

University of Groningen

Unlocking microalgal treasures

Azimatun Nur, Muhamad

DOI:
[10.33612/diss.126441666](https://doi.org/10.33612/diss.126441666)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Azimatun Nur, M. (2020). *Unlocking microalgal treasures: Utilization of palm oil mill effluent as growth medium for the production of value-added microalgal compounds*. [Groningen]: University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.126441666>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

1. Samenvatting

Indonesië staat momenteel bekend als de grootste producent van ruwe palmolie ter wereld, gevolgd door Maleisië en Thailand. Tijdens de productie genereert 1 ton verse fruittrossen (FFB) 0,66 ton palmolie effluent (POME). De pH van onbewerkte POME varieert tussen 4,0 en 5,0 en de chemische zuurstofbehoefte en biologische zuurstofbehoefte zijn extreem hoog. Bovendien bevat POME een grote hoeveelheid totaal gesuspendeerde vaste stoffen, totaal opgeloste vaste stoffen en vluchtige gesuspendeerde vaste stoffen. Het is daarom duidelijk dat uitgebreide behandelingen moeten worden uitgevoerd om aan de standaardvoorschriften te voldoen voordat POME in het milieu (dwz rivieren, meren) kan worden geloosd. Om POME te behandelen, zijn verschillende mechanische, chemische of biologische methoden ontwikkeld. In vergelijking met andere technieken is biologische behandeling echter milieuvriendelijker, goedkoper en energiebesparend. In de afgelopen decennia geniet het gebruik van landbouwafval (water) met het doel om aan industriële eisen te voldoen en nuttige producten te genereren, toenemende belangstelling. Valorisatie is in dit verband het proces van het omzetten van afvalstoffen in waardevolle producten met behulp van micro-organismen zoals gisten, bacteriën en microalgen. Over het algemeen heeft het gebruik van microalgen voor de behandeling van afvalwater de voorkeur, omdat de stoffen die door deze organismen worden geproduceerd een hoge economische waarde kunnen hebben. Bij het begin van dit promotieproject was het gebruik van POME door microalgen tot dan toe vooral gericht op de productie van lipiden, bulkbiomassa en afvalwaterbehandeling: de productie van hoogwaardige verbindingen met het oog op grootschalige kweek was nog nauwelijks onderzocht. Daarom was het doel van dit promotieproject om de leemten in deze kennis op te vullen door: i) het potentieel van het kweken van verschillende microalgensoorten op POME te onderzoeken en de productie van hun bijbehorende hoogwaardige producten te volgen, ii) een reeks milieu- en nutriëntencondities te onderzoeken, om het gebruik van POME als groeimedium voor belangrijke microalgen en hun bijbehorende producten te kunnen optimaliseren, iii) het potentieel van microalgenkweek te onderzoeken om de POME-kwaliteit te verbeteren door kleur- en fenolverbindingen te verwijderen. Deze onderzoeksdoelen werden vertaald in specifieke doelen en vervolgens behandeld in vier onderzoekshoofdstukken. In hoofdstuk 2 hebben we het gebruik van POME door de mariene diatomee *Phaeodactylum tricornutum* onderzocht met

als doel om de productiviteit van fucoxanthine te optimaliseren bij verschillende licht-, temperatuur- en nutriënt-omstandigheden. Fucoxanthine kan een anti-kanker, anti-obesitas en anti-diabetische werking hebben. Ik veronderstelde dat de fucoxanthine-productiviteit van *P. tricornutum* gekweekt op POME afhing van (een combinatie van) lichtintensiteit, nutriëntverhoudingen, zoutgehalte en temperatuur. Eerst werden optimale lichtomstandigheden voor de fucoxanthine-productiviteit bepaald door *P. tricornutum* te kweken op kunstmatig medium. De gevonden optimale lichtintensiteit werd vervolgens toegepast in alle volgende experimenten waarbij op verschillende POME fracties werd gekweekt. Vervolgens werden de effecten van verschillende POME-fracties op de groeisnelheid en de productiviteit van fucoxanthine onderzocht en werden geselecteerde voedingsstoffen toegevoegd om de productiviteit van fucoxanthine te optimaliseren. Box-Behnken design (BBD) –response surface methodology (RSM) werd gebruikt om de optimale combinatie van omgevingscondities te vinden en om de interactie tussen zoutgehalte, temperatuur en nutriënt-concentratie met betrekking tot de fucoxanthine-productiviteit te begrijpen. Door deze stapsgewijze experimenten vonden we dat *P. tricornutum* kan worden gebruikt voor grootschalige fucoxanthine-productie door te kweken op 30% v / v POME. BBD RSM analyse liet zien dat de optimale productiviteit van fucoxanthine werd beïnvloed door temperatuur, zoutgehalte en de toevoeging van ureum. Verrijking van voedingsstoffen door fosfor verhoogde de celdichtheid en de productiviteit van fucoxanthine niet, terwijl ureumtoevoeging beide stimuleerde. Verder werden optimale omstandigheden voor ureum (85 mg L⁻¹), temperatuur (23 ° C) en zoutgehalte (22-23 PSU) bepaald op basis van een laatste experimentele serie. Sinds kort is de belangstelling voor de toepassing van exopolysacharide (EPS) uit microalgen toegenomen. In hoofdstuk 3 werd de productie van gesulfateerd exopolysacharide (sEPS), een gespecificeerd EPS-bijproduct gesynthetiseerd door *P. tricornutum*, bestudeerd met behulp van POME als groeimedium. Op farmaceutisch gebied is sEPS van *P. tricornutum* veelbelovend als ontstekingsremmende, antivirale, antiparasitaire, antitumor en hypocholesterolemische stof. De productie van grootschalige sEPS is echter beperkt vanwege de hoge productiekosten. Als alternatief kan de teelt van microalgen op POME met het doel sEPS te produceren veelbelovend zijn, gezien het relatief hoge gehalte aan voedingsstoffen in het afvalwater, waardoor commerciële voedingsstoffen geheel of gedeeltelijk overbodig worden. Verder kunnen de behandelde, sEPS bevattende POME worden gebruikt voor bodemverbetering in de buurt van de palmolieplantages. Microalgen hebben de neiging om hogere sEPS te produceren onder stressvolle omstandigheden zoals overmatige bestraling en supra-optimale temperaturen, dit als een methode om celbeschadiging te voorkomen. Andere factoren zoals nutriënten-omstandigheden

enzoutgehalte leken ook de EPS-productie en samenstelling te beïnvloeden. Daarom werd verondersteld dat de productie van sEPS door *P. tricornutum* gekweekt op POME zou worden beïnvloed door milieu- en nutriënt-omstandigheden. Om dit te bevestigen, werd een reeks van vier stapsgewijze experimenten uitgevoerd door: I: het bepalen van de optimale POME-concentratie voor de groei van *P. tricornutum*, II: het bestuderen van het effect van nutriënt-toevoegingen op de biomassa van *P. tricornutum* en de productie van sEPS bij groei op 30% POME, III: toepassing van BBD RSM om de optimale omstandigheden voor temperatuur, zoutgehalte en ureumtoevoeging te ontrafelen, en IV: onderzoek naar het effect van nutriënt-verrijking op de efficiëntie van de verwijdering van voedingsstoffen uit POME. De resultaten toonden aan dat *P. tricornutum* een geschikte kandidaat is voor effectieve sEPS productie op 30% POME en een zoutgehalte tussen 20-35 PSU. Met behulp van BBD RSM hebben we vastgesteld dat de interactie tussen hoog ureum (100 mg L^{-1}) en relatief hoge temperaturen (25°C) zowel de groeisnelheid als de sEPS-productie stimuleerde. Bovendien bleek de toevoeging van ureum aan het POME-medium de fosforverwijdering uit POME door *P. tricornutum* te stimuleren. In hoofdstuk 4 werd de brakwater cyanobacterie *Arthrospira platensis* gekweekt op hoge POME-fracties waarna de productie van het pigment C-phycocyanine (C-PC) werd onderzocht als een functie van verschillende kweekomstandigheden. Zoals eerder onderzoek had aangetoond kan een hoge POME-fractie door *A. platensis* worden gebruikt wanneer deze wordt gekweekt in continue kweekmodus. Continue teelt is echter niet gemakkelijk toepasbaar in grootschalige systemen. Voor de huidige experimenten werd daarom verondersteld dat semi-continue kweek de biomassa en C-PC-productiviteit van *A. platensis* gekweekt op POME-medium zou kunnen verbeteren na het optimaliseren van nutriënt- en andere omgevingscondities. Om deze hypothese te bevestigen, werd een stapsgewijze aanpak gevolgd: eerst onderzochten we het interactieve effect van lichtintensiteit en stikstofconcentratie op de biomassa en C-PC-productiviteit van *A. platensis*, wanneer deze werd gekweekt op artificieel groeimedium. Ten tweede werden groei en C-PC-productiviteit van *A. platensis* onderzocht op verschillende POME-fracties. Vervolgens werden de omgevings- en nutriënt-omstandigheden verder onderzocht door de interactieve effecten van lichtintensiteit, ureum, zoutgehalte en POME-concentratie op de productiviteit van C-PC te bepalen. De optimale ureumconcentratie als veelbelovende stikstofbron werd onderzocht in verband met mogelijke toxische effecten bij hogere ureumconcentraties. Bovendien werd het zoutgehalte geoptimaliseerd omdat POME een relatief laag zoutgehalte bevat. Ten slotte werd *A. platensis* gekweekt in een semi-continue modus bij verschillende nutriënt-omstandigheden door ureum of fosfor toe te voegen, om de impact van de N: P-verhouding op biomassa en C-PC-productie tijdens semi-continue teelt te ontrafelen. In deze studie hebben we vastgesteld dat

lichtintensiteit en stikstofconcentratie de belangrijkste factoren zijn voor de productie van C-PC. Gebaseerd op CCD-RSM bleek het optimale zoutgehalte 22,5 PSU te zijn en werd geen remming gevonden tot 813 mg L⁻¹ ureum bij toepassing van batchkweek. Door het toepassen van semi-continue teelt met 50% POME in de eerste fase en 100% POME in de tweede fase was de C-PC-productiviteit hoger in vergelijking met batchkweek met de toevoeging van ureum, en kon een productiviteitsniveau worden bereikt dat even hoog was als het kunstmatige controle-medium Zarrouk. In hoofdstuk 5 hebben we de verwijdering van fenolverbindingen en kleur van POME onderzocht met behulp van *A. platensis*. Voor zover ons bekend ontbrak tot dan toe informatie over de verwijdering van kleur en fenolverbindingen uit POME met behulp van microalgen. In de huidige studie werden factoren die de fenol- en kleurverwijdering beïnvloeden, bestudeerd waarbij ook het mogelijk belangrijke proces van fotodegradatie werd meegenomen. Hierbij werd de initiële fenolconcentratie in POME, lichtintensiteit, POME-fracties, externe stikstoftoevoeging en zoutgehalte gevarieerd. Een reeks controle-experimenten (zonder microalgen) werd uitgevoerd om de bijdrage van fotodegradatie te ontrafelen. In deze studie vonden we dat POME-fracties de groeisnelheid, uiteindelijke biomassa, absolute fenol- en kleurverwijdering door *A. platensis* beïnvloeden. Gebaseerd op Factorial Design werd gevonden dat zoutgehalte, stikstoftoevoeging en initiële POME-concentratie geen invloed hebben op de totale kleurverwijdering. Gebaseerd op CCD RSM zou de toevoeging van fenolverbindingen als gallic-zuur in POME bij hoge lichtintensiteit de groeisnelheid tot 0,45 d⁻¹ en de uiteindelijke biomassa tot 400 g L⁻¹ kunnen verhogen, terwijl aan de andere kant de totale fenolverbindingen bijna volledig (94%) werden verwijderd. Verder droeg fotodegradatie-activiteit aanzienlijk bij aan de verwijdering van fenolverbindingen. De activiteit van *A. platensis* was echter relatief hoger ten opzichte van fotodegradatie bij lage lichtintensiteiten. Een hoge verwijdering van fenolverbindingen kan dus worden bereikt door de combinatie van *A. platensis*-activiteit en fotodegradatie.

2. Implicaties en aanbevelingen

Palmolie speelt een primaire rol in de wereldwijde productie van plantaardige olie. In vergelijking met andere gewassen is het nog steeds de meest economische bron van plantaardige olie vanwege de hoge productiviteit (volume / oppervlakte / tijd) en de relatief lage behoefte aan productief land. De palmolie-industrie levert een enorme bijdrage aan de omzet in Indonesië en andere landen in Zuidoost-Azië. De palmolie-industrie genereert echter ernstige problemen met betrekking tot duurzaamheid, waaronder de vele negatieve gevolgen voor het milieu. Sinds 2014 zijn er strengere wettelijke normen vastgesteld voor POME-kwaliteit voordat deze in het milieu kan worden geloosd. De POME-lozing door kleine tot middelgrote

fabrieken, die gewoonlijk goedkope en conventionele vijverinstallaties gebruiken om het afvalwater te behandelen, voldoet echter niet aan de wettelijke norm vanwege de ineffectiviteit van de behandel-technologie. Sommige fabrieken mengen POME met lege fruittrossen (EFB) voor de productie van compost. Het hoge gehalte van EFB ten opzichte van POME, de lange compostingsperiode en de landvereisten om het te verwerken en op te slaan, lossen echter nog steeds de problemen niet op. Er zijn ook andere opties beschikbaar, zoals het installeren van membraanfiltratie, het verdampen van POME om de afvoer van het afvalwaterafval te minimaliseren en het vergisten van POME met behulp van bioreactor-vergisters. In vergelijking met andere afvalwaterbehandelingen lijkt het installeren van bioreactorvergisters veelbelovend om de industrie duurzamer te maken, omdat niet alleen de hoeveelheid verontreinigende stoffen kan worden verlaagd, maar ook omdat het biogas dat uit dit systeem wordt geproduceerd door de fabriek zelf kan worden gebruikt. Over het algemeen worden microalgen gekweekt op afvalwater om koolhydraten, lipiden en eiwitten te verkrijgen ten behoeve van brandstof en veevoer. Het is echter bekend dat microalgen hoogwaardige bioactieve verbindingen produceren, die verschillende farmaceutische en cosmetische toepassingen kunnen hebben. In dit proefschrift hebben we met succes de mariene diatomee *Phaeodactylum tricornutum* op POME gekweekt, waarbij het bruine pigment fucoxanthine en het bijproduct gesulfateerde exopolysacharide werden geproduceerd. De productie van C-Phycocyanin, een antioxidant geproduceerd door *A. platensis*, werd ook geoptimaliseerd door het toepassen van een semi-continue kweekmodus bij gebruik van hoge POME-gehalten. Door POME te gebruiken als groeimedium voor microalgen, kunnen de kosten van de bioactieve verbindingen die door microalgen worden geproduceerd, worden verlaagd, omdat synthetische media kunnen worden vervangen door geschikte POME-fracties. Bovendien kan de behandelde, sEPS bevattende POME worden gebruikt voor bodemverbetering in palmboomplantages. Ondanks de hoge nutriënteniveaus is het gebruik van POME als groeimedium voor microalgen op industriële schaal nog steeds een uitdaging. Ten eerste kunnen de hoge niveaus van organische verbindingen, bestaande uit tannines, lignine en fenol-verbindingen de groei negatief beïnvloeden. De donkere kleur als gevolg van de hoge concentraties gesuspendeerde vaste stoffen kan de lichtpenetratie remmen, wat een kritische factor is voor autotrofe, fotosynthetische groei. Bovendien kan de aanwezigheid van heterotrofe bacteriën de productiviteit beïnvloeden. De pH en het zoutgehalte van het afvalwater moeten worden aangepast voordat het kan worden gebruikt als groeimedium voor alkalische microalgen zoals *A. platensis* of mariene microalgen, zoals *Phaeodactylum tricornutum*. Zware metalen in POME kunnen de kwaliteit van het microalgenproduct verlagen en kunnen schadelijk zijn voor voedsel- en farmaceutische toepassingen. De hierboven genoemde omstandigheden kunnen

echter worden voorkomen door een voorbehandelingsproces toe te passen om fenolen, kleur en zware metalen in de POME te verlagen. Om het zoutgehalte te verhogen, kan de teelt worden verplaatst naar kustgebieden, om het gebruik van natuurlijk zeewater mogelijk te maken. Bovendien zou het afvalwater kunnen worden gemengd met hypersalien afvalwater zoals dat wordt gegenereerd door industriële activiteiten, zoals chemische productie en olieproductie. Ten slotte moet worden meegenomen dat het type kweekstelsel, zoals gesloten teelt met foto-bioreactoren versus open (vijver) teelt ook de groei, biomassa en het gehalte van hoogwaardige producten kan beïnvloeden. Het moge duidelijk zijn dat meer onderzoek nodig is om het gebruik van POME te optimaliseren voor de productie van hoogwaardige stoffen door microalgen. De optimalisatie moet worden gedaan op basis van een combinatie van benaderingen zoals geschikte voorbehandelingen, keuze van soorten, kweekwijzen, kweekomstandigheden, of nutriënt-verhoudingen, voordat de valorisatie van POME economisch haalbaar wordt.

3. Slotopmerkingen (toekomstperspectief)

Er wordt voorspeld dat bio-energie en hoogwaardige biochemische productie door microalgen gekweekt op POME in de toekomst haalbaarder wordt wanneer de plantage-eigenaren een afvalwaterbehandelingssysteem op basis van bioreactor-vergisters implementeren. Microalgen kunnen gemakkelijker worden gekweekt op de verteerde POME die minder fenolen en giftige stoffen bevatten. De kweek kan worden geïntegreerd met het biogaszuiveringssysteem waarbij CO₂ kan worden gebruikt voor foto-autotrofe kweek. Door dit te integreren, kan biogas met een hogere stookwaarde worden verkregen en kunnen pigmenten met een hoge toegevoegde waarde uit microalgen worden verkregen tegen een lagere prijs in vergelijking met gewone kweek op basis van commerciële meststoffen. Sommige modificaties zoals stikstofbeperking en lichtverzaching kunnen worden gebruikt om sommige carotenoïde pigmenten zoals bètacaroteen en astaxanthine te verbeteren. Een bioraffinage-concept zou in de toekomst ook kunnen worden toegepast, door specifieke scheidingstechnieken toe te passen om afgeleide producten van microalgen te produceren. Een enkele microalgen-cel kan bijvoorbeeld lipiden, eiwitten, koolhydraten en pigmenten produceren, die kunnen worden omgezet in brandstof, voer, polymeren (bioplastics, nanokoolstofcomposiet) en antioxidanten (fucoxanthine, phycocyanine, astaxanthine). Door dit concept te implementeren, kunnen de productiekosten verder worden geminimaliseerd, waardoor de prijs van de producten wordt verlaagd.