

FYCOCYANINE

NATUURLIJKE BLAUWE
KLEURSTOF UIT SPIRULINA



DE BLAUWE
KETEN



FYCOCYANINE

NATUURLIJKE BLAUWE KLEURSTOF UIT SPIRULINA

02

INLEIDING

De laatste jaren besteden consumenten meer aandacht aan hun gezondheid en stijgt de vraag naar clean label-producten (zonder E-nummers). Zo worden bijvoorbeeld synthetische kleurstoffen vervangen door natuurlijke.

Microalgen zijn een waardevolle bron van natuurlijke pigmenten. Eén van de belangrijkste natuurlijke pigmenten afkomstig van microalgen is de blauwe kleurstof fycocyanine. Blauw komt in de natuur zelden voor en de vraag naar natuurlijke kleurstoffen door zowel de voedings-, textiel-, bouw- als papierindustrie neemt sterk toe. De belangrijkste commerciële bron van fycocyanine is de cyanobacterie *Spirulina*.

Door de KU Leuven werd nagegaan hoe de productie van fycocyanine door *Spirulina* gestimuleerd kan worden en hoe de blauwe kleurstof het beste uit de biomassa geëxtraheerd wordt. Stichting Avans bekeek hoe deze fycocyanine moleculen gestabiliseerd kunnen worden voor verdere toepassingen. Ook werd nagegaan of er nog valorisatiemogelijkheden zijn van de restbiomassa. Hiervoor werd de samenstelling van de restbiomassa geanalyseerd door de KU Leuven. Inagro bepaalde via labotesten het biogaspotentieel.

SPIRULINA

Spirulina, ook wel *Arthrospira* genoemd, is een blauwgroen gekleurde microalg die behoort tot de cyanobacteriën. *Spirulina* wordt al sinds de prehistorie geoogst en geconsumeerd in Afrika. Deze wordt op de grootste schaal wereldwijd geproduceerd, hoofdzakelijk in Azië en de VS.

Sommige soorten kunnen tot 1 mm groot worden en de meeste vertonen een typisch spiraalvormige structuur (zie figuur 1). In vergelijking met andere microalgen is *Spirulina* relatief groot waardoor deze eenvoudig geoogst kan worden via filtratie. Daarbovenop kan *Spirulina* tot 20% fycocyanine bevatten.

Spirulina is van nature aanwezig in alkalische meren en gedijt dus het best in water met een hoge pH. Deze hoge pH heeft als voordeel dat contaminatie door andere micro-organismen grotendeels voorkomt en *Spirulina* dus in goedkope,

openlucht productiesystemen (bijvoorbeeld raceway ponds) gekweekt kan worden (zie figuur 2).



Figuur 1: microscopische foto van *Spirulina* filamenten

FYCOCYANINE Natuurlijke blauwe kleurstof uit Spirulina



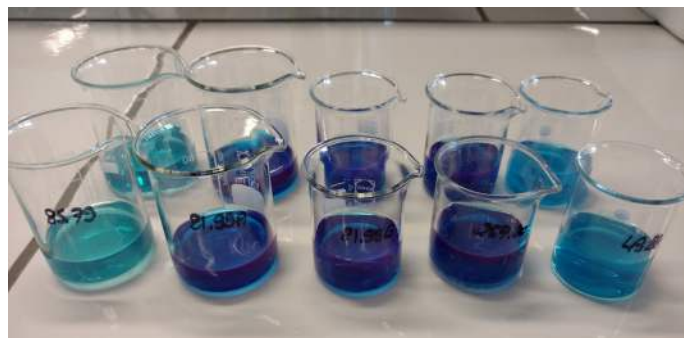
Figuur 2: productie van Spirulina in een raceway pond

DE BLAUWE KLEUR FYCOCYANINE

De courant gebruikte blauwe kleurstoffen zijn hoofdzakelijk synthetisch. De blauwe kleurstof die het vaakst in de industrie wordt gebruikt is de kunstmatige kleurstof briljant blauw (E133). Deze wordt echter in verband gebracht met hyperactiviteit en andere gezondheidsrisico's.

In de zoektocht naar een natuurlijk alternatief voor blauwe kleurstof kan fycocyanine een oplossing bieden. Fycocyanine is een blauw gekleurd eiwit dat van nature voorkomt in cyanobacteriën, ook gekend als blauwgroenalgen. Samen met het groene pigment chlorofyl speelt fycocyanine een belangrijke rol in de fotosynthese. In tegenstelling tot vele andere natuurlijke pigmenten (bv. carotenoïden) is fycocyanine wateroplosbaar. Hierdoor kan de kleurstof zonder schadelijke chemicaliën uit de biomassa geëxtraheerd worden (zie figuur 3).

Naast het gebruik van fycocyanine als blauwe kleurstof is fycocyanine ook een antioxidant met een antivirale en cholesterolverlagende werking waardoor het ook gebruikt wordt als voedingssupplement.



Figuur 3: fycocyanine extracten van verschillende Spirulina stammen

VERHOGEN VAN HET RENDEMENT

In de huidige productiesystemen wordt de kweek van Spirulina niet geoptimaliseerd in functie van de hoeveelheid fycocyanine. Het doel is hoofdzakelijk om zoveel mogelijk biomassa te produceren. Een bijdrage van de KU Leuven bestond erin om het rendement van fycocyanineproductie te optimaliseren. Labstudies van de KU Leuven toonden aan dat Spirulina zijn fycocyanineconcentratie wijzigt onder invloed van de kleur van het licht. Spirulina werd door middel van lichtfilters blootgesteld aan verschillende kleuren licht (zie figuur 4). Hieruit bleek dat rood licht zorgde voor 45% toename van de blauwe kleurstof.



Figuur 4: Spirulina blootgesteld aan verschillende kleuren licht door middel van een lichtfilter

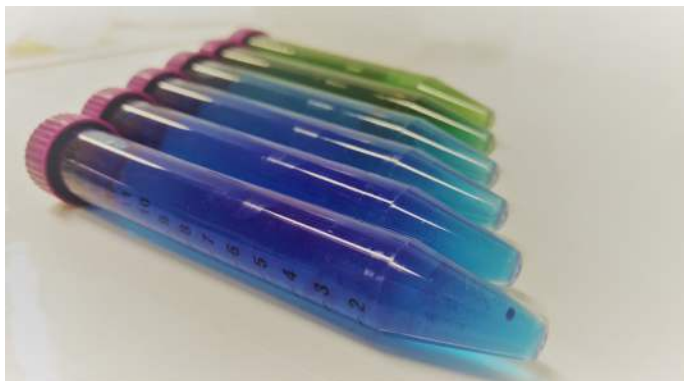
BEHOUD VAN FYCOCYANINE TIJDENS BEWAREN

Na het oogsten van de Spirulina is het belangrijk om deze op een correcte manier te bewaren voor het behoud van fycocyanine. De KU Leuven vergeleek het bewaren van de geoogste biomassa op kamertemperatuur, bij 4°C en diepgevroren. Tijdens bewaring bij kamertemperatuur begint de natte biomassa te rotten en dit resulteert in een heel snelle afbraak van de fycocyanine. De beste bewaarmethode van natte biomassa is invriezen. Bij invriezen blijft de concentratie aan fycocyanine stabiel.

OPTIMALISATIE VAN HET EXTRACTIEPROCES

De KU Leuven heeft ook gewerkt aan een optimalisatie van het extractieproces van de blauwe kleurstof uit Spirulina. Het doel is om een protocol te verkrijgen waarbij fyocyanine geëxtraheerd kan worden door uitsluitend fysische processen en zo weinig mogelijk chemicaliën te gebruiken. Parameters die werden uitgetest zijn onder andere de voorbehandeling van de biomassa, de biomassaconcentratie, de temperatuur, het type solvent (oplosmiddel), de extractietijd en het type ultrafiltratiemembraan voor de verdere zuivering.

De optimale extractie van fyocyanine werd verkregen door 2% gevriesdroogde biomassa gedurende twee uur op kamertemperatuur te extraheren met fosfaatbuffer en verder te zuiveren door ultrafiltratie met een 50 kilodalton membraan (zie figuur 5).



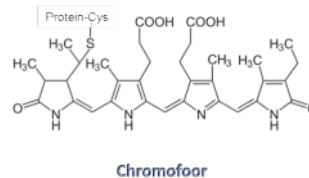
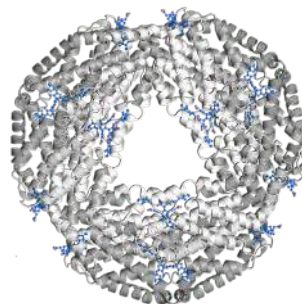
Figuur 5: fyocyanine extracten van verschillende zuiverheid

STABILISATIE FYOCYANINE

De blauwe kleurstof fyocyanine is niet voldoende stabiel voor toepassingen in producten met een langere levensduur. De blauwe kleur vervaagt onder invloed van licht, hogere temperaturen en een te hoge of lage pH (zuurgraad). Dit kan problemen opleveren bij de toepassing van fyocyanine in bijvoorbeeld textiel of papier. Het Centre of Expertise Biobased Economy van Avans hogeschool heeft daarom onderzoek gedaan naar de stabiliteit van fyocyanine bij verschillende temperaturen, pH's en bufferoplossingen. De stabiliteit van fyocyanine is het beste bij kamertemperatuur, licht zure omstandigheden en citraat als bufferoplossing.

Fyocyanine bestaat uit een groot eiwit waaraan chromoforen zijn gebonden (zie figuur 6). Deze chromoforen, die we Phycocyanobiline (PCB) noemen, zijn verantwoordelijk voor de blauwe kleur. Om de stabiliteit van de blauwe kleurstof te verbeteren is gekeken of het mogelijk is om PCB los te knippen van het eiwit, te isoleren en te stabiliseren.

C-Phycocyanine



Figuur 6: Opbouw van fyocyanine

Het is gelukt om een milieuvriendelijke methode te ontwikkelen om PCB te isoleren van fyocyanine. Helaas was de blauwe kleur van alleen PCB niet stabiel dan van fyocyanine. Pogingen om de stabiliteit van PCB te verbeteren door het toevoegen van stabilisatoren of het immobiliseren van PCB op dragermateriaal hebben wel geleid tot verbetering van de stabiliteit, maar onvoldoende voor toepassingen in producten met een langere levensduur (zie figuur 7). De behaalde resultaten geven wel aanknopingspunten voor een verbetering van de lichtechtheid van PCB.



Figuur 7: Wol geverfd met PCB en verschillende stabilisatoren

VALORISATIE RESTSTROOM

Na de extractie van fyocyanine blijft er nog een restfractie over. Deze restfractie is ongeveer 18% van de totale hoeveelheid biomassa. De restfractie bestaat nog voor ongeveer 84% uit organisch materiaal, waarvan 50% eiwit, 11% suikers en 4% as is. Dit organisch materiaal kan gevaloriseerd worden via anaerobe vergisting voor de productie van biogas.

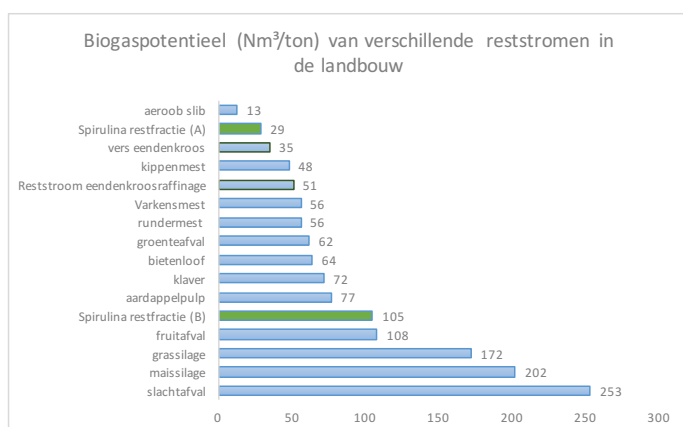
Anaerobe vergisting is een proces waarbij micro-organismen in afwezigheid van zuurstof complexe componenten in de biomassa afbreken tot eenvoudigere moleculen. Hierbij produceren ze biogas en digestaat. Het digestaat is de vergiste biomassa die verder kan worden gebruikt als meststof. Het vergistingsproces vindt plaats in een reactor. Het biogas wordt afzonderlijk

GETUIGENIS

opgevangen en vervolgens richting een warmtekrachtkoppeling (WKK) gestuurd. De voornaamste componenten van het biogas zijn: methaan en CO₂. Het methaan in het biogas wordt verbrand in de motor van de WKK. Deze drijft een generator aan die vervolgens elektriciteit produceert. De warmte uit de motor wordt gebruikt om de reactor op temperatuur te houden. De warmte die overblijft, kan verder nuttig op het bedrijf toegepast worden. Het biogaspotentieel van een reststroom is afhankelijk van de aanwezigheid van vergistbare organische moleculen, zoals vetten en suikers.

Twee restfracties afkomstig van verschillende producenten, werden getest. De eiwitten, suikers en vetten werden geanalyseerd en vervolgens werd het biogaspotentieel op laboschaal bepaald. Ondanks het feit dat beide stalen hetzelfde extractieprotocol voor fycocyanine doorliepen, bevatte één staal beduidend meer vet, eiwit en koolhydraten. De grotere aanwezigheid van energierijke verbindingen resulteerde in een verschil van het biogaspotentieel (factor 3,6).

De biogasresultaten van de twee restfracties worden in Figuur 8 vergeleken met het biogaspotentieel van verschillende veelvoorkomende agrarische reststromen. Op basis van de analyse van staal A lijkt de restfractie geen potentieel te hebben als basis voor vergisting tot biogas. Staal B daarentegen schept een stuk positiever beeld. Het biogaspotentieel is het dubbele van dat van rundermest. Daarvan zijn er al verschillende rendabele biogasinstallaties actief. Een rendabele installatie op Spirulina restfractie is theoretisch dus haalbaar. Door de grote variatie tussen verschillende batches, is een verkennende biogastest per batch echter noodzakelijk om een vergistingsinstallatie optimaal te laten draaien.



Figuur 8: Biogaspotentieel (Nm³/ton) van Spirulina restfractie vergeleken met verschillende reststromen in de landbouw (cijfers van Biogas-E)

DE BLAUWE KETEN



Anne van den Berg,
eigenares van ijssalon
Fresco in Middelburg,
Nederland

Jullie aanbod bevat ook blauw ijs, valt dit in de smaak bij de consument?

Ja, dat valt zeker in de smaak bij de consument. Het blauwe ijs wordt smurfenijns genoemd en smaakt naar vanille-ijs. Het is vooral populair bij de toeristen en voor ons dus commercieel erg interessant.

Weet u welke kleurstof hiervoor gebruikt wordt?

Ja, wij maken ons ijs zelf. Voor het blauwe smurfenijns maken we gebruik van de synthetische kleurstof E133. De leverancier hiervan is Royal Steensma uit Leeuwarden.



Hebben jullie interesse in een natuurlijke variant van deze synthetische blauwe kleurstof?

Jazeker. Wij maken ons ijs op basis van natuurlijke producten en proberen de synthetische kleurstoffen achterwege te laten, maar dat lukt niet voor alles zoals voor het blauwe smurfenijns. We hebben interesse om een natuurlijke variant te gebruiken maar dan moet deze wel betaalbaar zijn.

Hebben jullie al gehoord van de natuurlijke blauwe kleur fycocyanine uit de microalg Spirulina?

Ja, we hebben deze zelfs al eens uitgetest. We kregen een mooie blauwe kleur van het ijs maar hiervoor diende wel veel toegevoegd te worden in vergelijking met de benodigde hoeveelheid van de synthetische kleurstoffen. Bovendien is het product erg duur.



Wist je dat blauwe snoepjes op basis van fycocyanine uit *Spirulina* je tong niet blauw kleuren? Snoepjes met synthetische blauwe kleurstof doen dat wel.





Deze publicatie is gedrukt op
FSC-gecertificeerd papier

CONTACT

KU Leuven

Koenraad Muylaert
E. Sabbelaan 53, B-8500 Kortrijk
✉ koenraad.muylaert@kuleuven.be
🌐 www.kuleuven-kulak.be/biology

Avans Hogeschool

Jappe de Best
Centre of Expertise Biobased Economy
Lovensdijkstraat 63, Breda
✉ Jh.debest@avans.nl
🌐 www.coebbe.nl

Inagro vzw

Carl Coudron
Ieperseweg 87, 8800 Roeselare-Beitem
✉ carl.coudron@inagro.be
🌐 <http://leden.inagro.be/>

Partners



Project Partners light (PPL)



Cofinanciering



Interreg
Vlaanderen-Nederland
Europees Fonds voor Regionale Ontwikkeling

Meer informatie over dit project vindt u op de website van de partners