,8	-	10,8	22,8	21,5
Zündgrenze in Luft	Vol %	5 – 15	-	4 – 80	4 – 45	6 – 12
Zündtemperatur	°C	650 – 750	-	585	-	650 – 750
Kritischer Druck	Bar	47	75	13	89	75 – 89
Dichte	kg/m ³	0,72	1,98	0,09	1,54	1,20

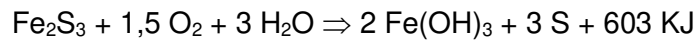
Tabelle 3: Physikalische Eigenschaften von Biogas und seinen Bestandteilen [104].

Beim Einsatz von Biogas in Blockheizkraftwerken (BHKW) stellt der Schwefelwasserstoff (H₂S) die größte Problematik dar, da er auf Rohrleitungen und Motoren korrosiv wirkt und es somit zum Verschleiß der eingesetzten Materialien kommen kann. Zur Vermeidung des Übertragens von Schwefelrückständen, die mit dem Biogas in das Motorenöl gelangen und zu dessen Aufsäuerung führen können, gibt es 3 Stufen der Entschwefelung [105].

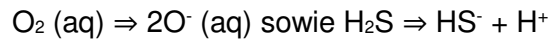
Als erste Stufe sollte eine Zudosierung von Luftsauerstoff 2 % (v/v) – 5 % (v/v) der produzierten Gasmenge direkt in den Fermenter erfolgen. Hiermit wird Schwefelwasserstoff in elementaren, kristallinen Schwefel und Wasser oxidiert und getrennt. Darüber hinaus sollte im Rahmen eines katalytischen Trockenverfahrens Eisenhydroxid Fe(OH)₃ als Katalysator eingesetzt werden. Dieser Vorgang kann folgendermaßen formalisiert und bilanziert werden:



Die Regeneration erfolgt an der Luft und läuft folgendermaßen ab:



Als dritte Stufe der Entschwefelung empfiehlt sich der Einsatz von Aktivkohle, wobei Schwefelwasserstoff und Sauerstoff an der Oberfläche der Aktivkohle adsorbieren. Die katalytischen Eigenschaften der Aktivkohle bewirken ein Aufspalten der einzelnen Moleküle:



Kommt der dissoziierte Schwefelwasserstoff mit einem Sauerstoff-Ion in Kontakt, entstehen H_2O und S (elementarer Schwefel):



Der Schwefel wird in die Aktivkohle eingelagert. Dabei kann die Aktivkohle in der Praxis mit 0,2 bis 0,5 kg Schwefel / kg Aktivkohle beladen werden, wobei mit zunehmendem Schwefelgehalt die katalytische Aktivität der Aktivkohle sinkt. Die Aktivkohle muss nach Erreichen dieser Beladung ausgetauscht und entsorgt werden. Ein weiterer großer Vorteil der Aktivkohleentschwefelung ist, dass gleichzeitig für das BHKW schädliche Siloxane und Halogenverbindungen aus dem Biogas beseitigt werden.

1.9. Industrielle Verwertung von Biogas in Biogasanlagen

Biogas ist ein hochwertiger Energieträger und kann auf vielfältige Weise eingesetzt werden. Im industriellen Maßstab ist die gebräuchlichste Nutzungsform die Umwandlung in Strom und Wärme, mittels eines BHKWs.

Von den ca. 8700 in Deutschland installierten Biogasanlagen setzen ca. 8200 Anlagen nachwachsende Rohstoffe (NaWaRo) als Substrate wie Mais, Gras- und Getreide-Arten ein. Ferner werden hier auch tierische Nebenprodukte wie Rinderfestmist, Gülle, Hähnchenmist, Hühnertrockenkot, etc. eingebracht. Weiterhin existieren ca. 560 reine Güllekleinanlagen ($\leq 75 \text{ kW}_{\text{el}}$). Lediglich ca. 335 Anlagen verwerten biogene Reststoffe wie Bioabfall, Speisereste, Schlachtabfälle, überlagerte Lebensmittel, Flotate, Magen-/Darminhalte, etc. [106]. Die festen Substrate werden zumeist über einen Feststoffdosierer, die flüssigen zumeist über eine Vorgrube eingebracht und dem Fermenter zugeführt. Bei biogenen Reststoffen erfolgt in der Regel eine Hygienisierung (70°C für 1 Stunde), bevor das Substrat in den Fermenter gepumpt wird. In einem Fermenter finden die unter 1.8. beschriebenen Prozesse statt, also die 4-stufige Bildung des Endproduktes Methan. Das Methan als Schwachgas (50 – 70 % (v/v) Methan) wird nach einer Aufbereitung (Gasreinigung, -entfeuchtung und -kühlung) in das BHKW überführt. Dort wird durch die Verbrennung des Gases im Motor mechanische Energie erzeugt, die einen Generator antreibt. Der im Generator erzeugte Niederspannungsstrom wird mit

einem Trafo in eine netzkonforme Mittelspannung überführt. Mit einer Übergabestation wird dieser Strom in das Stromnetz eingespeist.

Ein „Abfallprodukt“ der Verstromung durch BHKWs ist die Abwärme. Die meisten Biogasanlagen nutzen diese Wärme zur Versorgung ihrer eigenen Fermenter und speisen den Überschuss in Nahwärmenetze oder Trocknungssysteme ein. Damit erhalten diese Anlagen eine weitere und wirtschaftlich bedeutende Förderung im Bonussystem, den Kraft-Wärme-Kopplungs- Bonus (KWK-Bonus) [107].

Die ausgegorenen Reste der Substrate, die Gärreste, stellen einen hervorragenden anorganischen Wirtschaftsdünger dar. Da bei der Biogasproduktion überwiegend die organischen Kohlenstoffverbindungen zu CH_4 und CO_2 verstoffwechselt werden, bleiben anorganische Substratbestandteile wie Stickstoff, Phosphat, Kalium, etc. aus dem Ausgangssubstrat nach der Vergärung in den Gärresten erhalten.

2. Methoden

2.1. Versuchsaufbau Satzprozess / kontinuierliche Fermentation

Innerhalb des Forschungsprojektes wurden Biogas Satzprozess-Versuche und kontinuierliche Versuche mit den Algenstämmen *Chlorella vulgaris* und *Scenedesmus obliquus* durchgeführt.



Abbildung 2: Satzprozess (links), semi-kontinuierlicher Versuch (rechts) (Foto vom Autor).

Beide Algenstämme wachsen schnell und können in offenen und geschlossenen Photobioreaktor-Systemen ohne Kontamination gut kultiviert werden. Damit ist ein robuster Prozess zur Biomasse-Herstellung gegeben. Zusätzlich bildet *Scenedesmus obliquus* unter Nährstofflimitierung (insb. N-Limitierung) intrazelluläre Speicherstoffe wie Lipide, die in Biogasprozessen die Methanausbeute erhöhen. Im Rahmen des Projektes wurde jedoch initial kommerziell erhältliche unlimitierte *Chlorella vulgaris* Biomasse benutzt, um erste Versuche zur Biogasproduktion mit Algen zu gewinnen. Hier zeichnete sich ab, dass der hohe Proteingehalt den Einsatz dieser nicht limitierten Biomasse einschränkt. Im Zuge der Prozessvalidierung und Diversifizierung mit *Scenedesmus obliquus* wurde N-limitierte, entölte Algenrestbiomasse genutzt, die nur einen sehr geringen Proteingehalt auswies. Die hier gewonnenen Daten waren projekt- und skalierungsrelevant für die industrielle Nutzung von Algenbiomasse in Biogasanlagen. Neben den Effekten der individuellen Biomasse-Bestandteile wurde auch der Einfluss des Salzgehaltes auf die anaerobe Vergärung untersucht.

2.2. Substrat: *Chlorella vulgaris*

Sowohl trockene als auch frische Biomasse wurde von der Roquette Klötze GmbH & Co. KG bezogen. Diese hatte einen Gesamttrockensubstanzgehalt (TS) von 8,8 % (frisch) bzw. 88,5 % (getrocknet). Die organische Trockensubstanz lag bei 93,1 g gTS⁻¹ bzw. 89,7 g gTS⁻¹. Die Werte wurden über 24 Stunden in einem Trockenschrank bei 105°C (TS) und durch Veraschung der getrockneten Probe in einem Muffelofen bei 550°C über 3 Stunden (oTS) ermittelt. Diese Substrate wurden verwendet, um die Fermenter mit vergleichbaren Raumbelastungen zu betreiben, was zu der folgenden Zusammensetzung der Satzprozesse führte. Als Referenzsubstrat wurde kommerzielle mikrokristalline Cellulose (Avicel, Sigma-Aldrich, Weilheim, DE) in analytischer Qualität mitvergoren. Die Wahl für Avicel als Referenzsubstrat resultierte aus der Überlegung, dass die *Chlorella vulgaris* Zellwand, die als Primärbioassubstrat erachtet wurde, weitgehend aus Zellulose besteht [108].

Experiment	Blindprobe	Referenz	Chlorella trocken	Chlorella frisch
Substrat	-	Zellulose	Trockene Algenbiomasse	Frische Algenbiomasse
Inokulum (g FM / Satzprozess)	1.400	792	790	790
Wasser (g/Satzprozess)	0	610	610	475
Substrat Input (g FM / Satzprozess)	0	11	14	135
pH Wert Start	7,8	7,9	7,1	7,7

Tabelle 4: Kenndaten Versuchsansatz [110].

2.3. Substrat *Scenedesmus obliquus*

Die Grünalge *Scenedesmus obliquus* wurde ohne NaCl kultiviert und mit überkritischem Kohlendioxid extrahiert, wie von Lorenzen et al. [65] beschrieben. Für alle Fermentationen wurden lyophilisierte Algenreste als Substrat verwendet. Die Gesamttrockensubstanz (TS) wurde mit 92,5 g gFM⁻¹ und die organische Trockensubstanz (oTS) mit 87,7 g gTS⁻¹ gemessen. Die Werte für TS und oTS wurden analog zur Bestimmung von *Chlorella vulgaris* ermittelt. Zur Beimpfung der Fermenter und für den Blindversuch wurde Impfsubstrat aus einer landwirtschaftlichen Biogasanlage verwendet. Vor dem Experiment wurde der TS-Gehalt mit

4,8 g gFM⁻¹ und der oTS-Gehalt mit 65,7 g gTS⁻¹ bestimmt. Anschließend wurde die Salzkonzentration entsprechend eingestellt.

Substrat	Blindprobe	<i>Scenedesmus obliquus</i>				
		Alge Unbehandelt	Alge 2 % NaCl	Alge 5 % NaCl	Alge 10 % NaCl	Alge 3 % NaCl gesamt
Bezeichnung	Nullprobe					
Einwaage Inokulum [g FM/Fermenter]	1.600	880	880	880	880	880
Einwaage Wasser [g FM/Fermenter]	0	521	520	520	520	521
Einwaage Substrat [g FM/Fermenter]	-	16	16	16	16	16
Einwaage NaCl [g/Fermenter]	-	-	2,1	5,3	10,6	42,0
Salzkonzentration bezogen auf Algensuspension/ Gesamtansatz	-	-	2% / 0,15%	5% / 0,38%	10% / 0,76%	40% / 3%
pH Wert Start	7,9	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Leitfähigkeit Tag 1 (mS cm⁻¹)	32,7	22,3	24,6	27,8	32,9	62,2
Fermentationszeit (Tage)	28					

Tabelle 5: Zusammensetzung für Satzprozess-Fermentationsversuche [111].

2.4. Satzprozess Versuche *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*

Die Fermentation wurde nach dem Protokoll VDI 4630 zur Abschätzung der Biogasausbeute bei einer Temperatur von 38,0 +/- 0,5°C in einem Volumen von 1.400 ml in 2 l Glaskolben im dreifachen Ansatz durchgeführt. Die VDI 4630-Richtlinie definiert Regeln und Vorgaben für Vergärungsversuche zur betrieblichen Optimierung von Biogasanlagen [109]. Die Menge des produzierten Biogases wurde mit einem Gasdurchflussmesser (MilliGascounter, Ritter GmbH, Deutschland) gemessen. Die Gaszusammensetzung, welche Methan, Kohlendioxid, Sauerstoff, Wasserstoff und Schwefelwasserstoff enthielt, wurde mittels eines Gasanalysators

AwifLEX (Awite Bioenergie GmbH, Deutschland) bestimmt. Die Leitfähigkeit für den *Scenedesmus*-Versuch wurde mit einem tragbaren Leitfähigkeitsmessgerät Almemo 2490 (Ahlborn Mess- und Regelungstechnik GmbH, Deutschland) gemessen. Alle Experimente wurden über 28 Tage in dreifacher Wiederholung durchgeführt.

2.5. Kontinuierliche Fermentation *Chlorella vulgaris*

Das Experiment wurde mit drei Chargen frischer Biomasse von *Chlorella vulgaris* (Roquette Klötze GmbH & Co. KG, Deutschland) durchgeführt. Die Biomasseanalyse vor der Fermentation wurde wie in Abschnitt 2.2 beschrieben durchgeführt. Insgesamt wurden drei Chargen Algen angeliefert. Die Algensuspension wurde kühl und dunkel gelagert.

	Satzprozess 1	Satzprozess 2	Satzprozess 3
TS (%)	11,0	13,4	15,0
oTS(%TS)	93,8	92,0	86,2
oTS (%FM)	10,3	12,4	12,9
pH	5,3	5,0	5,8

Tabelle 6:Kenndaten der verwendeten Substrate [110].

Die kontinuierliche Fermentation wurde 64 Tage in 30-l-Glasfermentern (H = 100 cm, Ø = 20 cm) durchgeführt, die mit einem zentralen Rührwerk, einem Gasauslass, einem Sondenventil, einem Temperatursensor und einem spiralförmigen Wasserwärmetauscher ausgestattet waren. Jeder Fermenter wurde mit 28,0 Liter Inokulum aus einer landwirtschaftlichen Biogasanlage befüllt. Jeden Tag wurde 1 l Gärrest entnommen, während gleichzeitig der Fermenter gerührt wurde. Hierauf wurde dann frische Biomasse mit Fermentersubstrat gemischt und in den Reaktorbehälter eingefüttert. Einmal pro Woche wurde der Füllstand des Fermenters angepasst, so dass der Füllstand über die gesamte Versuchsdauer gleich blieb. Während der Fermentation wurde die Faulraumbelastung von 1,0 kg oTS/(m³*d) auf 3,0 kg oTS/(m³*d) erhöht, nachdem sich die Biogasproduktion stabilisiert hatte. Die Temperatur wurde konstant bei 42,0 ± 0,3° C gehalten und das Rührwerk arbeitete in Intervallen von 10 Minuten, gefolgt von einer Pause von 5 Minuten. Die Gaszusammensetzung und -menge wurde mit den gleichen Geräten gemessen wie in Abschnitt 2.4. beschrieben. Sobald Gasströme über 1 L h⁻¹ erreicht wurden, erfolgte die Messung mit Trommelgaszählern TG 0,5 (Ritter GmbH, Deutschland).

Der Gärrest wurde wöchentlich analysiert. Die ersten 40 Tage wurde die Probe 5 Stunden nach der Fütterung entnommen. Während der restlichen Versuchslaufzeit wurde die

Gärrestprobe dann 2 Stunden nach der Fütterung entnommen, da die ermittelten Gehalte an flüchtiger organischer Säure bereits sehr niedrig waren. Der Gehalt an Gesamtfeststoffen (TS) und organischer Trockensubstanz (oTS) wurde, wie in 2.2. beschrieben, abgeschätzt. Zusätzlich wurden flüchtige organische Säuren (FOS) durch Gaschromatographie (CP - 3800 GC, Varian Analytical Instruments Inc., USA) gemessen. Der Gesamtgehalt an anorganischem Kohlenstoff (TAC) wurde durch Oxidation und IR-Detektion mit TOCOR 2 (Maihac AG, Deutschland) gemessen. Zusätzlich wurde Ammoniakstickstoff unter Verwendung eines Ammoniakstickstoff-Kits auf Salicylatbasis (Hach, Lange GmbH, Deutschland) und ein Spektrophotometer (Hewlett-Packard 8453 UV-Vis PAD, HP Deutschland GmbH Deutschland) verwendet. Nach der abgeschlossenen Fermentation wurde der Gärrest zusätzlich durch optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS OES 710-Serie, Agilent Technologies, Inc., USA) untersucht.

Um die übermäßige Freisetzung von Schwefelwasserstoff zu unterdrücken, wurde täglich, ab dem Tag 59, 1 g Entschwefelungsmittel Bayoxide E33, (LANXESS AG, Deutschland), zugegeben.

2.6. Kontinuierliche Fermentation *Scenedesmus obliquus*

Im kontinuierlichen Durchflussfermenter wurde die Monovergärung der Grünalge *Scenedesmus obliquus* bei verschiedenen Salzgehalten getestet. Das Experiment wurde für 70 Tage in 30 l Glasfermentern (H = 100 cm, Ø = 20 cm) durchgeführt, die mit einem zentralen Rührer, einem Gasauslass, einer Probeentnahme, einem Temperatursensor und einem Spiralwasser-Wärmetauscher ausgestattet waren. Jeder Fermenter wurde mit 28,0 Liter Inokulum einer landwirtschaftlichen Biogasanlage befüllt. Die Faulraumbelastung betrug bis zum Tag 50 1,0 kg oTS/(m³*d) und wurde dann bis zum Ende des Experiments auf 1,5 kg oTS/(m³*d) erhöht. Die Fütterung erfolgte alle 24 Stunden durch Zugabe von in 250 ml entionisiertem Wasser suspendierter Biomasse mit der entsprechenden Menge Natriumchlorid. An 4 bis 5 Tagen pro Woche wurde eine kleine Probe aus dem Fermenter entnommen, um die Leitfähigkeit vor der zusätzlichen Fütterung zu messen. Einmal pro Woche wurde der Füllstand des Fermenters durch Entfernen des Gärrestes eingestellt, um den Füllstand konstant zu halten. Die Temperatur wurde konstant bei 42,1 ± 0,3°C gehalten, und das Rührwerk arbeitete in Intervallen von 10 Minuten, gefolgt von einer Pause von 5 Minuten. Nach 60 Tagen wurde die Fütterung unterbrochen, um zu überprüfen, ob noch eine weitere Gasproduktion erfolgte. Die Gaszusammensetzung und -menge wurde unter Verwendung der gleichen Vorrichtungen gemessen, wie sie für die Satzprozesse beschrieben wurden, mit der Ausnahme, dass Gasströme über 1 l h⁻¹ mit Trommelgaszählern TG 0,5 (Ritter, Deutschland) gemessen wurden. Der Gärrest wurde wöchentlich analog zum kontinuierlichen *Chlorella vulgaris* Versuch analysiert [110].

3. Publikationen

3.1. Zusammenfassung der anhängenden Publikationen

Satzprozess und kontinuierliche Biogasfermentation *Chlorella vulgaris*

Der Artikel "Batch and Continuous Biogas Fermentation of the Fresh Water Algae *Chlorella vulgaris* - Detailed Process Analysis" wurde 2018 im "Journal of Bioprocessing & Biotechniques" (DOI: 10.4172/2155-9821.1000338) veröffentlicht. Der Autor der These, Timm Adamietz, entwickelte das Konzept, generierte, interpretierte die Daten und schrieb als Erstautor das Manuskript.

Während sich frühere Publikationen auf den Einfluss der Vorbehandlung von Biomasse und auf die Biogaserträge an sich konzentrierten, untersuchte dieser Versuch die Dynamik der Biogasfermentation im Detail. Um technisch relevante Ergebnisse zu erzielen und eine Empfehlung für Biogaserzeuger aussprechen zu können, wurde in diesem Versuch ein normierter Aufbau nach VDI 4630 angewendet. Zusätzlich wurden regelmäßig Gas- und Gärrestanalysen durchgeführt. Dieser spezielle Aufbau wird herkömmlicherweise für Standard-Substrattests angewendet, wenn Industriekunden ihre Prozesse optimieren wollen. Obwohl Chargenvorversuche Biogaserträge von $537,9 \text{ l}_N \text{ kg}^{-1} \text{ oTS}$ für getrocknete *Chlorella vulgaris* und $443,6 \text{ l}_N \text{ kg}^{-1} \text{ oTS}$ für frische Biomasse mit Methankonzentrationen von 60,0 % (v/v) und 61,1 % (v/v) ergaben, konnten diese Werte unter technisch relevanten Bedingungen mit der eingestellten Faulraumbelastung nicht gehalten werden. Die ermittelten Daten zeigen, dass die maximale Faulraumbelastung für eine stabile kontinuierliche Fermentation von *Chlorella vulgaris* zwischen 1,0 und 1,5 kg oTS/(m³*d) liegt. Der Hauptgrund für dieses Problem war die langsame Umsetzung der Proteinfraktion. Diese Situation könnte durch die hohe Ammoniakkonzentration im Gärsubstrat ($\sim 3 \text{ g l}^{-1}$) sowie den hohen Gehalt an Gesamtstickstoff ($8 \text{ g kg}^{-1} \text{ FM}$) und Protein (54 % w/w TS) im Gärsubstrat erklärt werden. Obwohl theoretisch eine bessere Fermentationseffizienz durch eine Änderung der Fermentationsbedingungen und einer Anpassung der Mikroorganismen möglich wäre, würde der Abbau von Proteinen letztendlich zu einer Ammoniakhemmung führen. Die Daten zeigen, dass die Fermentation von unlimitiert kultivierter *Chlorella vulgaris* Biomasse als Monosubstrat problematisch und nicht empfehlenswert ist. Die Anwendung von Algenbiomasse als Ko-Substrat jedoch könnte eine wertvolle Ergänzung zu landwirtschaftlichen Einsatzstoffen sein, die einen hohen Kohlenhydrat- und einen niedrigen Proteingehalt aufweisen (z.B. hydrolysiertes Getreidestroh). Die in den Algen enthaltenen Proteine erhöhen die Methankonzentration. Weiterhin beeinflussen die enthaltenen Spurenelemente die Fermentations- und Düngemittelqualität positiv.

Satzprozess und kontinuierliche Biogasfermentation aus extrahierten, halophilen Algenresten der *Scenedesmus obliquus* mit hohem Salzgehalt

Der Artikel "Biogas yields and composition from oil-extracted halophilic algae residues in conventional biogas plants operated at high salinities" wurde 2019 in "Bioprocess and Biosystems Engineering" (<https://doi.org/10.1007/s00449-019-02185-8>) veröffentlicht. Der Autor der These, Timm Adamietz, entwickelte das Konzept, generierte, interpretierte die Daten und schrieb als Erstautor das Manuskript.

Durch die Versuche mit *Chlorella vulgaris* wurde die Machbarkeit der Biogasfermentation von Mikroalgenbiomasse in landwirtschaftlichen Standard-Biogasanlagen untersucht [110]. Daraus war ersichtlich, dass sich die Kofermentation mit begrenzten Mengen von Süßwasseralgen für den Anlagenbetreiber als vorteilhaft erweisen würde. In den Versuchen mit *Scenedesmus obliquus* wurde die Verwendung von halophilen Algenbiomasse-Rückständen, nach der Lipidextraktion, in konventionellen Biogasanlagen untersucht [111]. Ein zentraler Schwerpunkt des Versuches war die Untersuchung der Biogausausbeute und der Prozessstabilität mit Algenbiomasse, die steigende Salzkonzentrationen enthielt. Die Verwertung dieses Rückstandes war für die gesamtwirtschaftliche Betrachtung des AFK-Projektes von wesentlicher Bedeutung.

Es konnten überdurchschnittlich hohe Methanerträge von 213,2 l_N/kg oTS generiert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die im Rahmen der Vorbehandlung mit überkritischer CO₂-Ölextraktion behandelten Algen eine verbesserte Hydrolyse der Kohlenhydrate und Proteine bei der Methanisierung ermöglicht. Die Zellen wurden vor der Extraktion auch mittels Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen. Es sollte also nach den beiden Schritten eine deutlich größere Angriffsfläche für die Mikroorganismen vorhanden und die Strukturen aufgebrochen sein.

Die Methanausbeuten waren etwa 20 % (v/v) höher als die Literaturwerte, die mit demselben Algenstamm ohne vorherige Ölextraktion ermittelt wurden. Die Daten zeigen, dass ein kontinuierlicher, anaerober Aufschluss ohne Verlust der Fermentationseffizienz bis zu einer Salzkonzentration von 2 % (w/v) möglich ist, wenn herkömmliche, landwirtschaftliche Biogasanlagen schrittweise an den Salzgehalt des Substrats angepasst werden. Die Monofermentation des untersuchten ölextrahierten Algenrückstands ist bei einer Faulraumbelastung von 1,5 kg oTS/(m³*d) technisch realisierbar. Eine Ergänzung mit kohlenhydratreicher Biomasse würde sich jedoch als vorteilhaft, auch zur Abschwächung der auftretenden Ammoniakhemmung, erweisen.

3.2. Original Publikationen

Batch and Continuous Biogas Fermentation of the Fresh Water Algae *Chlorella vulgaris* - Detailed Process Analysis

Batch and Continuous Biogas Fermentation of the Fresh Water Algae *Chlorella vulgaris* - Detailed Process Analysis

Timm Adamietz¹, Wojciech Jurkowski¹, Jan Adolph² and Thomas Brück^{1*}

¹Department of Chemistry, Technical University of Munich (TUM), Munich, Germany

²DABEC-Bioenergy Consulting, Reuningstr 13, Dresden, Germany

Abstract

As algae grow about 10 times faster than terrestrial plants and their cultivation does not compete with agricultural activity, there is an enhanced interest in using algae biomass as an advanced biogas substrate. While previous reports focus on the influence of biomass pre-treatment and on biogas yields, this study examines the biogas fermentation dynamics in detail. To generate technically relevant results and delineate a recommendation for commercial biogas producers, our experimental set-up utilized a normed industrial, continuous setup according to VDI 4630 combined with regular gas and digestate analysis. This particular setup is conventionally applied for standard substrate tests when industrial customers optimize their processes. Although batch pre-experiments indicate biogas yields of 537.9 IN kg⁻¹ VS for dried *Chlorella* and 443.6 IN kg⁻¹ VS for the fresh biomass with methane concentrations of 60.0% v/v and 61.1% v/v respectively, we could not maintain these values under technically relevant organic loading rates. From our data we can conclude, that the maximum loading rate for stable continuous fermentation of *C. vulgaris* is between 1.0 and 1.5 kg VS m⁻³ d⁻¹. The main reason for this problem was sluggish digestion of proteins. This situation could be deduced by the high ammonia concentration in the fermentation broth (~ 3 g l⁻¹) as well as the high nitrogen (8 g kg⁻¹ FM) and protein (54% (w/w TS) content in the digestate. Furthermore desulfurization was required to alleviate the inhibition of methanogenesis, which was observed from 1700 ppm H₂S in the biogas. Although better fermentation efficiency might theoretically be possible by altering the fermentation conditions and adaptation of microorganisms, the degradation of proteins would ultimately lead to inhibitory ammonia nitrogen concentrations. Our cumulative data indicate that fermentation of *C. vulgaris* as monosubstrate is problematic and not advisable. The application of algae biomass as a co-substrate could be a valuable addition to any agricultural plant biomass substrate, which has a high carbohydrate content and low protein content (i.e., hydrolyzed cereal straw). Not only will the proteins increase methane concentration, but also the captured trace elements would positively influence the fermentation and fertilizer quality, which adds additional value to biogas side-product streams.

Keywords: Algae; Biogas; *Chlorella*; Continuous; Digestate analysis; Gas analysis; Methane yield; Organic loading rate

Introduction

The finite availability of fossil resources for energy generation and the resulting effects of climate change drive the industrial development of renewable energy solutions. While solar, wind and waterpower can be harnessed using only mechanical engineering, production of first and second generation biofuels that are based on terrestrial plant material are associated with land use change, reduced biodiversity and competition with food production. Microalgae grow 10 times faster than terrestrial plants and their cultivation can be accomplished on non-arable land utilizing waste-, brackish- or seawater. Therefore, algae biomass production for biofuel generation does not compete with agricultural activity and is not associated with land use change. Moreover, as algae biomass production is associated with minimal land use of 2 m²/GJ (as compared to 258 m²/GJ for rapeseed oil), there is sufficient potential to significantly contribute to a global solution for a sustainable energy supply [1]. Microalgae of the genus *Chlorella* sp., are one of the most productive biomass producers even when cultivated in simple outdoor, open pond systems using municipal wastewater [2,3]. In this configuration the algae biomass is not only a potential source of bioenergy, but it additionally facilitates wastewater treatment by the uptake of nutrients, which would otherwise lead to an eutrophication of natural water reservoirs [4]. Using algae cultures instead of the competing Anamox [5], processes for wastewater treatment is also superior in the context of nutrient recycling, as nitrogen is chemically fixed in the biomass. In contrast to the conventional Anamox process, nitrogen in algae biomass is not oxidized and released into the atmosphere. To that end, High Rate Algae Ponds (HRAP) are a

particularly successful approach, which affords water treatment at an even lower energy demand and land use than conventional wastewater systems [6]. Although the efficiencies are obviously higher in regions with consistent sunlight, an experimental pilot plant of this kind is currently operating in Wessex (UK) with good results [7].

The immense interest and development in the field of algal biofuels as seen by the rising amount of related publications [8] has reached a point, where techno-economic studies confirm the feasibility of bioenergy generation based on wastewater utilization [9]. At present, most approaches for valorisation of algal biomass rely on their high lipid content and biodiesel production [8]. Nevertheless, the downstream processing of biomass including lipid extraction and transesterification is complex and energy demanding [10]. Novel approaches like hydrogen generation or hydrothermal liquefaction-although promising-need further research and development to meet economic constraints [11]. In this context, an established and scalable

*Corresponding author: Brück T, Werner Siemens Chair of Synthetic Biotechnology, Department of Chemistry, Technical University of Munich, Lichtenberg Str. 4, 85748 Garching Near Munich, Germany, Tel: +498928913253; E-mail: brueck@tum.de

Received September 13, 2018; Accepted October 03, 2018; Published October 09, 2018

Citation: Adamietz T, Jurkowski W, Adolph J, Brück T (2018) Batch and Continuous Biogas Fermentation of the Fresh Water Algae *Chlorella vulgaris* - Detailed Process Analysis. J Bioprocess Biotech 8: 338. doi:10.4172/2155-9821.1000338

Copyright: © 2018 Adamietz T, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

technology, namely biogas fermentation, is becoming a focal interest in the algae biotechnology community, due to its process robustness and scaling flexibility. As technological simplicity, process robustness and low investment costs are of primary concern for commercial operators, direct biogas production from the algal biomass, without the need for dewatering is a straightforward route for energy production. Raw algal biomass provides only between 15-84 g/l dry matter making it inefficient in terms of organic loading rates and land use, therefore a pre-concentration step like cost efficient flocculation and potentially subsequent drying is advisable [12]. Considering excess heat production in many biogas cogeneration units an air-drying of the algal sediment prior to fermentation would also be feasible to enhance energy efficiency and reduce costs.

This study provides a thorough systematic assessment of biogas productivity in terms of total and space time yields using the freshwater algae *Chlorella vulgaris* as a feedstock. More importantly, we contrast the biogas performance of fresh and dried algae biomass samples in batch and continuous fermentation settings. Although algae cultivated in wastewater may just serve as co-substrate for existing biogas plants, their low dry matter discourages long distance transports. Utilization as a mono-substrate in dedicated plants may sometimes be the only economical solution, which is why we analyze the process stability and yields in this scenario. In this study we provide a detailed process analysis and potential optimization for algae biomass use in commercial biogas production scenarios.

Materials and Methods

Batch fermentation of *Chlorella vulgaris* fresh and dried biomass

Dry as well as fresh biomass was obtained from Roquette Klötze GmbH and Co. KG and had a total solids (TS) content of 8.8% w/w (fresh), and 88.5% w/w (dried) (Table 1). The volatile solids (VS) were 93.1 g gTS⁻¹ and 89.7 g gTS⁻¹ respectively. The data was estimated by air-drying the biomass for 24 h in an oven at 105°C (TS) and by combusting the dried sample in a muffle furnace at 550°C for 3 h. This data was used to load the fermenters with similar VS amounts, which resulted in the following composition of each kind of batch experiment:

As reference microcrystalline cellulose (Avicel) of analytical grade,

supplied by Sigma-Aldrich (Germany) was digested in order to confirm the correct project setup.

The fermentation has been conducted according to the VDI 4630 protocol to estimate the biogas yield at 38.0 ± 0.5°C in a volume of 1.400 ml filled to 2 l glass flasks. The generated biogas was measured with a gas flow meter (MilliGascounter, manufactured by Ritter, Germany). The gas composition comprising methane, carbon dioxide, oxygen, hydrogen and hydrogen sulfide was determined using a gas analyzer AwifLEX (Awite, Germany).

Continuous fermentation of *Chlorella vulgaris* fresh and dried biomass

The experiment was conducted using three batches of fresh *Chlorella vulgaris* biomass supplied by Roquette Klötze GmbH and Co. KG. The biomass analysis prior to fermentation was performed as described (2.1). Resulting data is summarized in Table 2, in order to calculate the organic loading rate (OLR). All batches were delivered at the beginning and were kept sealed in a cool and dark place.

The continuous fermentation was performed for 64 days in 30 L glass fermenters (H=100 cm; D=20 cm) equipped with central stirring, gas outlet, probing valve, temperature sensor and a spiral water heat-exchanger. Each fermenter was inoculated with 28 L fermentation broth from an agricultural biogas plant. One liter digestate was removed manually every day, while the fermenter was agitated. Subsequently, the digestate was mixed with fresh biomass and recirculated as feed to adjust for volume changes in the reaction vessel. Once a week the fill level of the fermenter was adjusted by removing digestate for sampling. During the fermentation organic loading rates (OLR) have been increased in 0.5 steps from 1.0 -3.0 kg VS m⁻³ d⁻¹ each time when the biogas production had stabilized. The temperature was held constant at 42.0 ± 0.3°C, and the agitator was working in 10 minute intervals followed by 5 minute pause rates. The gas composition and amount was measured using the same devices as described in paragraph 2.1, with the exception, that gas flows above 1 L h⁻¹ were measured with a drum type gas meter TG 0.5 (Ritter, Germany).

The resulting digestate was analysed on a weekly basis. For this purpose, samples were collected 5 h after feeding for the first 40 days and then 2 hours after feeding, due to the measured low volatile

Experiment	Blank	Reference	Chlorella dry	Chlorella fresh
Substrate	None	Cellulose	Dry algae biomass	Fresh algae biomass
Inoculum input Mean (g FM/Batch)	1400	792	790	790
Water input Mean (g/Batch)	0	610	610	475
Substrate input Mean (g FM/Batch)	0	11	14	135
pH Value at start	7.8	7.9	7.1	7.7
Fermentation time (d)	28	28	28	28

Table 1: Composition for batch fermentation experiments.

	Batch 1	Batch 2	Batch 3
TS (%)	11.0	13.4	15.0
VS (%TS)	93.8	92.0	86.2
VS (% FM)	10.3	12.4	12.9
pH	5.3	5.0	5.8

Table 2: Characteristics of the biomass batches used for the continuous fermentation, where: FM: fresh biomass.

organic acid content. Total solids (TS) and volatile solids (VS) were estimated (see 2.1). Additionally, volatile organic acids (VOA) were measured by gas chromatography (CP-3800 GC, Varian Analytical Instruments, USA). Total inorganic carbon (TIC) was measured by oxidation and IR-detection with (TOCOR 2, manufactured by Maihac, Germany). Furthermore, ammonia nitrogen (NH₄-N) was measured using a salicylate-based ammonia-nitrogen kit (supplied by Hach Lange, Germany) and a spectrophotometer (Hewlett-Packard 8453 UV-Vis PAD, Germany). After terminating the fermentation process, the digestate was additionally analysed for heavy and trace metals by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES 710 Series manufactured by Agilent Technologies, USA), as well as proximities (after Weende).

In order to suppress excessive hydrogen sulphide release one gram of desulfurizing agent Bayoxide E33 (LANXESS, Germany) was added daily, beginning from day 59.

Calculations

The cumulative gas amounts (both methane and biogas) have been corrected to normal liters (at 273, 15 K and 101325 P_a, according to DIN 1343) according to equation 1:

$$V_N = V * \frac{(P_a - P_w) * T_N}{P_N * T} \dots\dots\dots (1)$$

- Where, V_N (l) normal volume of gas,
- V (l) produced gas volume,
- P_a (Pa) atmospheric pressure at gas measurement time,
- P_w (Pa) vapor pressure of water,
- T_N (K) normal temperature: 273.15 K,
- T (K) Gas temperature.

Furthermore, the concentrations of methane and carbon dioxide have been adjusted to account for 100% of biogas (according to VDI 4630) according to the following equation:

$$C_{CO_2} = C^{mes}_{CO_2} * \frac{100}{C^{mes}_{CO_2} + C^{mes}_{CH_4}}$$

$$C_{CH_4} = C^{mes}_{CH_4} * \frac{100}{C^{mes}_{CO_2} + C^{mes}_{CH_4}} \dots\dots\dots (2)$$

- Where, C_{CO₂} (% v/v) corrected carbon dioxide concentration,
- C^{mes}_{CH₂} (% v/v) corrected methane concentration,
- C^{mes}_{CH₂} (% v/v) measured carbon dioxide concentration,
- C^{mes}_{CH₄} (% v/v) measured methane concentration.

The required amount of fresh biomass used to feed the fermenter was calculated according to its content of organic solids:

$$Feed [g * d^{-1}] = \frac{OLR * V_F}{TS_S * VS_S} \dots\dots\dots (3)$$

- Where, OLR (kg m⁻³ VS d⁻¹) Organic Loading Rate,
- V_F (m³) Fermenter volume,
- TS_S (% w/w) Total solids content of Substrate,
- VS_S (% w/w) Volatile solids content of substrate.

Results and Discussion

Batch fermentation of fresh and dried *Chlorella vulgaris* biomass

The reference sample reached 785.5 lN kg⁻¹ VS biogas yield, which confirmed the validity of the experiment, as the calculated value according to VDI 4630 is 745 lN kg⁻¹ VS ± 10%. For both fresh and dry algae biomass, 90% of total biogas was produced after 18 days fermentation (Figure 1). The biogas yield of the samples was 537.9 lN kg⁻¹ VS for dried *Chlorella* biomass and 443.6 lN kg⁻¹ VS for the fresh biomass with methane concentrations of 60.0% (v/v) and 61.1% (v/v) respectively (Figure 2). Therefore, the total methane yield of fresh *C. vulgaris* was significantly lower with 270.9 lN kg⁻¹ VS than it was the case for the dried biomass, which reached 322.6 lN kg⁻¹ VS, as was depicted in Figure 3. This might be due to cell-disrupting properties of the drying process, which led to a release of some otherwise inaccessible nutrients, such as intracellular fats and proteins. To that end, the intracellular protein yield, this for *Chlorella* biomass can be as high as 60% of cell dry weight, may have been the predominant factor in enhanced biogas production from dried biomass. These findings are however in contrast to the literature, where drying of algae was reported to decrease the biogas yield to about 80% of the reference for the similar *Chlorella kessleri*. The authors had however measured only 335 lN kg⁻¹ VS of biogas in their experiment. Another group reported biogas yields of 459 lN kg⁻¹ VS for fresh, untreated *Chlorella* sp. Biomass [13], which is very similar to our results.

In this study we could demonstrate, that dried *Chlorella* can generate similar methane yields as maize silage, which yields between 300 and 350 lN kg⁻¹ VS depending on the cultivar and harvesting time [14].

Interestingly, the our fresh algae biomass fermented more stable, reaching a maximum biogas production rate at day four followed by a rapid yield decline (Figure 1). By contrast, the dried biomass started to ferment more vigorously producing about 50% more biogas on the first day, compared to the fresh substrate. However, thereafter a decreased productivity was observed. This effect might also be explained with the higher accessibility of nutrients, such as proteins or simple sugars, which upon hydration immediately dissolve in the fermentation broth, without the need of complex hydrolysis. When this reservoir was depleted, the residual dry biomass requires additional time for the full hydration of components necessary for adsorption of

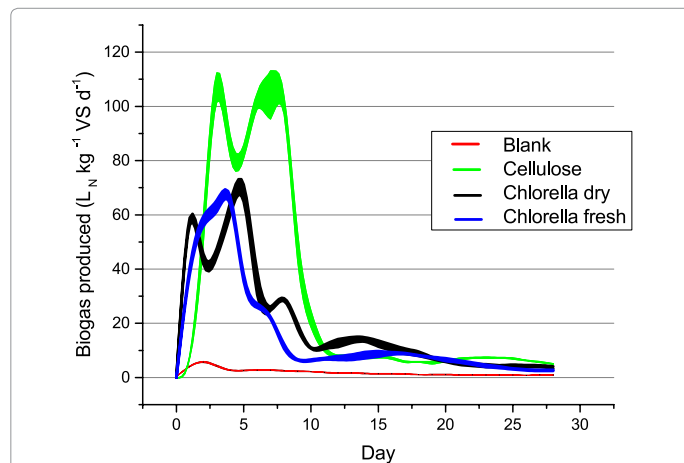


Figure 1: Daily biogas production during batch fermentation of *C. vulgaris*. Mean from 3 samples. Line thickness represents standard deviation.

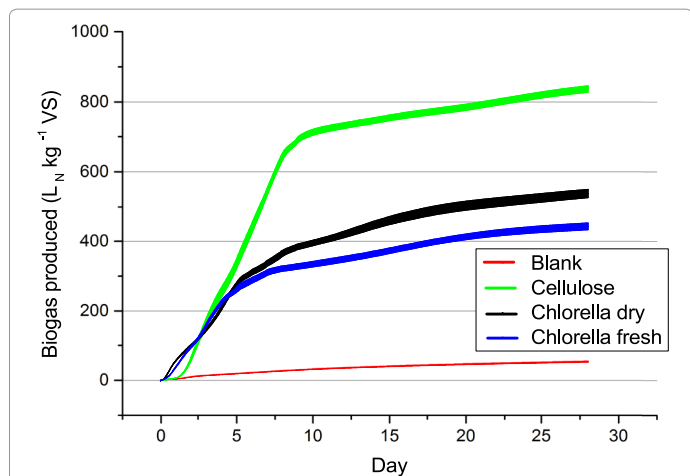


Figure 2: Cumulative biogas production during batch fermentation of *C. vulgaris*. Mean from 3 samples. Line thickness represents standard deviation.

enzymes, which enable subsequent depolymerisation of carbohydrate polymers (i.e., amorphous cellulose, hemicellulose) and proteins into fermentable components such as amino acids and monomeric sugars. In consequence, this scenario delays the fermentation process. An analogous fermentation pattern can be observed with cellulose, which also is a dry carbohydrate polymer substrate. With the applied cellulose sample, the carbohydrate degree of polymerization and crystallinity is even higher than in dried algae cell walls. Therefore, an extended time period was required to enzymatically generate fermentable monomeric sugars (glucose), which translates into an even longer lag phase preceding significant biogas yields.

Continuous fermentation of *Chlorella vulgaris* fresh and dried biomass

Initially, the fermentation was stable, as indicated by a low VOA/TIC ratio reaching 0.25 at the time, when the experiment was terminated after 64 days with an OLR of 3.0 kg VS m⁻³ d⁻¹ (Figure 4) Subsequently, new batches of algae biomass were introduced at day 16, and 52. The second batch led to an approximately 25% decrease in daily

biogas production, which slowly regenerated within the next 7 days. This effect however, can be also attributed to the increase of the loading rate, which occurred 3 days previously. The introduction of the third batch did not significantly influence the fermentation in any respect.

At a loading rate of one kg VS m⁻³ d⁻¹, the specific biogas yield was approximately 500 lN kg⁻¹ VS d⁻¹, which accounts for 94% or 114% of the biogas yield achieved in the batch experiment with dried and fresh *Chlorella* respectively. At this point, the hydraulic retention time in the fermenter with about 103 days was far longer than in the batch experiment. According to the results of the batch experiment the required time for 90% biogas yield was only 18 days, hence the loading rate could have been even 5 times higher. In practice, the stepwise increase was followed by a significant decrease of the biogas yield as shown in Tables 3 and 4 (Figures 5 and 6). Interestingly it is evident, that with increasing fermentation time the methane concentration increased up to day 50 from 57% v/v to 63% v/v meaning that more fats (70% v/v methane) or proteins (75% v/v methane) were hydrolyzed and converted to methane. Another possibility is the accumulation of micronutrients in the fermenter, as the analysis of digestate after the terminated fermentation process (Table 5) shows unusually high concentrations of heavy and trace elements. While this is not unexpected, because microalgae have a tendency for metal uptake from the environment [15], the consequences on the biogas yield and methane concentration might be immense and are usually positive in the measured concentration range [16].

The decline of the methane concentration observed from day 51 might originates from a small fermentation instability, which is also reflected in the much higher amount of organic acids (VOA/TIC at 0.23 as compared to 0.13 during the previous measurements). This event might be a consequence of high hydrogen sulfide concentrations (over 1700 ppm, see Figure 7) leading to an inhibition of methanogenesis and accumulation of undigested hydrolysis products.

Both the total solids as well as volatile solids (Figure 6) have started to steadily cumulate since day 25 and reached 7,8% w/w and 82% w/w respectively by the end of fermentation. The tendency of decreasing fermentation efficiency is also reflected in the biogas yield, which dropped from 506.8 in lN kg⁻¹ VS d⁻¹ at the start of the experiment to

Experiment	Blank	Reference	Chlorella dry	Chlorella fresh
Substrate	None	Cellulose microcrystalline	Dry algae biomass	Fresh algae biomass
Specific gas yield 1N kg FM	1.9 ± 0.1	776.5 ± 10.4	463.4 ± 12.6	52.1 ± 1.4
Specific gas yield lN kg VS	53.8 ± 2.1	823.5 ± 11.1	537.9 ± 14	443.6 ± 12.1
Specific methane yield lN kg VS	26.6	423.1	322.6	270.9
Mean methane content %	49.4	50.5	60	61.6
Mean carbon dioxide content %	22.1	47.0	37.7	37.7
pH after fermentation	7.7	7.7	7.7	7.5

Table 3: Results of batch fermentation experiments.

Fermentation time (d)	7	14	21	28	35	42	49	56	63
TS (% FM)	5.7	6.0	5.6	6.1	6.5	6.6	6.7	6.9	7.8
VS (% TS)	73.0	73.9	74.0	76.8	78.0	79.6	80.5	82.0	82.4
VOA/TIC	0.13	0.17	0.14	0.19	0.13	0.13	0.23	0.20	0.25
pH	7.6	7.8	7.8	7.8	7.8	7.9	7.8	7.8	7.8
NH ₄ -N (mg/l)	2 970	2 700	2 910	2920	3 110	3 180	3 210	3 490	3 460
C ₂ -C ₆ (mg/l)	<20		<20		<20		<20		<20
Acetic acid (mg/l)	170	-	120	-	430	-	660	-	590
Sampling time (h after feed)	5	5	5	5	2	2	2	2	2

Table 4: Overview of the digestate analysis from continuous fermentation of *C. vulgaris*.

340 in $\text{LN kg}^{-1} \text{VS d}^{-1}$ at the end of the fermentation.

The ammonia nitrogen content was high, yet not in the range of inhibition. However, the total nitrogen of 8.0 g kg^{-1} indicates, that still high amounts were bound in the organic matter. The proximate analysis presented in Table 6 confirms this assumption, showing that 54.3% w/w of the digestate solid substance consists of nitrogen containing proteins which have not been degraded yet. Lipids and polysaccharides have been degraded fairly well with 3.6% w/w and 9.5% w/w remaining in the digestate respectively. Numerous literature reports demonstrate, that *Chlorella* can produce >50% w/ dry cell weight of protein if cultivated under non-limiting conditions [17]. According to our data this protein is not easily degradable in a biogas plant, leading to relatively a low biogas yield. On the other hand, if the remaining proteins were digested, the amount of dissolved nitrogen content might have risen above the inhibition level of 3.5 g l^{-1} [18]. This would have caused problems with the fermentation. It is likely, that non hydrolyzed proteins accumulated over the entire fermentation period, since the concentration of dissolved nitrogen did not significantly increase with increased loading rate. While the biogas production at the end of the fermentation was almost double (28.6 LN d^{-1}) as compared to the start of the experiment (14.6 LN d^{-1}), the ammonium-nitrogen had increased from 2970 mg l^{-1} to only 3460 mg l^{-1} , indicating that no more proteins were hydrolyzed to amino acids, which could have been metabolized by the microbial biogas consortium.

The hydrogen sulfide concentration in the biogas (Figure 7) was low in the first 10 days and started to steadily increase up to day 40, when unexpectedly a strong decrease was observed. This correlated with the increase of the feeding rate from 2.0 to 2.5 kg VS m^{-3} , which induced a significant increase of the specific biogas yield. After this temporary event, the concentration returned to its previous level of approx. 1700 ppm within the next 5 days. The addition of the desulfurizing agent reduced this concentration from day 59 to below 800 ppm. This in turn led to a slow but steady increase of the specific biogas yield in the final days of fermentation. In this context, it is worth mentioning, that H_2S is a degradation product of sulfur containing amino acids, such as methionine and cysteine. Its elevated concentration clearly indicates the slightly increased digestion of proteins, subsequently leading to higher methane concentrations [19].

Conclusions

We have investigated the biogas fermentation of *Chlorella vulgaris* - one of the main industrially available microalgae species. Our initial batch fermentation experiments have demonstrated relatively high biogas yields of up to $537.9 \text{ LN kg}^{-1} \text{VS}$ for dried *chlorella* and $443.6 \text{ LN kg}^{-1} \text{VS}$ for the fresh biomass with methane concentrations of 60.0% v/v and 61.1% v/v respectively. While these initial data were promising, these biogas yields could not be reproduced in a commercially relevant continuous fermentation setting. Our results demonstrate that utilization of *Chlorella* biomass as mono-substrate is problematic, due to its high protein content. A seemingly stable fermentation has led to a severe accumulation of unfermented organic matter, which resulted in 54% protein by dry weight in the digestate. With the applied process setting, it was impossible to maintain reasonable biogas yields at elevated biomass concentrations. Particularly, at loading rates above $2.0 \text{ kg VS m}^{-3} \text{d}^{-1}$ the biogas yield dropped to under $400 \text{ LN kg}^{-1} \text{VS d}^{-1}$. Simultaneously, volatile solids in the fermenter started to accumulate at $1.5 \text{ kg VS m}^{-3} \text{d}^{-1}$ and reached 82% w/w of total solids at the end of the experiment. Based on our cumulative data, we conclude, that the maximum loading rate for continuous fermentation of *C. vulgaris*

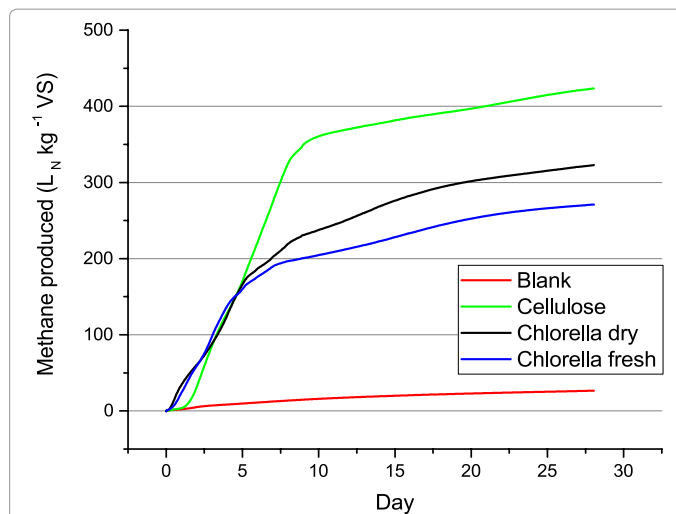


Figure 3: Cumulative methane production during batch fermentation of *C. vulgaris*. Mean from 3 samples.

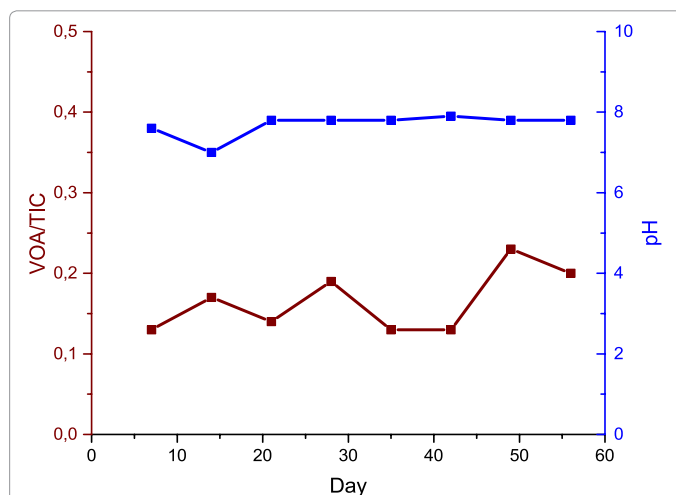


Figure 4: pH value and VOA/TIC during continuous fermentation of *C. vulgaris*.

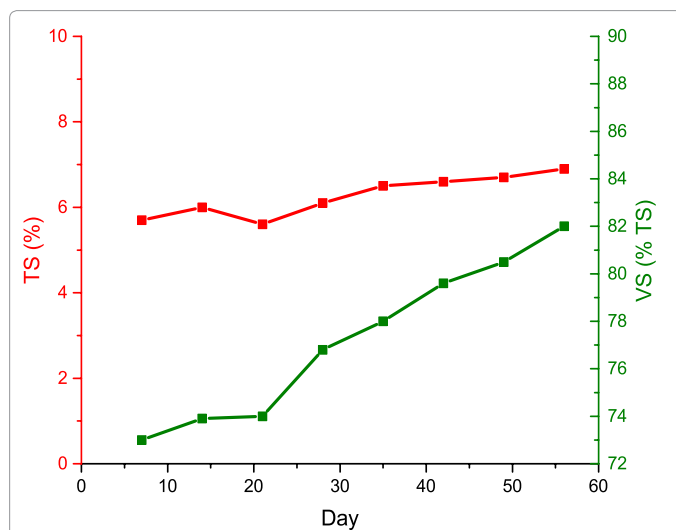
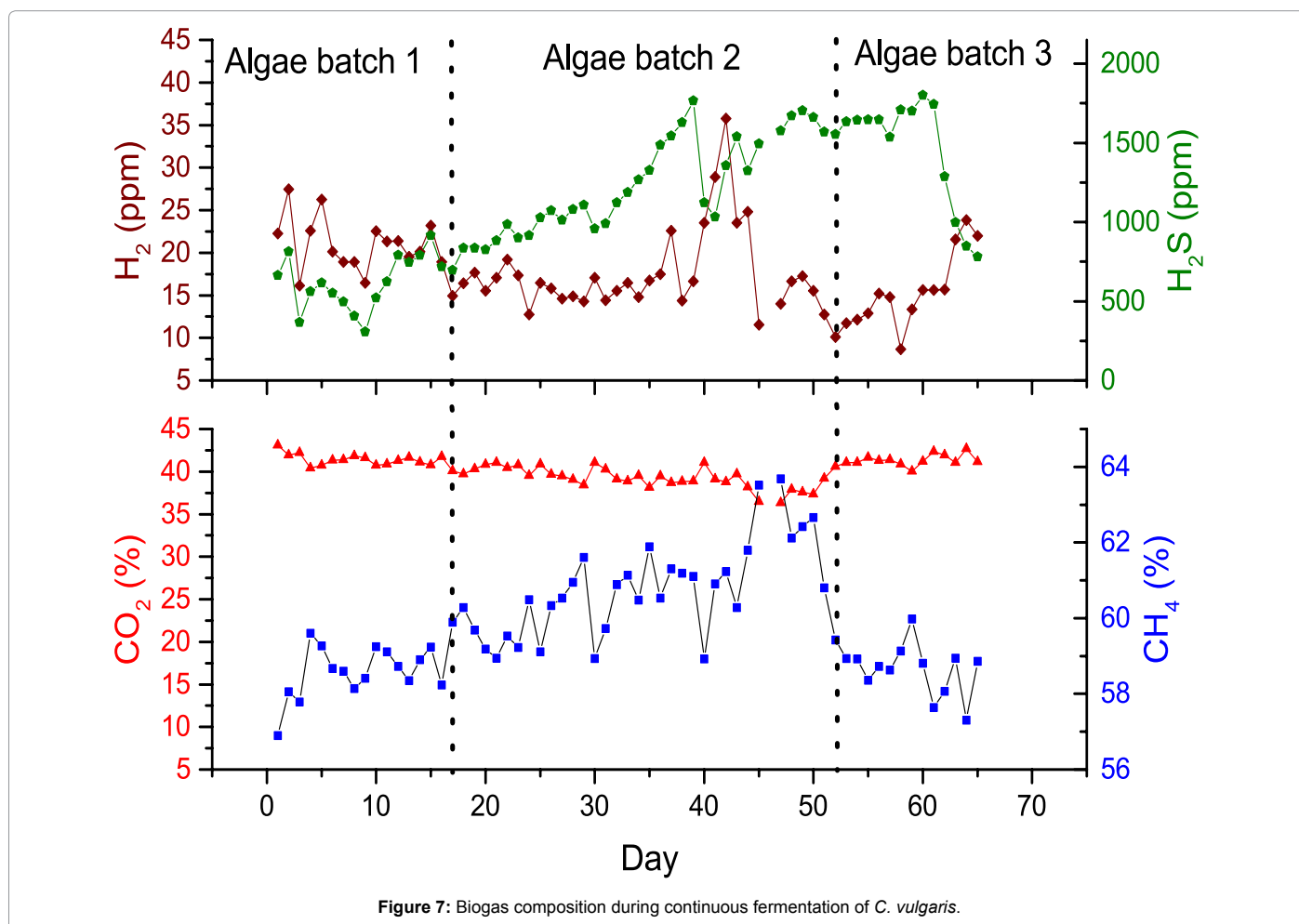
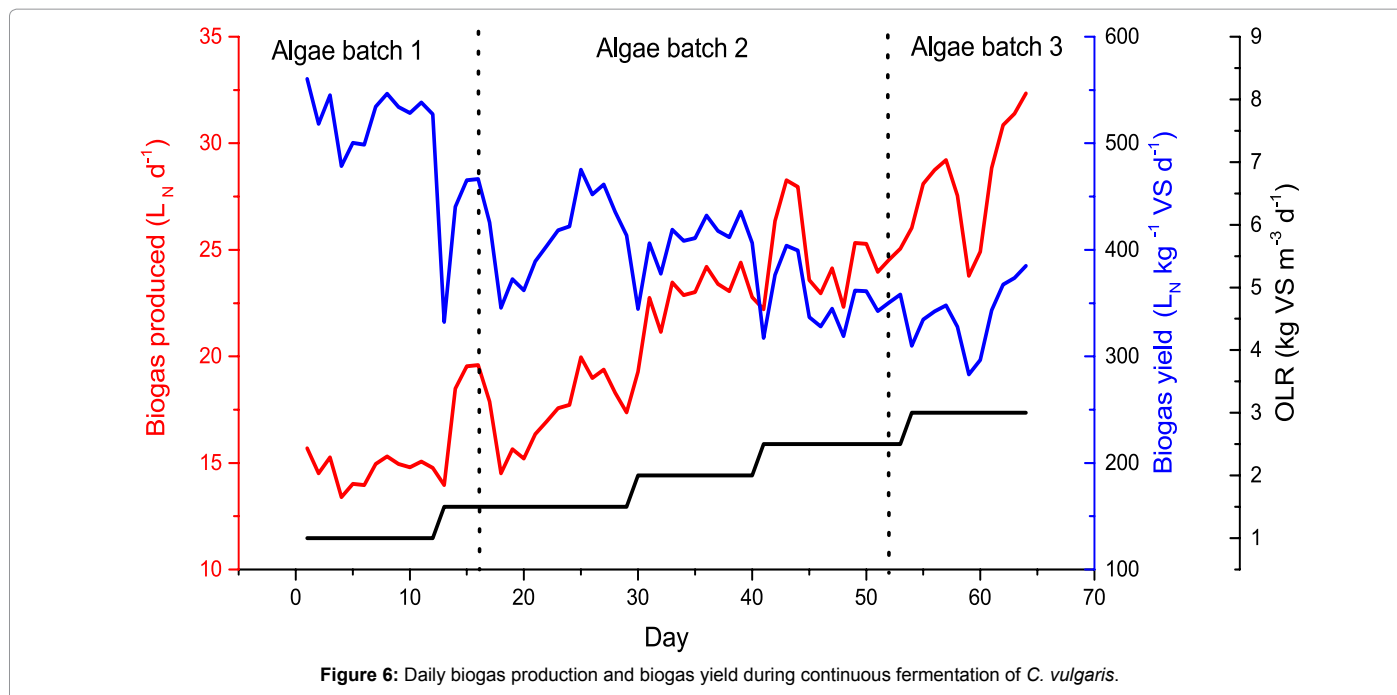


Figure 5: TS and VS during continuous fermentation of *C. vulgaris*.



Day of fermentation	Organic loading rate (OLR) (kg VS m ⁻³ d)	Mean biogas production (IN d)	Mean biogas yield (IN kg VS d ⁻¹)
1-13	1.0	14.6 ± 0.6	506.8 ± 58.7
13-29	1.5	17.8 ± 1.6	417.2 ± 42.3
29-40	2.0	23 ± 0.9	404 ± 32.5
41-53	2.5	25.1 ± 1.8	353.2 ± 28.2
54-64	3.0	28.6 ± 2.7	340.2 ± 32.1

Table 5: Mean biogas production from continuous fermentation of *C. vulgaris* by OLR.

Pb mg kg TS	Cd mg kg TS	As mg kg TS	Cr mg kg TS	Cu mg kg TS	Ni mg kg TS	Zn mg kg TS	Mn mg kg TS
14	<0.26	<3.9	26	560	22	300	210
Se mg kg TS	Fe mg kg TS	Co mg kg ⁻¹ TS	B mg kg ⁻¹ TS	Mo mg kg ⁻¹ TS	Hg mg kg ⁻¹ TS	N tot g kg ⁻¹ FM	NH ₄ -N g kg ⁻¹ FM
<0.32	2500	9.3	26	<0.65	<0.04	8	3.11
P g kg ⁻¹ FM	P ₂ O ₅ g kg ⁻¹ FM	K g kg ⁻¹ FM	K ₂ O g kg ⁻¹ FM	Mg g kg ⁻¹ FM	MgO g kg ⁻¹ FM	Ca g kg ⁻¹ FM	CaO g kg ⁻¹ FM
2.4	5.5	2.8	3.4	0.5	0.8	0.9	1.3
Na g kg ⁻¹ FM	S g kg ⁻¹ FM	Ash %TS	Protein %TS	Fiber %TS	Fat %TS		
0.3	0.33	18.3	54.3	9.5	3.6		

Table 6: Digestate analysis after finished continuous fermentation of *C. vulgaris*.

was between 1.0 and 1.5 kg VS m⁻³ d⁻¹, however this quantity may be strongly dependent on bioreactor geometry and pretreatment, as well as potential adaptation of microorganisms over extended time periods. The biogas contained approx. 1700 ppm H₂S and required desulfurization to overcome inhibition. Although ammonium nitrogen was low, an otherwise welcome increase of substrate degradation rate would raise its concentration above the inhibition limit. In summary, we would not advise a biogas plant operator to ferment *C. vulgaris* as mono-substrate but use it in combination with protein poor, carbohydrate rich substrates such as cereal straw. As the latter predominantly consists of cellulose and hemicellulose polymers, it has to be enzymatically hydrolyzed prior to fermentation to release fermentable sugars. In combination, the protein rich algae biomass would be a valuable addition to any agricultural plant, based on carbohydrates. In that regard, algae derived proteins will increase methane concentration and capture trace elements, which would positively impact the fermentation and resulting digestate fertilizer quality, thereby increasing the value to this biogas side-stream. In that regard, the combination of algae biomass with hydrolyzed agricultural residues, such as cereal straw or wood chips, represent an advanced biogas substrate admixture with an optimal C/N ratio, which does not compete with agricultural food production. Hence, the combination of algae biomass and agricultural waste streams for biogas production is in line with governmental targets that increasingly impose legislative and economic barriers on conventional biogas substrates, such as maize silage. It is therefore recommended, that commercial biogas producers may start to include algae biomass cultivated on waste water (or other non-fresh water resources) and non-arable land in their substrate portfolio.

References

- Singh A, Nigam PS, Murphy JD (2011) Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresour Technol* 102: 10-16.
- Kothari R, Pathak VV, Kumar V, Singh DP (2012) Experimental study for growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: An integrated approach for treatment and biofuel production. *Bioresour Technol* 116: 466-470.
- Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, et al. (2010) Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl Biochem Biotechnol* 162: 1174-1186.
- Rawat I, Ranjith Kumar R, Mutanda T, Bux F (2011) Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 88: 3411-3424.
- Cao Y, van Loosdrecht MCM, Daigger GT (2017) Mainstream partial nitrification-anammox in municipal wastewater treatment: Status, bottlenecks, and further studies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101: 1365-1383.
- Young P, Taylor M, Fallowfield HJ (2017) Mini-review: High rate algal ponds, flexible systems for sustainable wastewater treatment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33: 117.
- Tunncliffe H (2017) Wessex Water and Bath trial algae treatment. *The Chemical Engineer*.
- Azadi P, Malina R, Barrett SRH, Kraft M (2017) The evolution of the biofuel science. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 76: 1479-1484.
- Xin C, Addy MM, Zhao J, Cheng Y, Cheng S, et al. (2016) Comprehensive techno-economic analysis of wastewater-based algal biofuel production: A case study. *Bioresour Technol* 211: 584-593.
- Mubarak M, Shajia A, Suchithra TV (2015) A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Research* 7: 117-123.
- Chiaromonti D, Prussi M, Buffi M, Rizzo AM, Pari L (2017) Review and experimental study on pyrolysis and hydrothermal liquefaction of microalgae for biofuel production. *Applied Energy* 185: 963-972.
- Mussgnug JH, Klassen V, Schlüter A, Kruse O (2010) Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J Biotechnol* 150: 51-56.
- Bohutskyi P, Betenbaugh MJ, Bouwer EJ (2014) The effects of alternative pretreatment strategies on anaerobic digestion and methane production from different algal strains. *Bioresour Technol* 155: 366-372.
- Eder B, Eder J, Papst C, Darnhofer B, Mukengele M, et al. (2009) Welcher Maissortentyp zur Biogaserzeugung. *International Science Conference Biogas Science* 1: 57-72.
- Fraile A, Penche S, González F, Blázquez ML, Muñoz JA, Ballester A (2005) Biosorption of copper, zinc, cadmium and nickel by *Chlorella vulgaris*. *Chem Ecol* 21: 61-75.
- Piorreck M, Baasch KH, Pohl P (1984) Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochem* 23: 207-216.

17. Demirel B, Scherer P (2011) Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. Biomass and Bioenergy 35: 992-998.
18. FNR (2016) Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung.
19. Sánchez Hernández EP, Travieso Córdoba L (1993) Anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris* for energy production. Resources, Conservation and Recycling 9: 127-132.

Biogas yields and composition from oil-extracted halophilic algae residues in conventional biogas plants operated at high salinities



Biogas yields and composition from oil-extracted halophilic algae residues in conventional biogas plants operated at high salinities

Timm Adamietz¹ · Wojciech Jurkowski¹ · Jan Adolph² · Thomas B. Brück¹

Received: 22 April 2019 / Accepted: 28 July 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

CO₂-induced climate change drives the development of renewable processes for industrial products. Algae processes can actively fix and convert CO₂ into value adding products, such as oils. Algae lipids hence counteract climate change and provide access to renewable commodities. In this context, valorization of algal residues remaining after oil extraction is a challenge for the emerging cyclic bioeconomy. This study focuses on the valorization of oil-extracted algae residues derived from the halophilic strain *Scenedesmus obliquus* via anaerobic digestion. We examined the effect of prior oil extraction on microbial digestibility and increasing salt content in the substrate with regard to biogas yield and composition. Our cumulative data demonstrate that the supercritical CO₂ oil extraction acts as a physical pretreatment that facilitates enhanced hydrolysis of both polymeric cell wall carbohydrates and cellular proteins, providing methane yields of 213.2 L_N kg⁻¹ VS day⁻¹. Methane yields were 20% higher than literature values obtained with the same algae strain in the absence of prior oil extraction. We obtained these superior results albeit all lipids and nonpolar proteins had been extracted from the biogas substrate. Our data indicate that continuous anaerobic digestion without loss of fermentation efficiency is feasible up to a salt concentration of 2% w/v, if conventional, agricultural biogas plants are gradually adapted to the salt content of the substrate. Monofermentation of the investigated oil-extracted algae residue is technically feasible at loading rates of 1.5 kg VS m⁻³ day⁻¹, but a supplementation with carbohydrate rich biomass would prove beneficial to alleviate ammonia inhibition.

Keywords Biogas · Salinity · Algae residue · Adaptation · NaCl · Supercritical CO₂ extraction

Introduction

Climate change and looming costs of CO₂ certificates drive the development of renewable, CO₂ saving processes in the chemical, cosmetic, food and pharmaceutical industries. Recently, bioprocesses utilizing microalgae have been flagged as a potential route to photosynthetically convert CO₂ into renewable lipid building blocks for the generation of oleochemicals, performance food additives and bio-fuels [1]. Therefore, numerous studies have focused on optimizing algae biomass production and target product extraction

methodologies [1]. Today, lipid yields of above 50% weight lipid/dry cell weight are not uncommon under controlled conditions. This was achieved for example with the microalgae strain *Scenedesmus obliquus* under nitrogen or phosphorus starvation [2]. Moreover, new downstream processing methodologies enable solvent-free and food-grade quality of the extracts [3]. However, the lipid products generated for biofuel application are of a rather low value, which demands technically simple and cost efficient algae cultivation and extraction methodologies. This can only be realized using open pond instead of closed photobioreactor systems [4]. Unfortunately, the cultivation of fresh water algae strains in such open pond systems poses a significant threat for process stability, due to variations in temperature and irradiation as well as introduction of terrestrial contaminants, such as bacteria and fungi [5]. The latter issues of contamination can be controlled or eliminated if halophilic algae strains are used for production of value adding products, such as lipids [5]. In addition, the use of halophilic algae circumvents the need for fresh water resources, which results in a reduction of process

✉ Thomas B. Brück
brueck@tum.de

¹ Werner Siemens Chair of Synthetic Biotechnology, Department of Chemistry, Technische Universität München (TUM), Lichtenberg Str. 4, Garching D-85748, Bavaria, Germany

² DABEC, Dr. Jan Adolph Bioenergy Consulting, Reuningstraße 13, Dersden D-01169, Saxonia, Germany

costs and eliminates the competition with agricultural activity, thereby improving the eco-efficiency footprint of the process. Interestingly, only minimal amounts of salts are carried over into the oil product after algae biomass extraction with supercritical carbon dioxide [6]. Hence, most of the salt remains in extracted algae biomass residues, constituting cell wall and non-polar compounds. The valorization of this residue is essential to the overall economic viability of the process. Therefore, in this study we have evaluated the utilization of oil-extracted salt containing algae biomass residue by applying anaerobic digestion to generate biogas and digestate fertilizer.

In our previous work, we have investigated the feasibility of biogas fermentation of microalgae biomass in standard agricultural biogas plants [7]. Therein, we concluded that co-fermentation of limited amounts of freshwater algae would prove beneficial for the plant operator. In this article, we evaluate the utilization of oil-extracted halophilic algae biomass residues in conventional biogas plants. A central focus of the current study was the biogas yield and process stability in the presence of algae biomass that contains increasing salt concentrations. In general, the issue salt stress during anaerobic digestion is not only relevant for halophilic algae and their byproducts but also extends to other biogas substrates, such as land fill leachate that contains high concentrations of ammonium chloride and sodium hydrogen carbonate [8]. Similarly, marine fish cultivation sludge [9], kitchen food waste [10], by-products of meat processing [11] or dairy wastewater [12] also contains a high salt content, which affects biogas process performance. Previous experimental evidence shows that low salt concentrations promote methanogenesis [13], while increased salinity will eventually lead to a complete inhibition and even shift to carboxylate production [14]. As with many inhibitory effects, their extent can be limited by slow adaptation of the microorganism, as was already demonstrated for sodium chloride addition [15, 16].

In this study, we evaluated the fermentation efficiency of lipid extracted algae biomass residues in conjunction with increasing salt concentration during fermentation. For this purpose, we initially conducted batch experiments with four different NaCl concentrations which were followed up with continuous experiments at gradually increasing salt concentration.

Materials and methods

The green algae *S. obliquus* was cultivated without NaCl and extracted with supercritical carbon dioxide as described by Lorenzen et al. [6]. For all biogas fermentations, lyophilized algae residue was used as a substrate. Total solids (TS) as well as volatile solids (VS) were estimated to be

92.5 g g_{FM}⁻¹ and 87.7 g g_{TS}⁻¹, respectively. The data were generated by air drying the biomass for 24 h in an oven at 105 °C (TS) and by combusting the dried sample in a muffle furnace at 550 °C for 3 h (VS). Furthermore, to inoculate the fermenter and for the blank run, digestate from an agricultural biogas plant operated at high salinity was used. Prior to the experiment, its TS was measured to be 4.8 g g_{FM}⁻¹ and VS 65.7 g g_{TS}⁻¹.

Based on the above values, an algae suspension of 14% w/w was prepared and added for each batch. Then, the salt concentration was adjusted accordingly.

Batch fermentation experiments were conducted according to the VDI 4630 protocol to estimate the biogas yield at 37.2 ± 2.4 °C in a volume of 1400 ml filled to 2 l glass flasks. The generated biogas was measured with a gas flow meter (MilliGascounter, manufactured by Ritter, Germany). The gas composition comprising methane, carbon dioxide, oxygen, hydrogen and hydrogen sulfide was determined using a gas analyzer AwiFLEX (Awite, Germany). Conductivity was measured by a handheld conductivity meter Almemo 2490 (Ahlborn, Germany). All experiments were performed for 28 days in triplicates.

The continuous fermentation experiment was performed for 70 days in 30 l glass fermenters ($H = 100$ cm $D = 20$ cm) equipped with central stirring, gas outlet, probing valve, temperature sensor and a spiral water heat-exchanger. Each fermenter was inoculated with 28.0 l fermentation broth from an agricultural biogas plant. The organic loading rate (OLR) was 1.0 kg VS m⁻³ day⁻¹ up to day 50 and was then increased to 1.5 kg VS m⁻³ day⁻¹ until the end of experiment. Feeding was performed by adding biomass suspended in 250 ml deionized water with the desired amount of sodium chloride every 24 h. On 4–5 days a week, a small sample from the fermenter was taken to measure conductivity prior to additional feeding. Once a week the fill level of the fermenter was adjusted by removing digestate for sampling. The temperature was held constant at 42.1 ± 0.3 °C, and the agitator was working in 10 min intervals followed by 5 min pause. After 60 days, the feeding was interrupted to check if any more digestion of the accumulated biomass was still commencing. The gas composition and amount were measured using the same devices as described for batch experiments with the exception that gas flows above 1 l h⁻¹ were measured with drum type gas meters TG 0.5 (Ritter, Germany).

The resulting digestate was analysed on a weekly basis. For this purpose, samples were collected 5 h after feeding. Total solids (TS) and volatile solids (VS) were estimated (see 2.1). Additionally, volatile organic acids (VOA) were measured by gas chromatography (CP—3800 GC, Varian Analytical Instruments, USA). Total inorganic carbon (TIC) was measured by oxidation and IR detection with (TOCOR 2, manufactured by Maihac, Germany) Furthermore, ammonia

nitrogen ($\text{NH}_4\text{-N}$) was measured using a salicylate-based ammonia–nitrogen kit (supplied by Hach Lange, Germany) and a spectrophotometer (Hewlett-Packard 8453 UV–Vis PAD, Germany). After terminating the fermentation process, the digestate was additionally analysed for heavy and trace metals by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES 710 Series manufactured by Agilent Technologies, USA). All gas amounts have been corrected to normal liters according to DIN 1343 and underwent 100% correction as described elsewhere [7].

Results and discussion

Batch fermentation

Key fermentation results for all tested salt concentrations are presented in Table 1. The gas generated in the blank (inoculum) is already subtracted from the depicted biogas and methane yields of the samples.

A previous report has suggested that the green algae *S. obliquus* does not ferment well without pre-treatment yielding only $177.94 L_N \text{ kg}^{-1}$ VS of methane, because of the extraordinary durability of the sporopollenin-like cell wall biopolymers [17]. Fermentation of the same strain after our extraction procedure yielded $213.2 L_N \text{ kg}^{-1}$ VS methane. Considering that our algae biomass residue does not contain any lipid, which potentially could boost biogas yields, it is surprising that we could detect a 20% increase in biogas yield compared to literature data. While carbohydrates alone ferment with a theoretical methane concentration of only 50% v/v in the biogas product, we could detect a methane concentration of 64.5% v/v, which indicates that high amounts of cytoplasmatic protein were available and digested [18]. The cumulative data indicate that the supercritical lipid extraction also acted as a biomass pretreatment, which liberated both polymeric cell wall carbohydrates and cellular protein for biogas production. Nevertheless, while these data were surprising we obtained even more biogas

product in an identical setup with non-extracted *Chlorella vulgaris* biomass, which provided yields comparable to maize silage [7]. Hence, current results indicate that the physically disrupted cell wall might still be mostly inaccessible for enzymes present during anaerobic digestion. This would lead to an accumulation of fiber represented as an increase of total solids detected in our continuous experimental setup (see Fig. 3).

When comparing different salinities, the experiments suggest that biogas yields from halophilic, oil-extracted algae residues were only slightly affected by NaCl concentrations up to 0.76% w/w. However, at a salt concentration of 3% w/w, which simulates seawater, almost no biogas was generated, indicating that the ultimate inhibitory level of NaCl is slightly below the sea water content. These data are in good agreement with other publications reporting that biogas production was severely inhibited at salinities of 1% [9] or 1.2% [12]. The daily biogas production for different salinities depicted in Fig. 1 shows only a difference between days 2 and 7, where the maximum biogas yield is obtained.

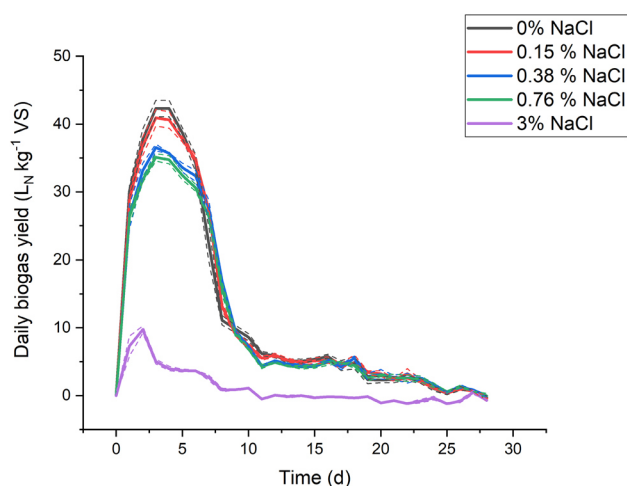


Fig. 1 Daily biogas yield during batch fermentation. Dashed lines represent the standard error

Table 1 Composition for batch fermentation experiments

Substrate	Blank	<i>Scenedesmus obliquus</i> extraction residue				
		0%/0%	2%/0.15%	5%/0.38%	10%/0.76%	40%/3%
NaCl concentration In algae suspension/total	–					
Inoculum input	1600	880	880	880	880	880
Mean (g_{FM}/batch)						
Water input	0	521	520	520	520	521
Mean (g/batch)						
Substrate input	–	16	16	16	16	16
Mean (g_{FM}/batch)						
pH value at start	7.9	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
Conductivity at day 1 (mS cm^{-1})	32	22.3	24.6	27.8	32.9	62.2
Fermentation time (day)	28					

Even here, only the amplitude of biogas production and not the general trend of productivity over the fermentation period was affected. Detailed inspection of the experimental data in Table 2 reveals that the methane yield slightly decreased with an increasing salt concentration. Upon addition of slight NaCl amount ($C=0.15\%$) a 4% (60.3% v/v, see Table 2), decline of methane concentration was detected. With respect to the microbial biogas community, it is feasible that methanogens are the first group of microorganisms to suffer from salt stress. A further increase of NaCl concentration from 0.38 to 0.76% w/v initiated a drop of biogas yield by $20 L_N \text{ kg}^{-1} \text{ VS}$ (6% decrease), without any further change of methane concentration. In contrast, the change in methane yield and concentration between 0.15 and 0.38% NaCl was negligible. Based on our data, we cannot confirm that low concentrations of sodium chloride promote biogas production, as was proposed by other authors [13]. In this context, it is however noteworthy that the supplied inoculum already was adapted to high saline operating conditions as indicated by the conductivity of 32 mS cm^{-1} (see Table 1).

The conductivity data can also be used to extract further information about the process. In this context, it has been already demonstrated that rising conductivity can be directly correlated to ammonium nitrogen released during digestion of protein rich biomass [19]. This in turn enables it to be used as an indicator of biomass hydrolysis [20]. The highest increase of 3.7 mS cm^{-1} was observed in the experiments without NaCl supplementation; however, conductivity has risen concurrently in other batches (between 3.3 and 3.5

mS cm^{-1}), except for the fermentation with 3% NaCl. In the latter experiments, the conductivity exceeding initial values by 1.7 mS cm^{-1} . This suggests that hydrolysis was almost equally efficient under all tested salt concentrations below 3%, where only partial inhibition occurred. Therefore, the small decrease in methane yield should rather be attributed to problems during subsequent digestion stages: acidogenesis and methanogenesis, with the latter being more sensitive to salinity.

Continuous fermentation

In general, the mean gas and methane yields during continuous experiment were between 17 and 34% lower than after batch experiments, although the organic loading rate (OLR) remained fairly low at $1.0 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ for the first 50 days. Interestingly, the increase of OLR to $1.5 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ had almost no negative influence on the gas yields—see Table 3. In addition, the gas composition remained remarkably stable throughout the experiment (see Table 4, Fig. 2), even though significant fluctuations of gas production have been observed (see Fig. 3). It is noteworthy that on days 55, and 56 the observed gas yields exceeded even those of batch experiments reaching $360 L_N \text{ kg}^{-1} \text{ VS}$.

Both ammonium nitrogen and volatile organic acids remained stable, with only small accumulations over the fermentation time (Table 5). An examination of the digestate composition confirms that most of the nitrogen containing proteins were hydrolyzed, as the total nitrogen was only

Table 2 Summary of batch fermentation results * gas production was too low to measure exact methane concentration

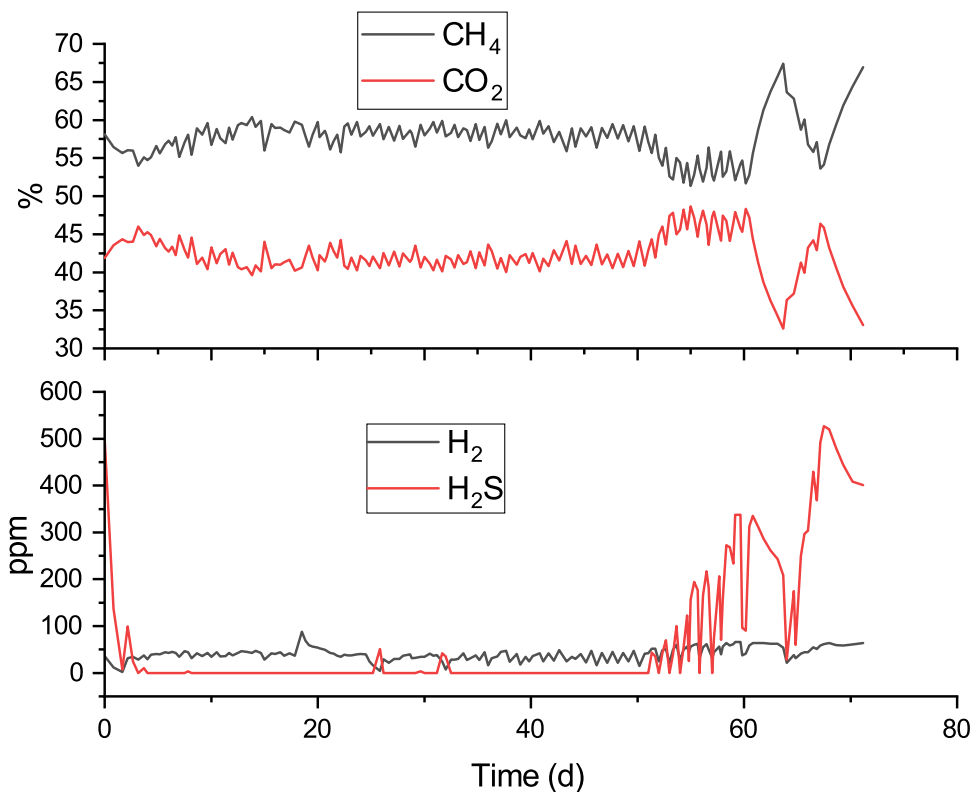
Substrate	Blank	<i>Scenedesmus obliquus</i> extraction residue				
		0%	2%/0.15%	5%/0.38%	10%/0.76%	40%/3%
NaCl in algae suspension/total	–					
Biogas yield $L_N \text{ kg}^{-1} \text{ FM day}^{-1}$	0.9 ± 1	281.3 ± 17.9	271.4 ± 11.1	272.1 ± 3.8	255.5 ± 4.6	24.9 ± 2.1
Biogas yield $L_N \text{ kg}^{-1} \text{ VS day}^{-1}$	29.3 ± 1.7	346.8 ± 22.0	334.7 ± 13.7	335.5 ± 4.7	315.0 ± 5.6	30.7 ± 2.7
Methane yield $L_N \text{ kg}^{-1} \text{ VS day}^{-1}$	14.4	213.2	201.7	198.8	187.2	5.4*
Mean CH_4	49.1	64.5	60.3	59.2	59.4	21.6*
Mean CH_2	11.1	32.8	32.8	32.6	32.9	22.4
Final pH	7.7	7.6	7.6	7.5	7.5	7.3
Final conductivity mS cm^{-1}	34.5	26.0	28.0	31.2	36.4	63.9

Table 3 Biogas production and yield during continuous fermentation

Organic loading rate ($\text{kg VS m}^{-3} \text{ day}^{-1}$)	Salt concentration feed (%)	Mean daily gas production ($L_N \text{ day}^{-1}$)	Mean daily gas yield ($L_N \text{ kg}^{-1} \text{ VS day}^{-1}$)
1.0	–	7.2 ± 1.6	258 ± 56
1.0	5	7.9 ± 1.2	284 ± 44
1.0	7	8.2 ± 0.3	294 ± 12
1.0	10	7.3 ± 0.7	251 ± 20
1.5	10	10.9 ± 1.1	263 ± 25
–	20	8.4 ± 0.4	–

Table 4 Biogas composition during continuous fermentation

Organic loading rate (kg VS m ⁻³ day ⁻¹)	Salt concentration feed (%)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (ppm)	H ₂ (ppm)
1.0	–	57.2 ± 1.7	42.8 ± 1.7	23.6 ± 90	37.8 ± 9.5
1.0	5	58.3 ± 1.1	41.7 ± 1.1	1.5 ± 8.8	40.3 ± 14.9
1.0	7	58.4 ± 1	41.6 ± 1	3.5 ± 11.1	32.4 ± 8.6
1.0	10	58.2 ± 1.2	41.8 ± 1.2	0	32.8 ± 10.8
1.5	10	55.5 ± 3.9	44.5 ± 3.9	140.5 ± 113.8	50.6 ± 1.27
1.5	20	58.3 ± 3.1	41.7 ± 3.1	297 ± 138.5	45.7 ± 9
–	–	60.6 ± 4.8	39.4 ± 4.8	463.2 ± 54.3	61.5 ± 2.2

Fig. 2 Biogas composition during continuous fermentation. Sampling rate, 8 h

1.5 g l⁻¹ higher than the soluble ammonium nitrogen. The ammonium nitrogen concentration increased rapidly at the beginning of the experiment until it stabilized close to 5 g l⁻¹. The cumulative data suggest that the fermenter was not overloaded and all potentially degradable organic matter was converted to biogas. However, the amount of NH₄-N might have been responsible for the fluctuation of the total biogas production and lower methane yields compared to the corresponding batch experiments. The observed extent of inhibition (25% less methane compared to batch) is in good agreement with the literature [21].

Another challenge of our protein-rich algae residue substrate was hydrogen sulphide. Its concentration increased linearly in the biogas product upon introduction of the higher loading rate reaching 300 ppm on day 60. However,

the fermenter was not equipped with any means of H₂S removal and only a small amount produced during the lower OLR could potentially escape the vessel with daily digestate sampling. Under industrial conditions, a professional desulphurisation technology is, therefore, essential.

Upon closer examination, the concentration of both nitrogen as well as H₂S—although perceptible—was not as high as expected from a substrate containing about 50% w/w protein. Higher H₂S and total nitrogen (TKN) values were measured for the less protein-rich *C. vulgaris* fermented at similar loading rates [7]. This in turn suggests that a significant portion of protein was lost during extraction with supercritical CO₂, as indicated during purification of crude extracts [6].

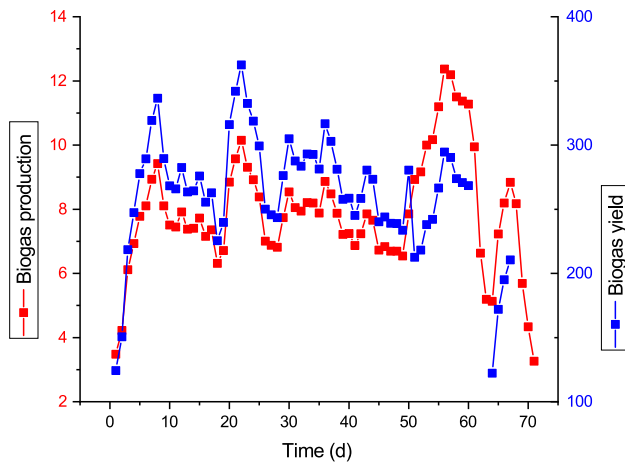


Fig. 3 Biogas production and yield during continuous fermentation

The feeding introduced gradually more salt to the system, which was reflected by the rising conductivity depicted in Fig. 4. This approach allowed for a slow adaptation of microorganisms to high salinity and in consequence a stable

fermentation at conductivities up to 60 mS cm^{-1} (2% NaCl). These values are much higher than previously reported [8, 14, 22]. In fact, methane production under such conditions was already demonstrated with the aid of cultures derived from marine sediments [23], but never from an agricultural-based biogas plant. A principal proof of concept for such a salt adaptation has, however, been previously reported with propionic acid utilizers [16].

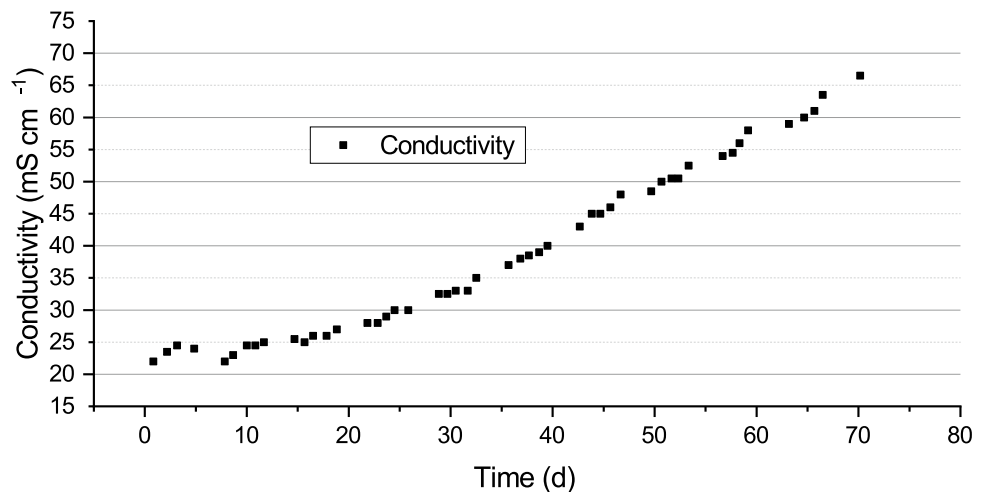
As a consequence of inorganic salt, also the TS content increased from 4.2 to 8.5% on day 60 (see Fig. 5); however, only 2.3% of the accumulated TS can be attributed to sources other than NaCl introduced in the feed. Under those circumstances, the apparent VS of 55% can be translated into 75% if no salt had been added. While this might not be an outstanding result, such values are typical for agricultural biogas plants and represent a fermentation efficiency of approximately 59% [24]. These data additionally affirm a good fermentation efficiency, as there is no excessive accumulation of undigested organic matter in the fermenter (see Table 6).

Although *Scenedesmus* is a robust algae species with biomass yields of $0.14 \text{ g l}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and lipid content above 30%

Table 5 Organic acids and ammonium nitrogen during continuous fermentation

	Day 1	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29	Day 36	Day 43	Day 50	Day 57	Day 64
$\text{NH}_4\text{-N}$ (mg l^{-1})	3000	4310	4090	4100	4690	5110	4710	5560	4460	5470
Acetic acid (mg l^{-1})	–	300	–	360	–	420	–	510	–	1000
Other acids (mg l^{-1})	Propionic acid 20									Propionic acid 88 Iso-Butyric acid 160 <i>n</i> -butyric acid 36 iso-valeric acid 57

Fig. 4 Conductivity during continuous fermentation



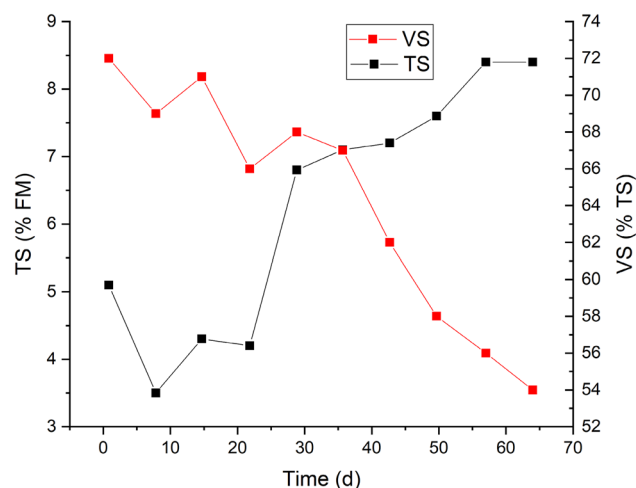


Fig. 5 Volatile solids and total solids during continuous fermentation

Table 6 Digestate composition after continuous fermentation

Compound	Unit	Value
Pb	mg kg ⁻¹ TS	15
Cd	mg kg ⁻¹ TS	<0.25
As	mg kg ⁻¹ TS	<3.7
Cr	mg kg ⁻¹ TS	66
Cu	mg kg ⁻¹ TS	530
Ni	mg kg ⁻¹ TS	34
Zn	mg kg ⁻¹ TS	530
Se	mg kg ⁻¹ TS	1.4
Fe	mg kg ⁻¹ TS	5700
Co	mg kg ⁻¹ TS	3.5
B	mg kg ⁻¹ TS	41
Mo	mg kg ⁻¹ TS	2.5
Hg	mg kg ⁻¹ TS	<0.04
N tot	g kg ⁻¹ FM	5.7
P	g kg ⁻¹ FM	1.4
P ₂ O ₅	g kg ⁻¹ FM	3.2
K	g kg ⁻¹ FM	2.9
K ₂ O	g kg ⁻¹ FM	3.5
Mg	g kg ⁻¹ FM	0.4
MgO	g kg ⁻¹ FM	0.7
Ca	g kg ⁻¹ FM	1.0
Na	g kg ⁻¹ FM	8.2
S	g kg ⁻¹ FM	0.5
NH ₄ -N	g kg ⁻¹ FM	4.2
CaO	g kg ⁻¹ FM	1.4

[25] under industrial conditions, its indigestible cell wall and high protein content of more than 50% w/w make it less suitable for anaerobic digestion. However, our results suggest that an oil-extracted algae residue might be successfully used as a biogas substrate even for monodigestion. The cell

disruption associated with supercritical CO₂ extraction is a sufficient pretreatment method to release both polymeric saccharides and proteins in a form that can be digested by conventional biogas microbial communities present in agricultural biogas plant. Nevertheless, still some cell wall components remain inaccessible for hydrolysis and as a consequence the methane yield is low compared to other algae biogas substrates, such as *Chlorella vulgaris*. Nonetheless, increasing salinity in the bioreactor does not significantly affect biogas production up to 2% w/w NaCl.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Bellou S, Baeshen MN, Elazzazy AM et al (2014) Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnol Adv* 32(8):1476–1493. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.003>
- Esakkimuthu S, Krishnamurthy V, Govindarajan R et al (2016) Augmentation and starvation of calcium, magnesium, phosphate on lipid production of *Scenedesmus obliquus*. *Biomass Bioenergy* 88:126–134. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.03.019>
- Gallego R, Montero L, Cifuentes A et al (2018) Green extraction of bioactive compounds from microalgae. *J Anal Test* 2(2):109–123. <https://doi.org/10.1007/s41664-018-0061-9>
- Richardson J, Johnson M, Joe L (2012) Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactors for profitable production of algae for transportation fuels in the Southwest. *Algal Res*. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.04.001>
- Mooij PR, Stouten GR, van Loosdrecht MCM et al (2015) Ecology-based selective environments as solution to contamination in microalgal cultivation. *Curr Opin Biotechnol* 33:46–51. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.001>
- Lorenzen J, Igl N, Tippelt M et al (2017) Extraction of microalgae derived lipids with supercritical carbon dioxide in an industrial relevant pilot plant. *Bioprocess Biosyst Eng* 40(6):911–918. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1755-5>
- Adamietz T, Jurkowski W, Adolph J, Brück T (2019) Batch and continuous biogas fermentation of the fresh water algae *Chlorella vulgaris*-detailed process analysis. *J Bioprocess Biotech* 8(5):1–8. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000338>
- Ogata Y, Ishigaki T, Nakagawa M et al (2016) Effect of increasing salinity on biogas production in waste landfills with leachate recirculation: a lab-scale model study. *Biotechnol Rep* 10:111–116. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.004>
- Gebauer R (2004) Mesophilic anaerobic treatment of sludge from saline fish farm effluents with biogas production. *Biores Technol* 93(2):155–167. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.10.024>
- Anwar N, Wang W, Zhang J et al (2016) Effect of sodium salt on anaerobic digestion of kitchen waste. *Water Sci Technol* 73(8):1865–1871. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.035>
- Jayatilakan K, Sultana K, Radhakrishna K et al (2012) Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *J Food Sci Technol* 49(3):278–293. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0290-7>

12. Zeb I, Ma J, Mehboob F et al (2019) Kinetic and microbial analysis of methane production from dairy wastewater anaerobic digester under ammonia and salinity stresses. *J Clean Prod* 219:797–808. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.295>
13. Lee DH, Behera SK, Kim JW et al (2009) Methane production potential of leachate generated from Korean food waste recycling facilities: a lab-scale study. *Waste Manag* 29(2):876–882. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2008.06.033>
14. de Vrieze J, Coma M, Debeuckelaere M et al (2016) High salinity in molasses wastewaters shifts anaerobic digestion to carboxylate production. *Water Res* 98:293–301. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.035>
15. de Baere LA, Devocht M, van Assche P et al (1984) Influence of high NaCl and NH₄Cl salt levels on methanogenic associations. *Water Res* 18(5):543–548. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(84\)90201-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(84)90201-X)
16. Feijoo G, Soto M, Méndez R et al (1995) Sodium inhibition in the anaerobic digestion process: antagonism and adaptation phenomena. *Enzyme Microb Technol* 17(2):180–188. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00011-F](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00011-F)
17. Mussgnug JH, Klassen V, Schlüter A et al (2010) Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J Biotechnol* 150(1):51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.030>
18. Weiland P (2010) Biogas production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 85(4):849–860. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>
19. Micolucci F, Gottardo M, Bolzonella D et al (2014) Automatic process control for stable bio-hythane production in two-phase thermophilic anaerobic digestion of food waste. *Int J Hydrogen Energy* 39(31):17563–17572. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.136>
20. Klein R, Slaný V, Krčálová E (2018) Conductivity measurement for control of a biogas plant. *Acta Univ Agric Silv Mendeliana Brun* 66(5):1151–1156. <https://doi.org/10.11118/actaun201866051151>
21. Yenigün O, Demirel B (2013) Ammonia inhibition in anaerobic digestion: a review. *Process Biochem* 48(5–6):901–911. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.012>
22. Ozalp G, Gomec CY, Ozturk I et al (2004) Effect of high salinity on anaerobic treatment of low strength effluents. *Water Sci Technol* 48(11–12):207–212. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0842>
23. Miura T, Kita A, Okamura Y et al (2014) Evaluation of marine sediments as microbial sources for methane production from brown algae under high salinity. *Biores Technol* 169:362–366. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.013>
24. Biogas Forum (2019) <https://www.alb-bayern.de/De/themen-aktuelles/Home>
25. Barka A, Blecker C (2016) Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review. *Biotechnol Agron Soc Environ* 20(3):427–436

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4. Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden These wurde das Biogaspotential der Mikroalge *Chlorella vulgaris* [110] und *Scenedesmus obliquus* [111] im Rahmen von vergleichenden Satzprozessen - und semi-kontinuierlichen Versuchen experimentell untersucht.

Im Rahmen des Satzprozess-Versuches mit unlimitiert kultivierter, proteinreicher *Chlorella vulgaris* Biomasse wurde nach 28 Tagen ein Gasertrag von 537,9 l_N/kg oTS und 443,6 l_N/kg oTS für getrocknete respektive frische Biomasse mit Methankonzentrationen von 60,0 % (v/v) und 61,1 % (v/v) erreicht. Eine durchschnittliche Maissilage erzielt 650 l_N/kg oTS Methan bei durchschnittlich 52,0 % (v/v) [1]. Umgerechnet auf Normliter Methan erzielte *Chlorella vulgaris* mit 322,7 l_N Methan (getrocknet) bzw. 271 l_N (frisch) beachtliche Methanausbeuten im Vergleich zu Mais (338 l_N).

Bei der Vergärung der unlimitierten *Chlorella vulgaris* Biomasse im kontinuierlichen Durchflussfermenter konnten bis zur maximal getesteten Raumbelastung in Höhe von 3,0 kg oTS/m³*d keine Probleme oder Störungen festgestellt werden. Die Alge wies einen relativ hohen Gasertrag (507 l_N/kg oTS bei einer Raumbelastung von 1 kg oTS/m³ *d) auf und eine schnelle Gasproduktion. Der spezifische Gasertrag der Alge sank jedoch mit zunehmender Raumbelastung, ein Hinweis darauf, dass das Substrat nicht mehr so gut vergoren werden konnte. Es zeigten sich auch zunehmend Schwankungen in der täglichen Gasproduktion. Die Gesamt- und organische Trockensubstanz des Fermenters stiegen ebenfalls im Laufe des Versuchs an, was ein weiteres Indiz dafür ist, dass die zugeführte organische Substanz nicht komplett abgebaut werden konnte. Bei noch weiter steigender Raumbelastung stellte der H₂S-Gehalt ein Problem dar. Hier müsste durch Maßnahmen wie z.B. einer biologischen Entschwefelung oder der Zugabe von Eisenmitteln der H₂S-Gehalt reduziert werden. Schwankungen in der Gasproduktion ergaben sich zudem mit jedem Wechsel der Algencharge.

Ferner wurde in einem Satzprozess der Gas- und Methanertrag ölextrahierter Algenreste der halophilen Alge *Scenedesmus obliquus* ermittelt. Um den Einfluss der vorherigen Ölgewinnung und den Effekt des Salzes auf die Gärbiologie zu evaluieren, wurde die Alge in unterschiedlich starker Salzlösung fermentiert. Bis zu einem Salzgehalt von 5 % (w NaCl/v) in der Algensuspension konnte kein Effekt auf den Gasertrag, mit 335,5 l_N /kg oTS, festgestellt werden. Erst ab einem Salzgehalt von 10 % (w NaCl/v) der Algensuspension kam es zu einer Reduktion des Gasertrages mit 315 l_N /kg oTS. Bei einem eingestellten Salzgehalt von 3 % (w NaCl/v) auf den Gesamtansatz stoppte die Gasproduktion fast vollständig (30,7 l_N /kg oTS). Der Methangehalt sank mit steigendem Salzgehalt von 61,5 % auf 59,4 % (v/v) bei 10 % (w

NaCl/v) Salzgehalt. Im Ansatz mit 3 % (w NaCl/v) Salz bezogen auf den Gesamtansatz lag der Methangehalt nur noch bei 21,6 % (v/v).

In der kontinuierlichen Durchflussfermentation der entölten *Scenedesmus obliquus* Restbiomasse zeigte der Salzgehalt der zugegebenen Algensuspension einen geringen Effekt auf die Gasproduktion im Fermenter. Ab 10 % (w NaCl/v) Salzgehalt ging der Gasertrag bei gleichbleibender Raumbelastung zurück. Der Methangehalt blieb hingegen unbeeinflusst von der Salzkonzentration. Die Leitfähigkeit des Fermenterinhaltess stieg kontinuierlich während des Versuches an, was auf eine Salz-Aufkonzentrierung hindeutete. Eine Erhöhung der Raumbelastung führte zwar zu einer etwas erhöhten Gasproduktion, bezogen auf die eingewogene Algensuspension war der spezifische Gasertrag jedoch geringer.

4.2. Diskussion

Die in den durchgeführten Untersuchungen jeweils erreichten Biogas- und Methanerträge mit *Chlorella vulgaris* Ganzzell- und *Scenedesmus obliquus* Restbiomasse sind für die Biogaserzeugung sehr vielversprechend. Erfreulich ist die unproblematische Vergärung, selbst in der Monofermentation. Für den in Fig. 1 integrierten AFK Prozessfluss bedeutet dies, dass die Algenbiomassekonversion zu Methan generell ein sinnvoller und synergistischer Eduktausschluss für eine energie- und masseneffiziente Biokerosinproduktion ist. Die hier erhobenen Daten zeigten auch, dass die ölextrahierte *Scenedesmus obliquus* Restbiomasse bessere Biogaserträge und einen stabileren Biogas-Prozessverlauf ermöglichte als die *Chlorella vulgaris* Ganzzellbiomasse. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass der Biogasertrag mit entölter *Scenedesmus obliquus* Restbiomasse höher war als mit Maissilage als Referenz-Biogassubstrat. Im Gegensatz zum Mais als konventionelles lignozellulosehaltiges Substrat ist davon auszugehen, dass die Abwesenheit von Lignin und die Anwesenheit von amorph, polymer vorliegenden Zellwandzuckern in der Algenrestbiomasse eine effizientere Vergärung hin zur Biogasproduktion erlaubt hat. Diese hier erstmals beschriebene Datenlage gilt es in zukünftigen Projekten mit anderen Algenstämmen und mit einer in diesen Versuchen begleitenden, detaillierten Biomasseanalytik zu verifizieren [112].

Mit den hier beschriebenen Daten zur effizienten Algenrestbiomasse-Konversion in Biogas ist das AFK Projektziel, Algenrestbiomasse als massen-, energetisch-, ökonomisch und ökologisch effizientes Biogassubstrat zu etablieren, erreicht worden. Die Nutzung der Algenrestbiomasse nach der Wertstoffextraktion bietet somit erstmals eine werthaltige energetische oder stoffliche Nutzung von Algenbiomasse in einem geschlossenen Stoffkreislauf. Da sich der relativ hohe Proteingehalt der *Chlorella vulgaris* Ganzzellbiomasse als problematisch in der Biogasprozessführung gezeigt hat, ist eine kultivierungsbedingte

Reduktion des Proteingehaltes sinnvoll. Eine Reduktion im Gesamtproteingehalt verbunden mit einer parallelen Erhöhung des polymeren Zuckeranteils in der Algenzellwand kann durch eine gezielte Stickstofflimitierung am Ende der exponentiellen Wachstumsphase ohne Verluste in der Biomasseausbeute erreicht werden [13]. Unter diesen Kultivierungsbedingungen lagern die meisten *Chlorella*-Stämme Stärke als Speicherstoff ein, während Stämme der Gattung *Scenedesmus* vorwiegend intrazellulär Triglycerid-basierte Öle als hochenergetische Speicherstoffe ausbilden [113, 114]. Die Ölbildungs-Kapazität von *Scenedesmus obliquus* wurde im hier diskutierten AFK Projekt zur thermokatalytischen Darstellung von Biokerosin genutzt. Die notwendigen Reduktionsäquivalente und zusätzlichen Kohlenstoffträger für diesen chemischen Prozess lieferte das aus der Restbiomasse gewonnene Biogas. So konnte erstmals ein geschlossener Stoffkreislauf zur Herstellung von algenbasiertem Kerosin etabliert werden. Dieser abfallfreie Prozessweg hin zum Biokerosin ist damit im Einklang mit den Prinzipien einer zirkulären Bioökonomie [115]. Es ist hier jedoch auch festzuhalten, dass nach Kultivierung unter Stickstofflimitierung sowohl die stärkehaltige *Chlorella vulgaris* bzw. lipidhaltige *Scenedesmus obliquus* Biomasse in einer Biogasfermentation sehr gute Gaserträge erreichen würden. Damit wären beide proteinreduzierten Algen-Ganzzellbiomassen für eine ganzheitliche Vergärung als Substrate in einem nachhaltigen Biogasprozess der nächsten Generation geeignet [116]. Unter Nachhaltigkeitsaspekten müsste die Algenbiomasse jedoch unter Nutzung von Abfallströmen wie kommunalen Abwässern oder Gülle produziert werden.

Es wurde bereits in mehreren Studien [70, 117, 118] belegt, dass die Algenkultivierung so einen signifikanten Beitrag zur Ökobilanz der Abwasseraufarbeitung erzielen kann. Diese Vorgehensweise würde einen Beitrag zur biogenen Wasseraufbereitung und Rezyklisierung leisten, besonders wenn das geklärte Abwasser wieder in die Algenkultivierung eingebracht würde. Die im AFK Projekt etablierten Verfahren müssen in weiterführenden Schritten hin zu einem kommerziellen Prozess weiter skaliert und validiert werden. In diesem Kontext wird die Algenrestbiomasse im Praxiseinsatz sicherlich nicht in einer reinen Monofermentation zum Einsatz kommen, sondern als Kosubstrat eingesetzt werden. Der Vergleich der Umsetzung von *Chlorella vulgaris* und extrahierter *Scenedesmus obliquus* Algen-Restbiomasse weist daraufhin, dass insbesondere der Lipidanteil in hohem Maße den Gesamtmethanertrag steigert. Eine Wirtschaftlichkeitsbetrachtung der Fermentation von öl-extrahierter Algen-Restbiomasse muss daher im Gesamtzusammenhang eines Bioaffinerie-Konzeptes betrachtet werden [41]. Es kann angenommen werden, dass der signifikant reduzierte Methananteil für eine wirtschaftliche Verwertung dieses Materials in Biogasanlagen hinderlich sein könnte. Zusätzlich könnte der Einsatz durch den hohen in der Restbiomasse verbleibenden Proteingehalt und damit einhergehend der hohen Produktion von Schwefelwasserstoff im Biogas problematisch sein. Hier muss unbedingt Augenmerk auf

die Prozessführung mit der Regulation der Fermentertemperatur gelegt werden. Offenbar kann es sogar sinnvoll sein, Fermentationshilfsstoffe wie z.B. Eisenhydroxyd einzusetzen, um die H₂S-Werte im produzierten Biogas zu regulieren. Die in dieser These vorgestellten Daten zeigen, dass die Limitationen der Fermentation durch hohe Salzfrachten im Praxismaßstab im Rahmen einer Kofermentation wohl eher nicht erreicht werden. Ein Einsatz des Algenreststoffes in Biogasanlagen kann sogar zu gewissen überkompensatorischen Mehrerträgen in der Gaserzeugung führen, da nach den vorliegenden Analysen wertvolle Spurenelemente mit eingetragen werden, die sonst oftmals bei einseitiger Fütterungsstrategie mit Monosubstraten durch externe Zugabe kompensiert werden müssen. Wenn für die Verarbeitung relevante Mengen an Algenrestbiomasse zur Verfügung stehen, helfen die Ergebnisse aus den durchgeführten Untersuchungen im Labormaßstab bei der Rations- und Verarbeitungsplanung an bestehenden Anlagen, um stabile Vergärungsprozesse zu realisieren. Weiterhin geben die Ergebnisse Aufschluss über potentielle Umbauten an bestehenden Anlagen, um in vorgeschalteten Hydrolysen durch geänderte Prozessführung das entstehende niedrigkalorische Hydrolysegas in den Fermenter zu leiten und somit eine Effizienzsteigerung des Gesamtprozesses zu realisieren. Eine Umsetzung hängt dabei entscheidend von der Kosten - Nutzen - Analyse ab.

4.3. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein vielversprechender Satzprozess mit der ölextrahierten Biomasse der halophilen Mikroalge *Nannochloropsis salina* durchgeführt. Der Methangehalt lag bei der Vergärung lediglich ca. 10 % unter dem von *Scenedesmus obliquus*. Aufgrund der mangelnden Zeit im AFK-Forschungsprojekt konnte leider kein kontinuierlicher Versuch analog *Chlorella vulgaris* und *Scenedesmus obliquus* durchgeführt werden, daher existiert hierzu auch keine Veröffentlichung. Allerdings wäre mit einem derartigen Versuch eine Evaluierung der Gasausbeuten im Vergleich zu den anderen Mikroalgen sehr interessant, insbesondere hinsichtlich der Parameter wie steigende Salzkonzentration und erhöhte H₂S- und NH₃-Konzentrationen im Gas.

In der Forschung ist der Einsatz von Algenrestmasse als Biogassubstrat noch relativ unerforscht. Auf den vorliegenden Resultaten aufbauend, könnte man folgende Ansätze nachverfolgen und vertiefen:

Als ein Forschungsvorhaben könnte aufgrund der vorliegenden Untersuchungen eine wirtschaftliche Betrachtung und Optimierung der Einzelprozesse durchgeführt werden. Soll z.B. die entstehende Algenrestbiomasse energetisch verwendet werden, kann es unter Umständen sinnvoller sein, nicht die Ölextraktion aus den Algen zu maximieren. Die dadurch reduzierten

Kosten könnten somit zu höheren Erlösen bei der energetischen Verwertung von Biogas aus der Algenrestbiomasse führen.

Darüber hinaus wäre es für weitere Forschungsprojekte sinnvoll zu erfahren, bis zu welchem prozentualen Volumenanteil Algenrestmasse in Kofermentation mit Energiepflanzen vergoren werden kann, um Anbauflächen für nachwachsenden Rohstoffe wie z.B. Mais zu minimieren. Im Allgemeinen müsste hierzu die Produktion und Verarbeitung der Algenrestmasse vor allem im großtechnischen Maßstab, aber auch hinsichtlich der Energie- und Kostenbilanz erforscht werden.

Eine Herausforderung bei der Kofermentation mit Landpflanzen wird hierzu vor dem Hintergrund der aktuellen Diskussion der Düngeverordnung [119] das Gärrest-Management sein, da ja auch zusätzlicher Stickstoff im Rahmen des Gärrestes auf die Böden ausgebracht werden wird. Hier wird zu betrachten sein, dass zum einen der Gärrest mit Stickstoff angereichert, also veredelt wird, zum anderen aber einer Überdüngung mit einer Nitratbelastung im Grundwasser entgegengewirkt werden muss.

Ein weiterer Aspekt hierzu sollte der Transport der Substrate sein, da typischerweise die Landpflanzen und Algenrestbiomasse geographisch zum Teil sehr weit auseinanderliegen und die Kosten für einen Transport ökonomisch und auch ökologisch zu hinterfragen sind [120]. Mit Sicherheit ist es sinnvoller, die Biogasanlagen dort zu errichten, wo die Algenrestmasse anfällt und dann anstelle von Landpflanzen eher Bioabfälle aus der Region beizumengen. Hier stellt sich dann aber gerade die Frage nach dem Verbleib der mit Stickstoff hoch angereicherten Gärreste. Hierzu müsste ein Stickstoff-Nährstoffkreislauf aufgezeigt werden, da die Böden mit den ansonsten im geschlossenen Stickstoff-Zyklus geernteten Landpflanzen durch die mit zusätzlichen stickstoffhaltigen ausgebrachten Gärresten überdüngt werden würden.

Interessant wäre auch eine Betrachtung der CO₂-Verwertung, welches bei der Vergärung und anschließender Verstromung der Algenbiomasse entsteht. Gelingt es hier, das CO₂ in die Aufzucht der Algen einzubringen und somit eine Rückintegration in der Stoffstrom-Bilanzierung zu erreichen, so wäre ein geschlossener Stoffkreislauf erreicht, der zusätzlich zu einer Kostenreduktion in der Algenkultivierung und einer Verbesserung der Lebenszyklus-Betrachtung führen würde [121].

Vor dem Hintergrund der aktuellen CO₂-Diskussion im Rahmen des Klimawandels zum einen und auch der „Teller/Tank-Diskussion“ und „Übermaischung der Landschaft“ durch Biogasanlagen als regenerative Energie zum anderen hat sich das AFK Forschungsprojekt gut in den Zeitgeist eingefunden. Der Einsatz von Reststoffen aus Algen anstelle von Energiepflanzen führt zu einem geringeren Rohstoff- und Landverbrauch und vermeidet bzw.

bindet sogar CO₂. Zudem hat die Gewinnung von Energie aus Reststoffen auch im Bereich der Biogas- und Kraftstoffproduktion in der Bevölkerung eine höhere Akzeptanz als die Energiegewinnung aus Anbaumasse.

Eine weitere Aufgabe wäre die Einführung der hier aufgezeigten ganzheitlichen Algenbiomasseverwertung in voll integrierten Bioraffineriekonzepten der nächsten Generation. Aus den hier vorgestellten Daten für *Chlorella vulgaris* könnte so ein Beispielszenario für eine produktdiversifizierte *Chlorella vulgaris* Bioraffinerie entstehen. Da sich *Chlorella vulgaris* durch sehr gute Wachstumsraten, Prozessstabilität und etablierte kommerzielle Produktionssysteme auszeichnet, ist dies eine sehr naheliegende Betrachtung. Ein Beispiel wäre hier *Chlorella vulgaris* unter Stickstofflimitierung zu kultivieren und so eine intrazelluläre Stärkeakkumulation zu forcieren [122, 123]. Hier wäre die Nutzung des schnellwachsenden, hochgradig Stärke produzierenden Stammes *Chlorella sorokiniana* anstatt des Modellstammes *Chlorella vulgaris* zielführend [124, 125]. Die in der Algenzelle gespeicherte Stärke könnte in nachfolgenden Prozessschritten durch mechanische und chemische Verfahren von der Restbiomasse getrennt werden [126]. Die Algenrestbiomasse könnte dann problemlos in einem Biogasprozess vergoren und in Biogas umgewandelt werden. Die nachgeschaltete Biogasverwertung im BHKW wird dann zur Gewinnung von Prozessenergie und Wärme genutzt. Während die Abwärme, ein geringer Anteil der Prozessenergie und das entstehende CO₂ für weitere Algenkultivierungsprozesse genutzt werden können, wird der überwiegende Anteil der aus Biogas gewonnenen Energie für weitere Stärke-Veredelungsschritte genutzt.

Ein Basisszenario wäre die fermentative Konversion der Stärke in Bioethanol, der entweder als Biokraftstoff oder Plattformchemikalie genutzt werden kann [127–129]. Hier ist anzumerken, dass Abwärme und Energie aus der Biogasverstromung besonders für die energieintensive finale Bioethanol-Aufkonzentration mittels gekoppelter Destillation und Rektifikation verwendet werden muss. Die Nutzung von CO₂ neutraler, biogasbasierter erneuerbarer Energie und Abwärme ist hier aus ökonomischen und ökologischen Gründen sehr sinnvoll. Erste Kommerzialisierungsversuche zur algenbasierten Bioethanolerzeugung in einer integrierten Bio-Raffinerie der Süd-Zucker Crop Energies AG in Zeitz sind jedoch gescheitert [130] (siehe Abbildung 3).

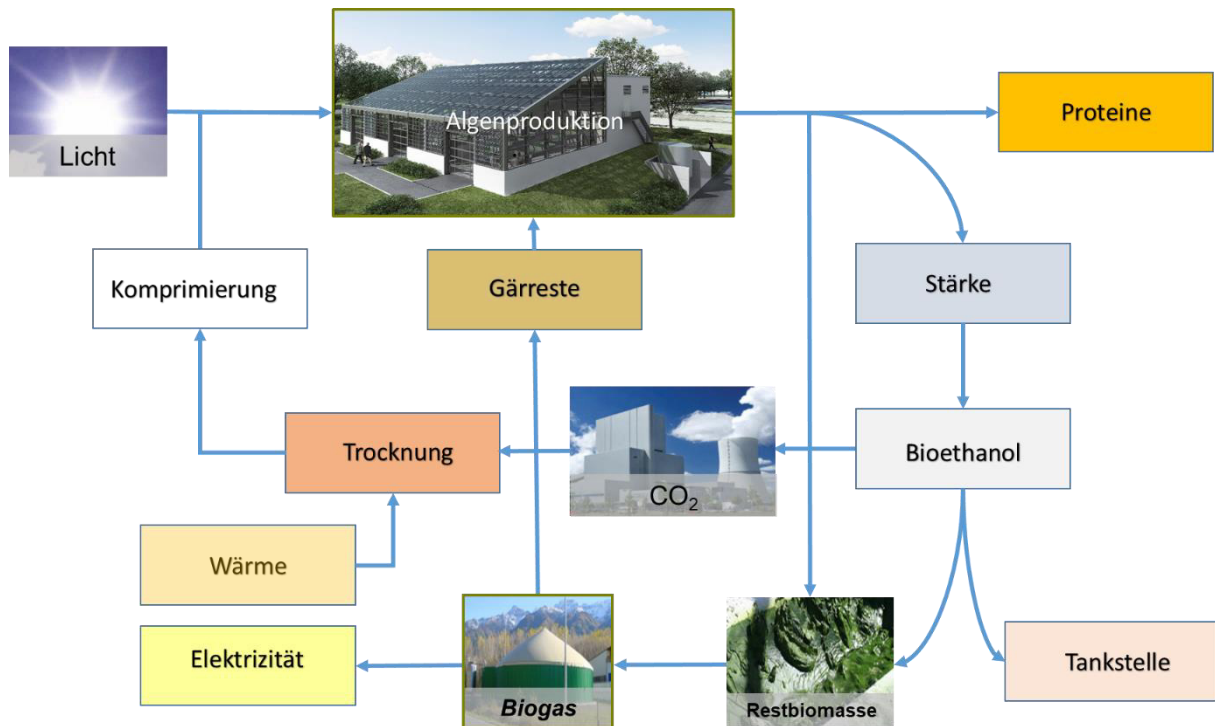


Abbildung 3: Gekoppelte Algen Stärke und Bioethanol Produktion in einer voll integrierten Bio-Raffinerie der Firma Süd-Zucker Crop Energies.

Das von Süd-Zucker forcierte Kommerzialisierungskonzept (Abb. 3) war wahrscheinlich nicht zielführend, da Bioethanol als großvolumiges, niederpreisiges Chemieprodukt nicht die benötigte Wertschöpfung im Gesamtprozess erbrachte. Eine wertsteigernde, direkte Nutzung der Algen basierte Stärke als hochpreisige Spezialchemikalie oder Additiv wäre hier zielführender, um eine erfolgreiche Kommerzialisierung dieser vielversprechenden Algentechnologie zu erreichen. Mögliche direkte Anwendungen von Algenstärke wäre die Nutzung als funktionale Füllmaterialien in Polypropylene und Polystyrol basierten Polymeranwendungen [131]. Weiterhin könnte Stärke als chiraler Ausgangsstoff für die chemische Synthese von Pharmazeutika und Agrochemikalien genutzt werden. Darüber hinaus gewinnt Stärke als erneuerbarer Rohstoff zur chemischen Darstellung von bioabbaubaren Polymeren wie thermoplastischer Stärke und Caprolactam basierten Polymeren an Bedeutung [132, 133]. Im Hinblick auf das globale Entsorgungsproblem von nicht biologisch abbaubarem Plastikmüll und den daraus resultierenden ökologischen Folgen, ist diese Entwicklung im Sinne der Etablierung einer zirkularen Bioökonomie zielführend [134]. In dem Kontext könnten bioabbaubare Polymere am Ende ihres Lebenszyklus eingesammelt und entweder wiederverwendet oder energetisch in einer Biogasanlage verwertet werden, ohne die Umwelt zu belasten [135]. Somit wäre eine wertschöpfende Nutzung der Algenstärke in einem geschlossenen Stoffkreislauf möglich. Die Anwendung dieser geschlossenen, wertschöpfenden biobasierten Stoffkreisläufe durch Synergien von biotechnologischen und chemischen Konversionsstrategien ermöglicht eine ressourcenschonende Weiterentwicklung unserer Industriegesellschaft. Nur eine strikte flächendeckende, industrielle Implementierung

dieser geschlossenen Technologieplattformen wird unsere Erde in ihrer aktuellen Vielfalt an Leben auch für zukünftige Generationen bewahren. Die in dieser These präsentierten Daten sollen damit einen ersten Schritt und eine Motivation für weitere Forschungsprojekte auf dem Weg in eine nachhaltige Zukunft initiieren.

5. Abdruckgenehmigung

Der Artikel "Batch and Continuous Biogas Fermentation of the Fresh Water Algae *Chlorella vulgaris* - Detailed Process Analysis" wurde 2018 im "Journal of Bioprocessing & Biotechniques" (DOI: 10.4172/2155-9821.1000338) veröffentlicht.

Dieser Artikel ist "open access", daher ist keine Abdruckgenehmigung erforderlich.

Der Artikel "Biogas yields and composition from oil-extracted halophilic algae residues in conventional biogas plants operated at high salinities" wurde 2019 in "Bioprocess and Biosystems Engineering" (<https://doi.org/10.1007/s00449-019-02185-8>) veröffentlicht.

Dieser Artikel ist "open access", daher ist keine Abdruckgenehmigung erforderlich.

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Algenproduktion für die Biokerosinherstellung im AFK Projekt.	5
Abbildung 2: Satzprozess (links), semi-kontinuierlicher Versuch (rechts) (Foto vom Autor).	19
Abbildung 3: Gekoppelte Algen Stärke und Bioethanol Produktion in einer voll integrierten Bio-Raffinerie der Firma Süd-Zucker Crop Energies.....	50
Tabelle 1: Methanogene Bakterien und die von ihnen genutzten Substrate [104].	15
Tabelle 2: Methanogene Substrate und ihre Umsetzung [104].	15
Tabelle 3: Physikalische Eigenschaften von Biogas und seinen Bestandteilen [104].	16
Tabelle 4: Kenndaten Versuchsansatz [110].	20
Tabelle 5: Zusammensetzung für Satzprozess-Fermentationsversuche [111].	21
Tabelle 6: Kenndaten der verwendeten Substrate [110].	22

7. Referenzen

1. Amon T., Bauer A., et al. (2010) Gasausbeute in landwirtschaftlichen Biogasanlagen, 2., überarb. Aufl. KTBL-Heft, vol 88. KTBL, Darmstadt
2. Brück T., Algenflugkraft. (2019) <https://lb-campus.com/de/forschung/algenflugkraft>. Accessed 25 Jul 2019
3. BMWI (2019) Abkommen von Paris. <https://www.bmwi.de/Redaktion/DE/Artikel/Industrie/klimaschutz-abkommen-von-paris.html>. Accessed 26 Mar 2020
4. Richter I (2007) Nachhaltige aquatische Biomasse: Überblick zu rohstofflichen Verwendungen und Überlegungen zu Möglichkeiten und Grenzen der energetischen Nutzung. http://www.iinas.org/tl_files/iinas/downloads/bio/oeko/2007_Aqua-Biomasse.pdf
5. BMU (2016) Die Klimakonferenz in Paris. <https://www.bmu.de/themen/klima-energie/klimaschutz/internationale-klimapolitik/pariser-abkommen/>. Accessed 26 Mar 2020
6. next (o.J.) Was ist die Dunkelflaute? <https://www.next-kraftwerke.de/wissen/dunkelflaute>
7. Umweltbundesamt (2020) Erneuerbare Energien in Zahlen. <https://www.umweltbundesamt.de/themen/klima-energie/erneuerbare-energien/erneuerbare-energien-in-zahlen#textpart-1>. Accessed 25 Jul 2019
8. Zhao C, Brück T, Lercher JA (2013) Catalytic deoxygenation of microalgae oil to green hydrocarbons. *Green Chem.* 15(7): 1720. doi: 10.1039/C3GC40558C
9. Ertem FC, Neubauer P, Junne S (2017) Environmental life cycle assessment of biogas production from marine macroalgal feedstock for the substitution of energy crops. *Journal of Cleaner Production* 140: 977–985. doi: 10.1016/j.jclepro.2016.08.041
10. Hijazi O, Munro S, Zerhusen B et al. (2016) Review of life cycle assessment for biogas production in Europe. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 54: 1291–1300. doi: 10.1016/j.rser.2015.10.013
11. Ørsted (2017) Ökobilanz von Biogasanlagen: Gut fürs Klima oder Gift für die Umwelt? <https://energiewinde.orsted.de/energiewirtschaft/biogas-oekobilanz-klima-umwelt>

12. Umweltbundesamt (2019) Biogasanlagen.
<https://www.umweltbundesamt.de/themen/wirtschaft-konsum/industriebranchen/biogasanlagen>
13. Schädler T, Caballero Carbon D, Oliveira L de et al. (2019) Production of lipids with *Microchloropsis salina* in open thin-layer cascade photobioreactors. *Bioresource Technology* 289: 121682. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121682
14. Khan et al. *Microb Cell Fact* (2018) The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. doi: /10.1186/s12934-018-0879-x
15. IWR (2018) Forscher produzieren grünes Methan aus Windgas.
<https://www.iwr.de/news.php?id=35244>
16. Götz M, Lefebvre J, Mörs F et al. (2016) Renewable Power-to-Gas: A technological and economic review. *Renewable Energy* 85: 1371–1390. doi: 10.1016/j.renene.2015.07.066
17. Bailera M, Lisbona P, Romeo LM et al. (2017) Power to Gas projects review: Lab, pilot and demo plants for storing renewable energy and CO₂. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 69: 292–312. doi: 10.1016/j.rser.2016.11.130
18. Umweltbundesamt (2015) Treibhausgasneutrales Deutschland 2050.
<https://www.umweltbundesamt.de/themen/klima-energie/klimaschutz-energiepolitik-in-deutschland/szenarien-konzepte-fuer-die-klimaschutz/treibhausgasneutrales-deutschland-2050#die-studie>
19. Fachverband Biogas (o.J.) Zahlen und Fakten.
<https://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/DE-Zahlen-und-Fakten>. Accessed 24 Jul 2019
20. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V (o.J.) Daten und Fakten.
<https://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten.html>. Accessed 30 May 2019
21. BfN - Bundesamt für Naturschutz (2010) Bioenergie und Naturschutz.
https://www.bfn.de/fileadmin/MDB/documents/themen/erneuerbareenergien/bfn_position_bioenergie_naturschutz.pdf. Accessed 24 Jul 2019
22. Umweltbundesamt (2019) Wider die Verschwendung.
<https://www.umweltbundesamt.de/themen/wider-die-verschwendung>. Accessed 24 Jul 2019

23. Feuvre PL (2019) Are aviation biofuels ready for take off?
<https://www.iea.org/commentaries/are-aviation-biofuels-ready-for-take-off>
24. EASA (o.J.) Sustainable Aviation Fuels. <https://www.easa.europa.eu/eaer/climate-change/sustainable-aviation-fuels>
25. European Commission (2011) Flightpath 2050: Europe's Vision for Aviation. Maintaining Global Leadership &. <https://ec.europa.eu/transport/sites/transport/files/modes/air/doc/flightpath2050.pdf>
26. Yang Z, Kumar A, Huhnke RL (2015) Review of recent developments to improve storage and transportation stability of bio-oil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 50: 859–870. doi: 10.1016/j.rser.2015.05.025
27. Wei H, Liu W, Chen X et al. (2019) Renewable bio-jet fuel production for aviation: A review. *Fuel* 254: 115599. doi: 10.1016/j.fuel.2019.06.007
28. Gutiérrez-Antonio C, Gómez-Castro FI, Lira-Flores JA de et al. (2017) A review on the production processes of renewable jet fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 79: 709–729. doi: 10.1016/j.rser.2017.05.108
29. Yang X, Guo F, Xue S et al. (2016) Carbon distribution of algae-based alternative aviation fuel obtained by different pathways. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 54: 1129–1147. doi: 10.1016/j.rser.2015.10.045
30. Bwapwa JK, Anandraj A, Trois C (2017) Possibilities for conversion of microalgae oil into aviation fuel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 80: 1345–1354. doi: 10.1016/j.rser.2017.05.224
31. Rahmes T, Kinder J, Crenfeldt G et al. (2009) Sustainable Bio-Derived Synthetic Paraffinic Kerosene (Bio-SPK) Jet Fuel Flights and Engine Tests Program Results. doi: 10.2514/6.2009-7002
32. Wang W-C, Tao L (2016) Bio-jet fuel conversion technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 53: 801–822. doi: 10.1016/j.rser.2015.09.016
33. Jong S de, Hoefnagels R, Wetterlund E et al. (2017) Cost optimization of biofuel production – The impact of scale, integration, transport and supply chain configurations. *Applied Energy* 195: 1055–1070. doi: 10.1016/j.apenergy.2017.03.109

34. Wang Xea (2019) Influence of Nitrogen Limitation on Lipid Accumulation and EPA and DHA Content in Four Marine Microalgae for Possible Use in Aquafeed. doi: 10.3389/fmars.2019.00095
35. Mubarak M, Shaija A, Suchithra TV (2015) A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Research* 7: 117–123. doi: 10.1016/j.algal.2014.10.008
36. Liu J, Song Y, Qiu W (2017) Oleaginous microalgae *Nannochloropsis* as a new model for biofuel production: Review & analysis. doi: 10.1016/j.rser.2016.12.120
37. Dong T, Knoshaug EP, Pienkos PT et al. (2016) Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. doi: 10.1016/j.apenergy.2016.06.002
38. Douglas C. Elliott, Biller P, Ross AB et al. (2015) Hydrothermal liquefaction of biomass: Developments from batch to continuous process. doi: 10.1016/j.biortech.2014.09.132
39. Santillan-Jimenez E, Pace R, Marques S et al. (2016) Extraction, characterization, purification and catalytic upgrading of algae lipids to fuel-like hydrocarbons. doi: 10.1016/j.fuel.2016.04.079
40. Sánchez Hernández EP, Travieso Córdoba L (1993) Anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris* for energy production. *Resources, Conservation and Recycling* 9(1-2): 127–132. doi: 10.1016/0921-3449(93)90037-G
41. Mussnug JH, Klassen V, Schlüter A et al. (2010) Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology* 150(1): 51–56. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.07.030
42. Chew KW, Yap JY, Show PL et al. (2017) Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology* 229: 53–62. doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.006
43. Koller M, Muhr A, Braunegg G (2014) Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research* 6: 52–63. doi: 10.1016/j.algal.2014.09.002
44. Metting FB (1996) Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 17(5-6): 477–489. doi: 10.1007/BF01574779
45. Brennan L, Owende P (2010) Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(2): 557–577. doi: 10.1016/j.rser.2009.10.009

46. Kumar A, Ergas S, Yuan X et al. (2010) Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends Biotechnol* 28(7): 371–380. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.04.004
47. Abdel-Raouf N, Al-Homaidan AA, Ibraheem IBM (2012) Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J Biol Sci* 19(3): 257–275. doi: 10.1016/j.sjbs.2012.04.005
48. Beuckels A, Smolders E, Muylaert K (2015) Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research* 77: 98–106. doi: 10.1016/j.watres.2015.03.018
49. Alam F, Mobin S, Chowdhury H (2015) Third Generation Biofuel from Algae. *Procedia Engineering* 105: 763–768. doi: 10.1016/j.proeng.2015.05.068
50. Fenton O, Ó hUallacháin D (2012) Agricultural nutrient surpluses as potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): A review. *Algal Research* 1(1): 49–56. doi: 10.1016/j.algal.2012.03.003
51. Andersen RA (1992) Diversity of eukaryotic algae. *Biodivers Conserv* 1(4): 267–292. doi: 10.1007/BF00693765
52. Guiry MD (2012) HOW MANY SPECIES OF ALGAE ARE THERE? *J Phycol* 48(5): 1057–1063. doi: 10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x
53. Kaltschmitt M, Hartmann H, Hofbauer H (eds) (2016) *Energie aus Biomasse*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-662-47438-9
54. Heyl S (2015) Multitalente Cyanobakterien: Vom Biosprit zum Klimaretter. <https://www.biooekonomie-bw.de/fachbeitrag/aktuell/multitalente-cyanobakterien-vom-biosprit-zum-klimaretter>
55. Aikawa S, Joseph A, Yamada R et al. (2013) Direct conversion of *Spirulina* to ethanol without pretreatment or enzymatic hydrolysis processes. *Energy Environ. Sci.* 6(6): 1844. doi: 10.1039/C3EE40305J
56. Hamilton ML, Warwick J, Terry A et al. (2015) Towards the Industrial Production of Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids from a Genetically Modified Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS ONE* 10(12): e0144054. doi: 10.1371/journal.pone.0144054

57. Kosourov S, Tsygankov A, Seibert M et al. (2002) Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: Effects of culture parameters. *Biotechnol Bioeng* 78(7): 731–740. doi: 10.1002/bit.10254
58. Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG (2007) Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 74(6): 1163–1174. doi: 10.1007/s00253-007-0844-9
59. Ashokkumar V, Agila E, Sivakumar P et al. (2014) Optimization and characterization of biodiesel production from microalgae *Botryococcus* grown at semi-continuous system. *Energy Conversion and Management* 88: 936–946. doi: 10.1016/j.enconman.2014.09.019
60. Liu J, Chen F (2016) Biology and Industrial Applications of *Chlorella*: Advances and Prospects. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 153: 1–35. doi: 10.1007/10_2014_286
61. Safi C, Zebib B, Merah O et al. (2014) Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35: 265–278. doi: 10.1016/j.rser.2014.04.007
62. Mandal S, Mallick N (2009) Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 84(2): 281–291. doi: 10.1007/s00253-009-1935-6
63. Koller AP, Wolf L, Brück T et al. (2018) Studies on the scale-up of biomass production with *Scenedesmus* spp. in flat-plate gas-lift photobioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 41(2): 213–220. doi: 10.1007/s00449-017-1859-y
64. Ling Y, Sun L-p, Wang S-y et al. (2019) Cultivation of oleaginous microalga *Scenedesmus obliquus* coupled with wastewater treatment for enhanced biomass and lipid production. *Biochemical Engineering Journal* 148: 162–169. doi: 10.1016/j.bej.2019.05.012
65. Lorenzen J, Igl N, Tippelt M et al. (2017) Extraction of microalgae derived lipids with supercritical carbon dioxide in an industrial relevant pilot plant. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 40(6): 911–918. doi: 10.1007/s00449-017-1755-5
66. Pragya N, Pandey KK, Sahoo PK (2013) A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 24: 159–171. doi: 10.1016/j.rser.2013.03.034

67. Singh RN, Sharma S (2012) Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16(4): 2347–2353. doi: 10.1016/j.rser.2012.01.026
68. Roquette Klötze GmbH & Co. KG (o.J.) Chlorella: Steckbrief, Infos, Wissenswertes | ALGOMED®. <https://www.algomed.de/chlorella/>. Accessed 12 Feb 2020
69. Kothari R, Pathak VV, Kumar V et al. (2012) Experimental study for growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: An integrated approach for treatment and biofuel production. *Bioresource Technology* 116: 466–470. doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.121
70. Wang L, Min M, Li Y et al. (2010) Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Appl Biochem Biotechnol* 162(4): 1174–1186. doi: 10.1007/s12010-009-8866-7
71. Tunnicliffe H (2017) Wessex Water and Bath trial algae treatment. <https://www.thechemicalengineer.com/news/wessex-water-and-bath-trial-algae-treatment/>
72. Rawat I, Ranjith Kumar R, Mutanda T et al. (2011) Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 88(10): 3411–3424. doi: 10.1016/j.apenergy.2010.11.025
73. Cao Y, van Loosdrecht MCM, Daigger GT (2017) Mainstream partial nitritation–anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(4): 1365–1383. doi: 10.1007/s00253-016-8058-7
74. Xin C, Addy MM, Zhao J et al. (2016) Comprehensive techno-economic analysis of wastewater-based algal biofuel production: A case study. *Bioresource Technology* 211: 584–593. doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.102
75. Young P, Taylor M, Fallowfield HJ (2017) Mini-review: high rate algal ponds, flexible systems for sustainable wastewater treatment. *World J Microbiol Biotechnol* 33(6): 9013. doi: 10.1007/s11274-017-2282-x
76. Falkowski PG (2014) *Meeresbiologie: Der unsichtbare Wald im Meer*. <https://www.spektrum.de/magazin/der-unsichtbare-wald-im-meer/829890>. Accessed 06 Feb 2020

-
77. Umweltbundesamt (2019) Klimawandel der Meere.
<https://www.umweltbundesamt.de/themen/wasser/gewaesser/meere/nutzung-belastungen/klimawandel-der-meere#geo-engineering>. Accessed 11 Feb 2020
 78. Esakkimuthu S, Krishnamurthy V, Govindarajan R et al. (2016) Augmentation and starvation of calcium, magnesium, phosphate on lipid production of *Scenedesmus obliquus*. *Biomass and Bioenergy* 88: 126–134. doi: 10.1016/j.biombioe.2016.03.019
 79. Singh A, Nigam PS, Murphy JD (2011) Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology* 102(1): 10–16. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.032
 80. Bellou S, Baeshen MN, Elazzazy AM et al. (2014) Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances* 32(8): 1476–1493. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.003
 81. Azadi P, Malina R, Barrett SRH et al. (2017) The evolution of the biofuel science. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 76: 1479–1484. doi: 10.1016/j.rser.2016.11.181
 82. Montingelli ME, Tedesco S, Olabi AG (2015) Biogas production from algal biomass: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 43: 961–972. doi: 10.1016/j.rser.2014.11.052
 83. Schwede S (2013) Mikroalgen als Substrat für Biogasanlagen - Potenzial in der Zukunft? doi: 10.13140/2.1.3618.2728
 84. Singh A, Singh Nigam P, Murphy JD (2011) Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.032
 85. Gallego R, Montero L, Cifuentes A et al. (2018) Green Extraction of Bioactive Compounds from Microalgae. *Journal of Analysis and Testing* 2(2): 109–123. doi: 10.1007/s41664-018-0061-9
 86. Garg S, Li Y, Wang L et al. (2012) Flotation of marine microalgae: Effect of algal doi: 10.1016/j.biortech.2012.06.111
 87. Richardson J, Johnson M, Joe L (2012) Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactors for profitable production of algae for transportation fuels in the Southwest. *Algal Research* 1. doi: 10.1016/j.algal.2012.04.001

88. Mooij PR, Stouten GR, van Loosdrecht MCM et al. (2015) Ecology-based selective environments as solution to contamination in microalgal cultivation. *Current Opinion in Biotechnology* 33: 46–51. doi: 10.1016/j.copbio.2014.11.001
89. Ogata Y, Ishigaki T, Nakagawa M et al. (2016) Effect of increasing salinity on biogas production in waste landfills with leachate recirculation: A lab-scale model study. *Biotechnology Reports* 10: 111–116. doi: 10.1016/j.btre.2016.04.004
90. Gebauer R (2004) Mesophilic anaerobic treatment of sludge from saline fish farm effluents with biogas production. *Bioresource Technology* 93(2): 155–167. doi: 10.1016/j.biortech.2003.10.024
91. Anwar N, Wang W, Zhang J et al. (2016) Effect of sodium salt on anaerobic digestion of kitchen waste. *Water Science and Technology* 73(8): 1865–1871. doi: 10.2166/wst.2016.035
92. Jayathilakan K, Sultana K, Radhakrishna K et al. (2012) Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *Journal of food science and technology* 49(3): 278–293. doi: 10.1007/s13197-011-0290-7
93. Zeb I, Ma J, Mehboob F et al. (2019) Kinetic and microbial analysis of methane production from dairy wastewater anaerobic digester under ammonia and salinity stresses. *Journal of Cleaner Production* 219: 797–808. doi: 10.1016/j.jclepro.2019.01.295
94. Lee DH, Behera SK, Kim JW et al. (2009) Methane production potential of leachate generated from Korean food waste recycling facilities: a lab-scale study. *Waste Manag* 29(2): 876–882. doi: 10.1016/j.wasman.2008.06.033
95. Vrieze J de, Coma M, Debeuckelaere M et al. (2016) High salinity in molasses wastewaters shifts anaerobic digestion to carboxylate production. *Water Research* 98: 293–301. doi: 10.1016/j.watres.2016.04.035
96. Baere LA de, Devocht M, van Assche P et al. (1984) Influence of high NaCl and NH₄Cl salt levels on methanogenic associations. *Water Research* 18(5): 543–548. doi: 10.1016/0043-1354(84)90201-X
97. Feijoo G, Soto M, Méndez R et al. (1995) Sodium inhibition in the anaerobic digestion process: Antagonism and adaptation phenomena. *Enzyme and Microbial Technology* 17(2): 180–188. doi: 10.1016/0141-0229(94)00011-F

-
98. Tegge G (1981) Maurer, M., und J.-P. Winkler: Biogas – Theoretische Grundlagen, Bau und Betrieb von Anlagen. Bd. 31 der Berichte aus den Fachbereichen Kälte, Wärme, Klima, Lüftung, Energie, Regelung, Gebäudeautomation, Schallschutz. Verlag C. F. Müller, Karlsruhe 1980. 182 Seiten, mit zahlreichen Abb. Taschenbuchformat DM 35,00. Starch / Stärke 33(10): 359. doi: 10.1002/star.19810331013
99. Liebmann H (ed) (1956) Gewinnung und Verwertung von Methan aus Klärschlamm und Mist: Münchener Beiträge zur Abwasser–Fischerei und Flußbiologie, Band 3. Verlag R. Oldenburg, München. doi: 10.1007/BF00408398
100. WordPresscom (2015) Entwicklung der Biogasbranche.
<https://methaniseurde.wordpress.com/geschichte-des-methanisierung/>. Accessed 12 Feb 2020
101. Eder B (2012) Biogas-Praxis: Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele, Wirtschaftlichkeit, Umwelt, 5., überarb. Aufl. Ökobuch, Staufen bei Freiburg
102. Werner U, Hees N, Stöhr U (1986) Praktischer Leitfaden für Biogasanlagen in der Tierproduktion. Sonderpublikation der GTZ, vol 180, Eschborn
103. Umweltbundesamt (2019) Erneuerbare-Energien-Gesetz.
<https://www.umweltbundesamt.de/themen/klima-energie/erneuerbare-energien/erneuerbare-energien-gesetz#erfolg>. Accessed 12 Feb 2020
104. Klingenberg P (1992) W. Fritsche: Mikrobiologie. 497 Seiten, 211 Abb., 31 Tab. Gustav Fischer Verlag, Jena 1990. Preis: 38,80 DM. Nahrung 36(5): 503. doi: 10.1002/food.19920360516
105. Mollekopf N, Polster A, Brummack J (2006) Verbesserung von Entschwefelungsverfahren in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. https://tu-dresden.de/ing/maschinenwesen/ifvu/ressourcen/dateien/tvu/publications/Bericht_Biogas_Polster.pdf?lang=de
106. Daniel-Gromke J (2017) Anlagenbestand Biogas und Biomethan - Biogaserzeugung und -nutzung in Deutschland: (FKZ 37EV 16 111 0). DBFZ Report, Nr. 30. DBFZ Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH, Leipzig
107. Odening M, Filler G (2007) EFFIZIENZ UND RENTABILITÄT VON BIOGASANLAGEN. Agrarinformatik im Spannungsfeld zwischen Regionalisierung und globalen Wertschöpfungsketten. Druck+Verlag GmbH, Bonn, Vol. 101: 159-162.

108. Abo-Shady AM, Mohamed YA, Lasheen T (1993) Chemical composition of the cell wall in some green algae species. *Biol Plant* 35(4): 629–632. doi: 10.1007/BF02928041
109. VDI-Gesellschaft Energie und Umwelt (2016) Vergärung organischer Stoffe: Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche. https://www.vdi.de/fileadmin/pages/vdi_de/redakteure/richtlinien/inhaltsverzeichnisse/2385990.pdf
110. Adamietz T, Jurkowski W, Adolph J et al. (2018) Batch and Continuous Biogas Fermentation of the Fresh Water Algae *Chlorella Vulgaris*-Detailed Process Analysis 8(5): 1–8. doi: 10.4172/2155-9821.1000338
111. Adamietz T, Jurkowski W, Adolph J et al. (2019) Biogas yields and composition from oil-extracted halophilic algae residues in conventional biogas plants operated at high salinities. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 42(12): 1915–1922. doi: 10.1007/s00449-019-02185-8
112. Laurens LML, van Wychen S, Pienkos PT et al. (2017) Harmonization of experimental approach and data collection to streamline analysis of biomass composition from algae in an inter-laboratory setting. *Algal Research* 25: 549–557. doi: 10.1016/j.algal.2017.03.029
113. Cheng D, Li D, Yuan Y et al. (2017) Improving carbohydrate and starch accumulation in *Chlorella* sp. AE10 by a novel two-stage process with cell dilution. *Biotechnol Biofuels* 10: 75. doi: 10.1186/s13068-017-0753-9
114. Xin L, Hu H-y, Ke G et al. (2010) Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101(14): 5494–5500. doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.016
115. Maina S, Kachrimanidou V, Koutinas A (2017) A roadmap towards a circular and sustainable bioeconomy through waste valorization. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 8: 18–23. doi: 10.1016/j.cogsc.2017.07.007
116. Wagner AO, Lins P, Malin C et al. (2013) Impact of protein-, lipid- and cellulose-containing complex substrates on biogas production and microbial communities in batch experiments. *Sci Total Environ* 458-460: 256–266. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.034
117. Martin C, La Noüe J de, Picard G (1985) Intensive cultivation of freshwater microalgae on aerated pig manure. *Biomass* 7(4): 245–259. doi: 10.1016/0144-4565(85)90064-2

-
118. Cho S, Luong TT, Lee D et al. (2011) Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. *Bioresource Technology* 102(18): 8639–8645. doi: 10.1016/j.biortech.2011.03.037
119. Sundermann G, Wägner N, Cullmann A et al. (2020) Nitratbelastung im Grundwasser überschreitet Grenzwert seit Langem – mehr Transparenz und Kontrolle in der Düngepraxis notwendig. DIW - Deutsches Institut für Wirtschaftsforschung
120. Gold S, Seuring S (2011) Supply chain and logistics issues of bio-energy production. *Journal of Cleaner Production* 19(1): 32–42. doi: 10.1016/j.jclepro.2010.08.009
121. Collet P, Hélias A, Lardon L et al. (2011) Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology* 102(1): 207–214. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.154
122. Behrens PW, Bingham SE, Hoeksema SD et al. (1989) Studies on the incorporation of CO₂ into starch by *Chlorella vulgaris*. *J Appl Phycol* 1(2): 123–130. doi: 10.1007/BF00003874
123. Pirt MW, Pirt SJ (1977) Photosynthetic production of biomass and starch by *Chlorella* in chemostat culture. *J. Appl. Chem.* 27(6): 643–650. doi: 10.1002/jctb.5020270604
124. Béchet Q, Muñoz R, Shilton A et al. (2013) Outdoor cultivation of temperature-tolerant *Chlorella sorokiniana* in a column photobioreactor under low power-input. *Biotechnol Bioeng* 110(1): 118–126. doi: 10.1002/bit.24603
125. Li T, Gargouri M, Feng J et al. (2015) Regulation of starch and lipid accumulation in a microalga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology* 180: 250–257. doi: 10.1016/j.biortech.2015.01.005
126. Mohammadkhani A, Stoddard FL, Marshall DR et al. (1999) Starch Extraction and Amylose Analysis from Half Seeds. *Starch / Stärke* 51(2-3): 62–66. doi: 10.1002/(SICI)1521-379X(199903)51:2<62:AID-STAR62>3.0.CO;2-G
127. John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM et al. (2011) Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology* 102(1): 186–193. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.139
128. Sun J, Wang Y (2014) Recent Advances in Catalytic Conversion of Ethanol to Chemicals. *ACS Catal.* 4(4): 1078–1090. doi: 10.1021/cs4011343

129. Zabed H, Sahu JN, Suely A et al. (2017) Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 71: 475–501. doi: 10.1016/j.rser.2016.12.076
130. Schmid-Staiger U, Holdmann C (2016) Bioraffinerie auf Basis kohlenhydratreicher Algenbiomasse, Nutzung von Stärke und Protein : Teilvorhaben 1: Koordination sowie Auswahl und Prozessentwicklung für stärkereiche Mikroalgen : Schlussbericht zum Vorhaben : Teilbericht A und Teilbericht B gemeinsamer Sachbericht : Laufzeit: 12.2012. bis 11.2015. Fraunhofer IGB
131. Koch H, Röper H (1988) New Industrial Products from Starch. *Starch / Stärke* 40(4): 121–131. doi: 10.1002/star.19880400402
132. Hottle TA, Bilec MM, Landis AE (2013) Sustainability assessments of bio-based polymers. *Polymer Degradation and Stability* 98(9): 1898–1907. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.06.016
133. Beerthuis R, Rothenberg G, Shiju NR (2015) Catalytic routes towards acrylic acid, adipic acid and ϵ -caprolactam starting from biorenewables. *Green Chem.* 17(3): 1341–1361. doi: 10.1039/C4GC02076F
134. Li WC, Tse HF, Fok L (2016) Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. *Sci Total Environ* 566-567: 333–349. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.084
135. Bátori V, Åkesson D, Zamani A et al. (2018) Anaerobic degradation of bioplastics: A review. *Waste Manag* 80: 406–413. doi: 10.1016/j.wasman.2018.09.040