

DISSERTATION

**Bioraffineriekonzepte mit dem
Euglenoid *Euglena gracilis* Z:
Gewinnung von α -Tocopherol,
Paramylon und Biogas**

zur Erlangung des Doktorgrades
der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Philipp Grimm
geboren am 27. Februar 1979
in Warendorf

Lehrstuhl für Fermentationstechnik
Technische Fakultät
Universität Bielefeld

8. Februar 2016

Erstgutachter: Prof. Dr. techn. Karl Friehs

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Anant Patel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Fertigstellung meiner Dissertation geholfen haben. Ich werde die Zeit auf D5 sicherlich vermissen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Erwin Flaschel, der zu unser aller Bedauern im November 2014 verstarb, für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl anzufertigen und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für Probleme und Ideen hatte. Bei Herrn Prof. Dr. Karl Friehs möchte ich für die darauffolgende Unterstützung und für das Erstgutachten, welches er stellvertretend für Herrn Flaschel übernommen hat, herzlich bedanken. Herrn Prof. Dr. Anant Patel danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens dieser Arbeit. Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Dr. Joe Max Risse für die jahrelange Betreuung meiner Arbeit, für Korrekturlesungen und dafür, dass er mir stets Anregungen gegeben hat. Dem *German Egyptian Research Fund* des Bildungsministeriums für Bildung und Forschung danke ich für den finanziellen Zuschuss für die Anschaffung einer technischen Infrastruktur. Besonderer Dank gebührt Herrn Dipl.-Ing. Thomas Schäffer, da er mir bei allen technischen Problemen, welche teilweise invasionsartig auftraten, mit Rat und Tat zur Seite stand. Frau Galina Beck danke ich für die liebevolle Fürsorge gegenüber meinen Backup-Kulturen und Eberhard „Ebson“ Wünsch für die unzähligen Bestellungen, welche er für mich getätigt hat. Ein riesiges Dankeschön gilt meinen lieben Mitdoktoranden Dominik Cholewa, der immer ein wunderbarer und angenehmer Bürokollege war, Ram Shankar Velur Selvamani, Jakob Müller, Jan-Philipp Schwarzahns, Ying-Fei Shi, Maurice Telaar und Gabriele Kleiner sowie unserem Dauermasteranden Lars Wollenschläger für ihre Hilfsbereitschaft und die schöne gemeinsame Zeit. Der gesamten AG Fermentations-technik danke ich für das kollegiale und freundliche Arbeitsklima. Vielen Dank an Lothar Fallak für elektrische und Horst-Jürgen Nossler, Thorsten Cord und Heinrich Klassen für technische Reparaturen und Spezialanfertigungen. Viktor Klassen danke ich für die unzähligen Stunden, die wir gemeinsam über Biogasgewinnung, Algenkultivierung und Weltverbesserungen philosophiert haben. Vielen Dank auch an meinen Schwager Markus Jahn für die finale Korrekturlesung und meine Eltern für den monetären Support während meines Studiums. Zu guter Letzt möchte ich an dieser Stelle meiner Freundin Claudia danken – für alles!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Ziele der Arbeit	7
3	Theorie	11
3.1	<i>Euglena gracilis</i>	11
3.1.1	Taxonomie	11
3.1.2	Morphologie	11
3.1.3	Natürliche Habitats	14
3.1.4	<i>E. gracilis</i> & Trophie	15
3.2	Hochwertprodukte aus <i>E. gracilis</i>	16
3.2.1	Das Vitamin E-Isomer α -Tocopherol	16
3.2.1.1	Struktur von α -Tocopherol	16
3.2.1.2	α -Tocopherol als Radikalfänger	17
3.2.1.3	Symptome bei Vitamin E-Mangel	18
3.2.1.4	Vorkommen von α -Tocopherol	19
3.2.1.5	α -Tocopherol in <i>E. gracilis</i>	20
3.2.2	Das β -1,3-Glucan Paramylon	21
3.2.2.1	Struktur von Paramylon	22
3.2.2.2	Paramylon in <i>E. gracilis</i>	23
3.2.2.3	Anwendungen von β -Glucanen	24
3.3	Biogas	25
3.3.1	Die Biologie der Biogasentstehung	25
3.3.2	Milieuanforderungen & Prozessparameter	29
3.3.2.1	Einfluss der Temperatur	29
3.3.2.2	pH-Wert	31
3.3.2.3	Sauerstoffpartialdruck	32
3.3.2.4	Redoxpotential	33
3.3.2.5	Elementarzusammensetzung & Spurenelemente	33
3.3.2.6	Flüchtige organische Säuren	34

3.3.2.7	Ammoniak	37
3.3.2.8	Faulraumbelastung & hydraulische Verweilzeit	38
3.3.3	Bestimmung des Biogaspotentials	40
3.4	Bioraffinerien	43
3.5	Bioenergiegewinnung mit Mikroalgen	45
3.6	Biogas aus Mikroalgen als Substrat für die Biogasgewinnung	47
4	Material & Methoden	51
4.1	Mikrobiologische Methoden	51
4.1.1	Medien	51
4.1.2	Stammhaltung	52
4.1.3	Schüttelkolbenkultivierungen	53
4.2	Analytische Methoden	54
4.2.1	Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration	54
4.2.2	Bestimmung der Glucosekonzentration	54
4.2.3	α -Tocopherol-Extraktion	55
4.2.4	Bestimmung der α -Tocopherolkonzentration	56
4.2.5	Bestimmung der Paramylonkonzentration über die Aufreinigung der Granula	57
4.2.6	Bestimmung der Biogaszusammensetzung mittels Micro-GC	57
4.2.7	Konzentrationsbestimmung der flüchtigen organischen Säuren	58
4.2.8	Bestimmung der Ammonium- und Ammoniakkonzentration	59
4.2.9	Elementaranalyse	60
4.2.10	Bestimmung der organischen Trockensubstanz	60
4.3	Verfahrenstechnische Methoden	60
4.3.1	Kultivierungen von <i>E. gracilis</i> im Rührkesselreaktor	60
4.3.2	Quasikontinuierliche, heterotrophe Kultivierung im Rührkesselreaktor	62
4.3.3	Quasikontinuierliche, sequenziell heterotrophe und photohetero- trophe Kultivierung im Rührkessel- und Blasensäulenphotobioreaktor	63
4.3.4	Repetitive, photoautotrophe Satzkultivierung im Blasensäulenpho- tobioreaktor	66
4.3.5	Diskontinuierliche Biogasproduktion im Satzreaktor	68
4.3.6	Kontinuierliche Biogasproduktion im Rührkesselreaktor	69
5	Ergebnisse & Diskussion	73
5.1	Gewinnung von <i>E. gracilis</i> -Biomasse sowie der Hochwertprodukte Paramy- lon und α -Tocopherol	73

5.1.1	Untersuchungen bezüglich des Einflusses verschiedener Kultivierungsmodi auf Biotrockenmassekonzentration und Produktbildung im Schüttelkolbenmaßstab	74
5.1.1.1	Einfluss verschiedener Kultivierungsmodi auf den Phänotyp von <i>E. gracilis</i>	75
5.1.1.2	Einfluss verschiedener Kultivierungsmodi auf die Biotrockenmassekonzentration	76
5.1.1.3	Einfluss verschiedener Kultivierungsmodi auf die Paramylonkonzentration und -selektivität	80
5.1.1.4	Einfluss verschiedener Kultivierungsmodi auf die α -Tocopherolkonzentration und -selektivität	83
5.1.1.5	Kurzzusammenfassung & Fazit	85
5.1.2	Heterotrophe Gewinnung von Paramylon und α -Tocopherol im Rührkesselreaktor mittels satzweiser Kultivierung	86
5.1.2.1	Kurzzusammenfassung & Fazit	92
5.1.3	Quasikontinuierliche Kultivierung von <i>E. gracilis</i> im Rührkesselreaktor im heterotrophen Kultivierungsmodus	93
5.1.3.1	Quasikontinuierliche Gewinnung von Paramylon	100
5.1.3.2	Quasikontinuierliche Gewinnung von α -Tocopherol	101
5.1.3.3	Produktivitäten und Ausbeutekoeffizienten bei quasikontinuierlicher Gewinnung von <i>E. gracilis</i>	103
5.1.3.4	Kurzzusammenfassung & Fazit	106
5.1.4	Quasikontinuierliche, sequenziell heterotrophe und photoheterotrophe Gewinnung von Paramylon und α -Tocopherol	108
5.1.4.1	Verlauf der Produktkonzentrationen und -selektivitäten in der heterotrophen Stufe der quasikontinuierlichen, sequenziell heterotrophen und photoheterotrophen Gewinnung	109
5.1.4.2	Verlauf der Produktkonzentrationen und -selektivitäten in der photoheterotrophen Stufe der quasikontinuierlichen, sequenziell heterotrophen und photoheterotrophen Gewinnung	112
5.1.4.3	Kurzzusammenfassung & Fazit	119
5.1.5	Photoautotrophe Gewinnung von <i>E. gracilis</i> -Biomasse und α -Tocopherol mittels repetitiver Satzkultivierung	121
5.1.5.1	Kurzzusammenfassung & Fazit	124
5.2	Biogasgewinnung mit <i>E. gracilis</i> -Biomasse	125

5.2.1	Einfluss des Kultivierungsmodus und des Erntezeitpunkts der <i>E. gracilis</i> -Biomasse auf den Biogasertrag	126
5.2.1.1	Kurzzusammenfassung & Fazit	131
5.2.2	Verwendung von <i>E. gracilis</i> -Biomasse zur Biogasgewinnung nach α -Tocopherolextraktion	132
5.2.2.1	Fazit	136
5.2.3	Elementare Zusammensetzung der <i>E. gracilis</i> -Biomasse und theoretischer Biogasertrag sowie Methangehalt beim Einsatz der Biomasse als Substrat für die Biogasgewinnung	137
5.2.3.1	Fazit	142
5.2.4	Kontinuierliche Gewinnung von Biogas mit <i>E. gracilis</i> -Biomasse im Rührkesselreaktor	143
5.2.4.1	Kontinuierliche Gewinnung von Biogas mit photoautotroph gewonnener <i>E. gracilis</i> -Biomasse im Rührkesselreaktor	144
5.2.4.2	Kontinuierliche Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnener <i>E. gracilis</i> -Biomasse nach α -Tocopherolextraktion im Rührkesselreaktor	154
5.2.4.3	Kurzzusammenfassung & Fazit	165
6	Zusammenfassung	169
7	Ausblick	171
8	Literaturverzeichnis	173
	Abkürzungen, Symbole & Indizes	203
	Abbildungsverzeichnis	208
	Tabellenverzeichnis	210
	Publikationen	211
	Selbstständigkeitserklärung	213

1 Einleitung

Die langfristig sinkende Verfügbarkeit fossiler Energiequellen, Bevölkerungswachstum, gewaltige anthropogene CO₂-Emissionen sowie der stetig wachsende, weltweite Energiebedarf zeugen von der Erfordernis der Nutzung regenerativer Energiequellen und einer nachhaltigen, energieeffizienten Produktion. Laut Definition der *Internationalen Organisation für erneuerbare Energien* nach Artikel III der Satzung vom 26. Januar 2009 beinhaltet dies alle Formen von Energie, welche in nachhaltiger Weise aus regenerativen Quellen erzeugt werden. Dies beinhaltet unter anderem Bioenergie, Geothermie, Wasserkraft, Meeresenergie (einschließlich unter anderem Gezeiten-, Wellen- und ozeanthermischer Energie) sowie Solar- und Windenergie (BGBI, 2009). Während vor allem Wind- und Solarenergie aufgrund abiotischer Faktoren fluktuierende Erneuerbare Energien (FEE) darstellen, kann Bioenergie aus Biogas flexibel bei Bedarf eingesetzt werden und z. B. Erdgaskraftwerke als Spitzenlastkraftwerke ersetzen. Biogas stellt damit die derzeit erfolversprechendste erneuerbare Ausgleichsoption für die schwankende Stromproduktion aus Wind- und Solarenergie dar (Seide, 2014). Mittelfristig könnte Biogas zudem fast die Hälfte russischer Gasimporte ersetzen (Peschel, 2014).

In Deutschland ist Maissilage das derzeitig vorherrschende Substrat für die Biogasgewinnung. Die energetische Nutzung von Energiepflanzen wie *Zea mays* ist jedoch ethisch fragwürdig, was sich in der präsenten „Tank-oder-Teller-Debatte“ widerspiegelt. Die Annahme, in Zukunft ein einzelnes, adäquates Substrat zu finden, welches alle Probleme gleichzeitig löst, erscheinen zur Zeit eher spekulativer Natur zu sein. Jedoch kann ein Zusammenspiel mehrerer flexibler Bioraffineriekonzepte, bei denen sowohl Hochwertprodukte als auch Energie gewonnen werden können, zu einem gewissen Grad zu der Lösung dieser Probleme beitragen.

Es wurde beschrieben, dass die Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen ausschließlich zur Energiegewinnung aufgrund der verschwenderischen Bodennutzung und des Einsatzes von Düngemitteln und Pestiziden zum derzeitigen Stand der Technik ineffizient ist (Michel, 2012). Für Biogasanlagen, welche mit nachwachsenden Rohstoffen als Substrat betrieben werden, fällt die Energiebilanz jedoch positiv aus, wobei die Energieeffizienz mit zusätzlicher Kraft-Wärme-Kopplung deutlich gesteigert werden kann (Kelm & Taube, 2007). Auch die Gewinnung von Bioethanol aus Zuckerrohr in Brasilien (Senn & Lucà, 2002) sowie

kombinierte Bioraffineriekonzepte, in denen Bioethanol aus Nutzpflanzen gewonnen wird und dabei die übriggebliebene Biomasse der Biogasgewinnung zugeführt wird (Senn, 2003), zeigen ebenfalls positive Energiebilanzen.

Während die Produktion von Biokraftstoffen aus Nutzpflanzen kontrovers diskutiert wird, bietet die Verwendung von Mikroalgen als Rohstoff wichtige Vorteile. Einige davon sind höhere Flächenerträge, geringer Süßwasserverbrauch, keine Konkurrenz zur Nahrungs- und Futtermittelproduktion, die Möglichkeit der Nutzung von Brachland, Reduzierung der Treibhausgasemission in die Atmosphäre und vor allem das Potential, Mikroalgen in verschiedenste Bioraffineriekonzepte zu integrieren (Schenk *et al.*, 2008; Darzins *et al.*, 2010; Rosello Sastre & Posten, 2010). Trotz dieser ganzen Vorteile ist die Gewinnung von Biokraftstoffen aus Mikroalgen zum derzeitigen Stand der Technik unökonomisch (Demirbas & Demirbas, 2010; Morweiser *et al.*, 2010). Um diesen Engpass zu überwinden, wird an der Entwicklung von effizienten Photobioreaktoren, einer energieeffizienten Zellernte, der Selektion geeigneter Mikroalgenstämme sowie einer Optimierung der Kultivierungsbedingungen geforscht (Posten, 2009; Stephens *et al.*, 2010; Rosello Sastre & Posten, 2010). Laut neuerer Studien wäre eine ökonomische Gewinnung von Biokraftstoffen aus Mikroalgenbiomasse in näherer Zukunft jedoch machbar (Acién *et al.*, 2012; Wijffels *et al.*, 2013).

Die Mikroalge *Euglena gracilis* ist zu photoautotrophem, photoheterotrophem und heterotrophem Wachstum befähigt (Buetow, 1989; Ogbonna *et al.*, 2002a), wobei je nach Kultivierungsmodus unterschiedliche Biotrockenmassekonzentrationen und deutlich verschiedene zelluläre Zusammensetzungen zu erwarten sind (Ogbonna, 2009). Dieser Flagellat ist als Quelle für das β -1,3-Glucan Paramylon (Buetow, 1968; Šantek *et al.*, 2009, 2010) und für α -Tocopherol, dem biologisch aktivsten Vitamin E-Derivat, bekannt (Green *et al.*, 1959; Hughes & Tove, 1982; Kusmic *et al.*, 1998). Während Paramylon hauptsächlich in heterotrophen Kulturen vorzufinden ist (Calvayrac *et al.*, 1981; Šantek *et al.*, 2009), wird α -Tocopherol verstärkt unter photoautotrophen Kultivierungsbedingungen gebildet (Kusmic *et al.*, 1998; Ogbonna, 2009), wobei diese Substanzen, welche als Hochwertprodukte betrachtet werden können, bis zu einem gewissen Grad bei jeder *E. gracilis*-Kultur gemessen werden können. Neben α -Tocopherol und Paramylon ist *E. gracilis* auch für die Gewinnung anderer Hochwertprodukte, wie Aminosäuren (z. B. Tyrosin), Ascorbinsäure, β -Carotin, Waxester und Lipide geeignet (Takeyama *et al.*, 1997; Barsanti *et al.*, 2000; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010; Schwarzzhans *et al.*, 2014).

Paramylon zeigt immunstimulierende Eigenschaften und kann als Additiv in der Kosmetikindustrie eingesetzt werden (Bäumer, 1998; Brown & Gordon, 2003). Die positiven Effekte von β -Glucanen auf die menschliche Gesundheit, wie Anti-Tumor-Aktivität, Cholesterinsenkung, Immunantwort sowie Einflüsse auf den glyämischen Index, wurde bereits

zahlreich in der Literatur beschrieben (Quesada *et al.*, 1976; Sugawara *et al.*, 1984; Kondo *et al.*, 1992; Kahlon *et al.*, 1993; Wood, 1994; Brown & Gordon, 2001; Soltanian *et al.*, 2009). Des Weiteren könnte Paramylon als Rohstoff für Biokunststoffe dienen (Bäumer, 1998). Während β -Glucane bis zu 90 % (*w/w*) der Biotrockenmasse von *E. gracilis* ausmachen können (Barsanti *et al.*, 2001), ist der Anteil in anderen Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae*, einer typischen Quelle für β -Glucane, mit ca. 2 bis 7 % (*w/w*) eher gering (Manners *et al.*, 1973; Barsanti *et al.*, 2001). Überdies kann *E. gracilis* einfach in synthetischen Medien kultiviert werden, wobei eine große Anzahl von Kohlenstoffquellen metabolisiert werden kann (Cook, 1968; Kusmic *et al.*, 1998; Barsanti *et al.*, 2001; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010). Für die Produktion von Paramylon benötigen die Zellen zudem keine Illumination, so dass herkömmliche Reaktorsysteme verwendet werden können.

Vitamin E ist das wichtigste fettlösliche Antioxidanz in biologischen Systemen (Eggersdorfer *et al.*, 2012), wobei das α -Isomer aufgrund seiner chemischen Struktur die biologisch aktivste Form von Vitamin E darstellt (Kaiser *et al.*, 1990). Tocopherole wirken als Radikalfänger und schützen vor Schäden an biologischen Membranen, Lipiden, Proteinen und DNA, welche durch oxidativen Stress verursacht werden (Ruggeri *et al.*, 1985; Bramley *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2009). α -Tocopherol und seine Isomere können eine entscheidende Rolle bei einer möglichen Verzögerung der Pathogenese einer Vielzahl degenerativer Erkrankungen, wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs, Entzündungskrankheiten, neurologischen Erkrankungen sowie Erkrankungen am Auge, wie grauer Star und altersbedingte Makuladegenerationen und in der Aufrechterhaltung des Immunsystems spielen (Bramley *et al.*, 2000; Sen *et al.*, 2006). α -Tocopherol stellt eine der wichtigsten Verbindungen für die menschliche Gesundheit dar (Eggersdorfer *et al.*, 2012).

Bereits seit den Fünfzigerjahren des letzten Jahrhunderts ist bekannt, dass Mikroorganismen eine aussichtsreiche Quelle für Tocopherole darstellen (Green *et al.*, 1959). Des Weiteren wurde beschrieben, dass lediglich photosynthetisch aktive Mikroorganismen signifikante Mengen an Tocopherolen synthetisieren (Taketomi *et al.*, 1983; Sen *et al.*, 2006). In einer Arbeit von Tani & Tsumura (1989) wurde *E. gracilis* als der Organismus beschrieben, der unter 285 Stämmen aus 56 Gattungen von Mikroorganismen die höchste Tocopherolselektivität aufweist. Zudem besteht 97 % des Gesamttocopherols in *E. gracilis* aus der biologisch aktivsten *RRR*- α -Form (Shigeoka *et al.*, 1986). Die Tocopherolselektivität in *E. gracilis* ist mit einer spezifischen Konzentration von $5,1 \text{ mg g}^{-1}$ Biotrockenmasse, welche unter Verwendung von Additiven und alternativen Kultivierungsmodi erreicht werden kann, vergleichsweise hoch (Tani & Tsumura, 1989). Konventionelle regenerative Rohstoffe wie Sonnenblumenöl, Palmöl oder Weizenkeimöl weisen mit $0,49 \text{ mg g}^{-1}$, $0,26 \text{ mg g}^{-1}$ bzw. $1,33 \text{ mg g}^{-1}$ weitaus geringere spezifische Konzentrationen auf (Slover,

1971). Außerdem machen die ölhaltigen Früchte dieser Pflanzen ledig einen geringen Anteil der Gesamtpflanze aus.

Im Kontext der Nachhaltigkeit wird die Nutzung von Abfällen, deren Menge aufgrund des globalen Wachstums stetig steigt, für die Produktion von erneuerbaren Energien immer wichtiger. Besonders die Verwendung von organischen Abfällen wird in diesen Bereichen zunehmend interessanter. In Deutschland z. B. wird das Bestreben nach geschlossenen Stoffkreisläufen immer größer, was zu Gesetzen bezüglich einer Kreislaufwirtschaft geführt hat. Der Zweck dieser Gesetze ist, „*die Kreislaufwirtschaft zur Schonung der natürlichen Ressourcen zu fördern und den Schutz von Mensch und Umwelt bei der Erzeugung und Bewirtschaftung von Abfällen sicherzustellen*“ (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, 2012).

In den 1950er-Jahren wurde erstmals beschrieben, dass Algenbiomasse ein aussichtsreiches Substrat für die Biogasgewinnung darstellt (Golueke *et al.*, 1957; Golueke & Oswald, 1959). Nachdem über einen längeren Zeitraum wenig über die Nutzung von Algenbiomasse zur Energiegewinnung beschrieben wurde, erlebt dieses Thema seit Beginn dieses Jahrtausends eine Renaissance, was sich in der Häufigkeit neuer wissenschaftlicher Artikel über die vielseitige Verwendung eines solchen Substrates zur Bioenergiegewinnung widerspiegelt (Yen & Brune, 2007; Sialve *et al.*, 2009; Mussnug *et al.*, 2010; Wiley *et al.*, 2011; Miao *et al.*, 2013; Dębowski *et al.*, 2013; Ramos-Suárez & Carreras, 2014; Marsolek *et al.*, 2014; Prajapati *et al.*, 2014a; Grimm *et al.*, 2015; Klassen *et al.*, 2015).

Die Gewinnung von α -Tocopherol, Paramylon und Biomethan unter der Nutzung des Protisten *E. gracilis* Z stellen aussichtsreiche Bioraffineriekonzepte dar. Nach Extraktion des Produktes α -Tocopherol, welches nur einen geringen Anteil der Biomasse ausmacht, kann die übrig gebliebene Biomasse als Substrat für die Produktion von Biomethan genutzt werden. Das bei der Biomethanbildung entstehende Kohlendioxid, welches einen direkten Bestandteil des Biogases ausmacht bzw. jenes, welches bei der Verbrennung des Biogases zur Stromgeneration entsteht, könnte als Kohlenstoffquelle für die phototrophe Kultivierung von *E. gracilis* eingesetzt werden. Somit ließe sich das im Prozess entstandene Kohlendioxid bis zu einem gewissen Grad direkt sequestrieren. Auch der Gärrest könnte als Medienbestandteil eingesetzt werden. Im Falle des Produktes Paramylon, welches unter der Verwendung adäquater, heterotropher Prozessbedingungen den Großteil der Biotrockenmasse ausmachen kann, ist die Verwendung der übriggebliebenen Restbiomasse für die Biomethangewinnung schwierig. Der Prozess der Paramylonaufreinigung beinhaltet aufeinanderfolgende Waschschrte mit Protease- und Harnstofflösungen, was dazu führt, dass nur ein kleiner, extrem verdünnter Teil der Biomasse für die Biogasgewinnung zur Verfügung stünde, so dass eine Aufkonzentrierung unumgänglich wäre. Bei der strikt photoautotrophen Biomassegewinnung ist der Paramylonanteil zwar weitaus geringer

und somit der Anteil an Restbiomasse nach der Aufreinigung des Paramylons weitaus höher als bei heterotropher Kultivierung, aber der Aufreinigungsprozess würde dennoch zu einer Verdünnung der Restbiomasse führen, so dass auch im Fall der photoautotroph gewonnenen Biomasse die Nutzung der Restbiomasse zur Biogasgewinnung problematisch wäre. Eine ökonomische Nutzung der Restbiomasse nach der Aufreinigung des Paramylons wäre dennoch denkbar, wenn diese nach der Aufreinigung zumindest teilweise als Medienbestandteil zurückgeführt würde. Aus diesem Grund stellt jedes Konzept für sich einen im Ansatz geschlossenen Stoffkreislauf dar. Da sowohl bei der Tocopherolextraktion, als auch bei der Paramylonaufreinigung Lösemittel zum Einsatz kommen, sind in dieser Fraktion auch sämtliche Lipide gelöst, welche ebenfalls als Hochwertprodukt oder als Edukt für die Biodieselgewinnung Verwendung finden könnten. Abgesehen von dem von Natur aus hohen Anteil an α -Tocopherol und Paramylon, ist ein weiterer Vorteil von *E. gracilis* gegenüber sehr vielen anderen Mikroalgen, dass die Ernte der Biomasse allein durch Sedimentation erfolgen kann, was energie- und kostenaufwendiges Aufkonzentrieren unnötig macht. Bei dem hier verwendeten Stamm *E. gracilis* Z handelt es sich zudem um einen Wildtypstamm, was bedeutet, dass bei der Integration in ein Bioraffineriekonzept keine biologische Sicherheitsstufe in Bezug auf gentechnisch veränderte Mikroorganismen beachtet werden muss.

2 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung neuer Bioraffineriekonzepte mit dem photosynthetisch aktiven Protisten *E. gracilis* Z. Diese beinhalteten die effiziente Gewinnung von Hochwertprodukten und die energetische Nutzung der verbliebenen Biomasse für die Produktion von Biokraftstoffen der 3. Generation. Als Hochwertprodukte sollten α -Tocopherol und Paramylon untersucht werden. Als Nebenprodukt sollte die Restbiomasse selbst betrachtet werden, welche durch eine Produktveredelung zu Biogas konvertiert werden sollte. Abbildung 2.1 zeigt ein mögliches Bioraffineriekonzept mit *E. gracilis*-Biomasse zur Gewinnung von α -Tocopherol und Biogas.

Zu den primären Zielen gehörte zunächst unter Bedingungen von satzweisen Kultivierungen herauszufinden, mit welchen Betriebsparametern der Organismus hohe Produktkonzentrationen generiert. Aufgrund großer Unterschiede in der Biotrockenmasse- und Produktkonzentration je nach angewandtem Kultivierungsmodus war es notwendig unterschiedliche Bioraffineriekonzepte zu entwickeln. Ein wichtiger Faktor war die Verwendung eines kostengünstigen Mediums, bei dem replizierbare Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen erreicht werden können. Im Falle der Kultivierungen mit einer organischen Kohlenstoffsupplementierung sollte zusätzlich darauf geachtet werden, eine ökonomisch sinnvolle Substanz zu verwenden.

Es war generell von Interesse, den Fokus auf den Zustand der Biomasse zu legen. Unterschiedliche Produktkonzentrationen bei unterschiedlichen Kultivierungsmodi wurden aufgrund vorangegangener Literaturrecherchen vorausgesetzt. Es wurde jedoch angenommen, dass die Biomassezusammensetzung vor allem in Bezug auf die Hochwertprodukte unterschiedlich ist, wenn die Biomasse zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet wird. Aus diesem Grund lag die Annahme nahe, dass sowohl der Biogasertrag als auch die Gaszusammensetzung je nach Kultivierungsmodus und Erntezeitpunkt unterschiedlich ist. Dieser Zusammenhang sollte in Satzprozessen untersucht werden.

Um eine mögliche industrielle Realisierung der Prozesse zu untersuchen, sollte der Produktionsorganismus in Bioreaktoren bei unterschiedlichen Betriebsweisen im Labormaßstab kultiviert werden. Da *E. gracilis* unter heterotrophen Bedingungen weit höhere Biotrockenmassekonzentrationen erreichen kann, als unter photoautotrophen Bedingungen, die spezifische α -Tocopherolkonzentration andererseits unter Illumination höher ist, sollte

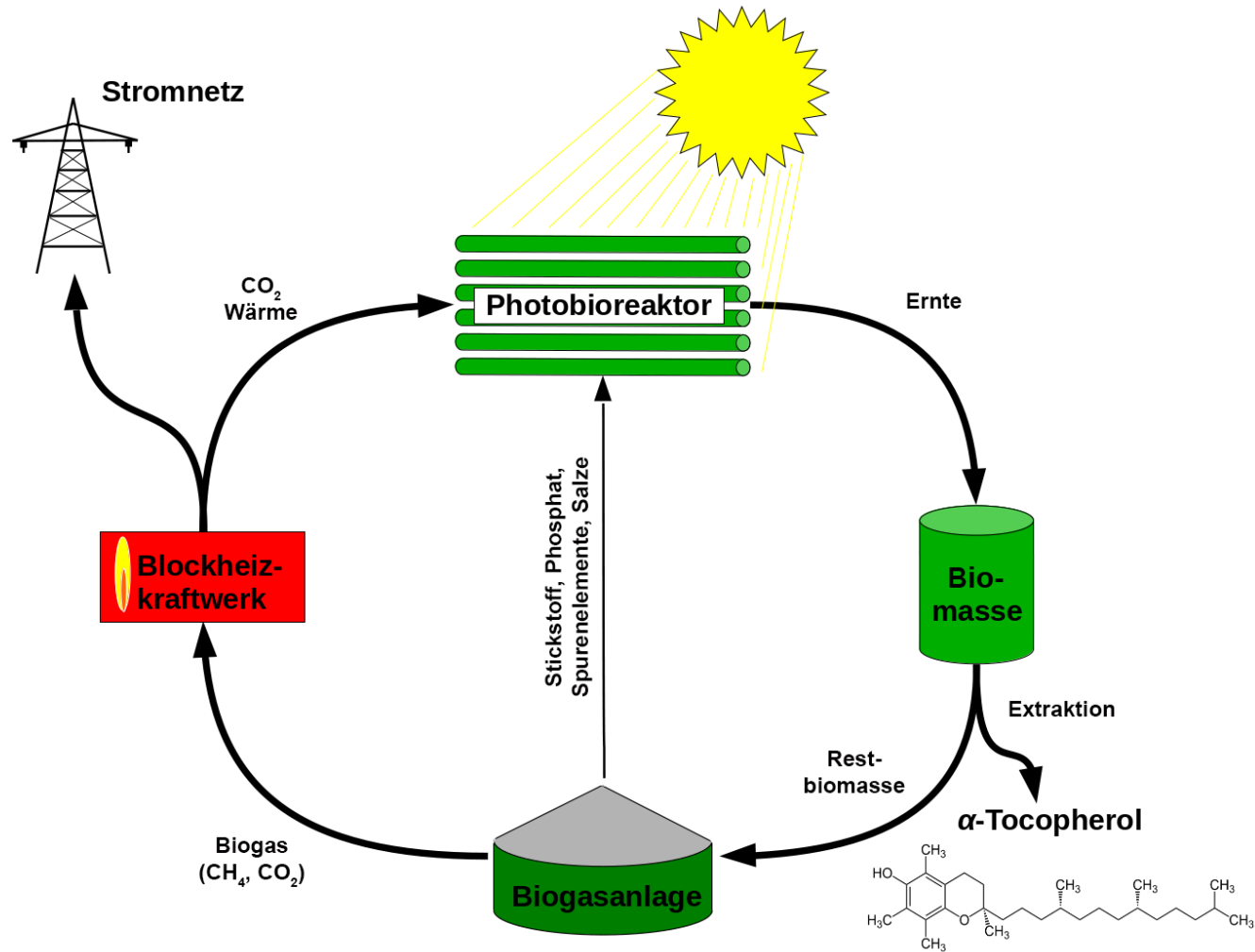


Abbildung 2.1: Beispiel eines möglichen Biorefineriekonzeptes mit photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse zur Gewinnung von α -Tocopherol als Hochwertprodukt und Biogas als Biokraftstoff der 3. Generation. Die Salze aus dem Schlamm der Biogasanlage könnten als Medienbestandteile rezykliert und das CO₂ aus dem Rauchgas des Blockheizkraftwerks als Kohlenstoffquelle für *E. gracilis* eingesetzt werden. Dadurch könnte ein nahezu geschlossener Kreislauf realisiert werden.

ein quasikontinuierlicher Prozess etabliert werden, in welchem die Biomasse zunächst unter heterotrophen Bedingungen zu hohen Biotrockenmassekonzentrationen kultiviert und anschließend zur Produktinduktion in eine zweite Stufe unter Illumination geleitet wird.

Des Weiteren sollte der Biogasertrag von *E. gracilis*-Biomasse als Substrat untersucht werden, welche mit unterschiedlichen Kultivierungsmodi kultiviert und zu verschiedenen Erntezeitpunkten geerntet werden. Außerdem sollte im Rahmen eines Bioraffineriekonzeptes untersucht werden, in wie weit sich das Substrat auch nach der Extraktion des Produktes α -Tocopherol für die Biogasgewinnung eignet. Diese quantitativen und qualitativen Untersuchungen sollten in Satzreaktoren realisiert werden. Mittels einer Elementaranalyse sollte die Zusammensetzung der *E. gracilis*-Biomasse in Abhängigkeit vom angewandten Kultivierungsmodus ermittelt, der Biogasertrag qualitativ und quantitativ theoretisch berechnet und mit den experimentell generierten Daten verglichen werden.

Die Biomasse sollte zudem vor und nach Produktabtrennung in kontinuierlichen Prozessen als Monosubstrat für die Biogasproduktion im Labormaßstab eingesetzt werden. Dabei sollten verschiedene Raumbelastungen getestet, der Biogasertrag ermittelt und die Prozessstabilität vor allem auf Basis der Konzentration an flüchtigen organischen Säuren sowie der Ammoniumkonzentration bewertet werden.

3 Theorie

3.1 *Euglena gracilis*

3.1.1 Taxonomie

Die Zellen der Gattung *Euglena* wurden vermutlich bereits 1675 von dem niederländischen Naturforscher Antoni van Leeuwenhoek bei seinen umfangreichen Mikroskopierversuchen beobachtet (Dobell, 1932). Die Gattung *Euglena* wurde jedoch erst 1838 von Christian Gottfried Ehrenberg benannt (Ehrenberg, 1838) und die Art *E. gracilis*, von Georg Albrecht Klebs 1883 erstmals beschrieben (Klebs, 1883).

In Bezug auf die Synthese von Fettsäuren weist *E. gracilis* charakteristische Mechanismen sowohl von pflanzlichen, als auch tierischen Zellen auf (Wolken, 1961; Hack *et al.*, 1962; Korn, 1964). In chloroplastenhaltigen Zellen liegen pflanzenähnliche Lipide vor, deren Hauptanteil in den Chloroplasten vorzufinden sind, während etiolierte, chloroplastenfreie Zellen tierische Fettsäurestrukturen aufweisen (Rosenberg *et al.*, 1965; Hulanicka *et al.*, 1964). Aus diesem Grund wurde der photosynthetisch aktive Organismus von Botanikern dem Pflanzenreich als Euglenophyta und von Zoologen dem Tierreich als Protozoa eingeordnet (Leedale, 1967; Noma & Asakawa, 1998; Buetow, 2011). Da die taxonomische Einordnung mittels morphologischer Untersuchungen nicht eindeutig möglich ist, wurden von von der Heyden *et al.* (2004) mittels Analysen der 18S-rRNA ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Laut dieses Stammbaums zählt die Art *E. gracilis* zu dem eigenständigen Taxon der Euglenidae. Obwohl *E. gracilis* keine Alge ist, ist die Zuordnung zu den Mikroalgen hingegen jedoch korrekt, da dieser Begriff keine monophyletische Gruppe beschreibt (Pulz & Gross, 2004; Rosello Sastre & Posten, 2010).

3.1.2 Morphologie

Zellen der Gattung *Euglena* weisen ein relativ breites Größenspektrum auf. *E. minuta* erreicht eine Größe von etwa 12 x 5 μm , während *E. oxyuris*, der größte Vertreter dieser Gattung, eine Größe von bis zu 530 x 40 μm erreichen kann (Buetow, 2011). Eine *E. gracilis*-Zelle ist etwa 50 μm lang und ca. 10 μm breit (Buetow, 2011; Leedale, 1982). Eine schematische Darstellung einer *E. gracilis*-Zelle nach Leedale (1982) ist in Abbildung 3.1

dargestellt. Die Form der Zellen kann von fast sphärisch bis spindelförmig variieren, wobei der Großteil der Zellen spindelförmig vorliegt (Buetow, 2011). Je nach Wachstumsphase und Trophie kann sich der Phänotyp grundlegend verändern. Die Chlorophyll a- und b-haltigen Chloroplasten sind bei phototrophen Wachstum für die Grünfärbung verantwortlich. In Abwesenheit von Licht erscheinen die Zellen farblos. Ein solches „Bleichen“ der Zellen kann auch experimentell zum Beispiel durch eine längerfristige Kultivierung bei Temperaturen zwischen 32 °C und 35 °C (Pringsheim & Pringsheim, 1952) herbeigeführt werden. Eine Zellteilung findet bei Exposition bei erhöhten Temperaturen zwar statt, die Replikation der Chloroplasten hingegen wird dabei inhibiert (Pringsheim & Pringsheim, 1952). Eine chemische Behandlung, zum Beispiel durch die Zugabe des Antibiotikums Streptomycin (Provasoli *et al.*, 1948) oder eine längeren Exposition bei einer nicht-letalen Dosis UV-Strahlung (Lyman *et al.*, 1961), kann auch in permanent plastidenfreien Wildtypstämmen resultieren.

Die Hülle der Chloroplasten in *E. gracilis* bestehen im Gegensatz zu denen in höheren Pflanzen und Algen aus drei Membranen. Aufgrund dieser Tatsache wird angenommen, dass diese Chloroplasten im Zuge einer sekundären Endosymbiose mit einem eukaryotischen Endosymbionten entstanden sind (Archibald & Keeling, 2002). Das Chloroplastengenom wurde im Jahr 1993 von Hallick *et al.* (1993) vollständig sequenziert. Im Gegensatz zu Chloroplasten höherer Pflanzen wird in diesem Organell keine Stärke gespeichert, kein Sulfat oxidiert bzw. aktiviert und es ist auch keine NADP⁺-abhängige Malatdehydrogenase vorhanden. Die Dehydrogenase und der Schwefelmetabolismus findet bei *E. gracilis* in den Mitochondrien statt (Buetow, 2011).

Alle Vertreter der Euglenoiden weisen einen Pelliculakomplex auf (Buetow, 1968). Bei einigen Arten ist dieser starr, so dass die Zellen eine feste Form aufweisen. Bei anderen Arten, unter anderem bei *E. gracilis*, ist die mit symmetrischen und helikal angeordneten Streifen versehene Pellicula äußerst flexibel und ermöglicht den Zellen so eine deutliche Veränderung der Form und eine damit einhergehende ‚metabolische‘ oder ‚euglenoide‘ Bewegung ohne mit der Flagelle zu schlagen (Jahn, 1946; Buetow, 1968, 2011). Während dieser Bewegung gleiten die benachbarten Pelliculastreifen aneinander vorbei, wobei die Länge und die Breite der Streifen beibehalten wird (Suzaki & Williamson, 1985, 1986). Im relaxierten Zustand weisen die Zellen eine zylindrische Form auf. Bei Kontraktionen hingegen zeigen diese eine sphärische Gestalt. Beide Zustände können über die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration gesteuert werden (Murray, 1981). Der Pelliculakomplex besteht aus der Zellmembran, Rillen und Kämmen, welche auf jeder Seite eine Einkerbung aufweisen, vier Mikrotubuli und einem subpelliculären Tubulus des endoplasmatischen Reticulums (Sommer, 1965). Die Zellmembran wiederum ist dreilagig und bedeckt die ganze Zelle, einschließlich den Rillen und Kämmen, dem Reservoir und der Flagelle (Buetow, 1968).

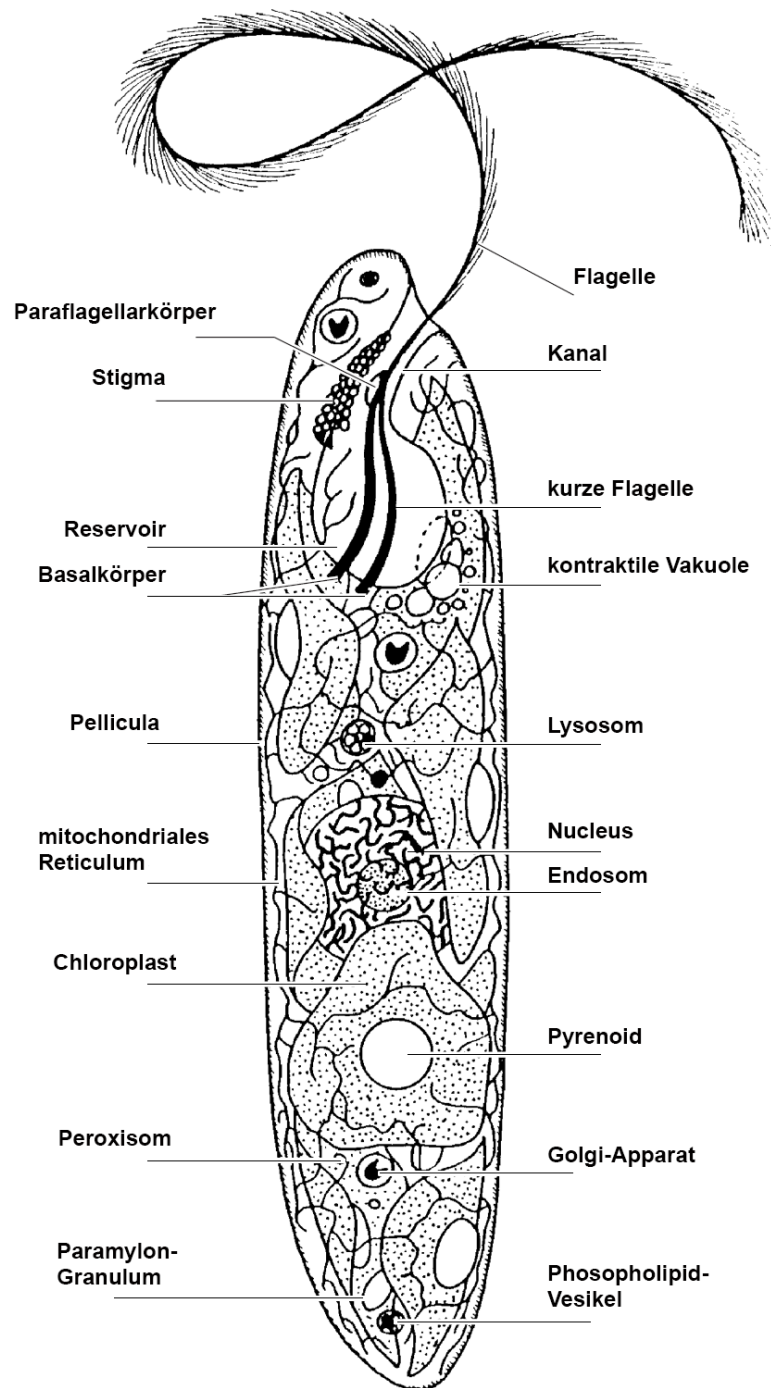


Abbildung 3.1: Morphologie einer *E. gracilis*-Zelle und ihrer Organellen nach Leedale (1982).

Am anterioren Ende der Zelle befinden sich zwei Flagellen. Die längere wird für die Fortbewegung verwendet, wohingegen die Funktion der kürzeren Flagelle ungewiss ist (Buetow, 1968). Vermutlich ist diese ein rudimentäres Gegenstück zu einer der zwei lokomotorischen Flagellen, welche in verwandten Gattungen gefunden werden (Leedale, 1966; Buetow, 1968). Nach Round (1973) ist die lokomotorische Flagelle pleuronematisch und trägt Mastigonema. Die kurze Flagelle ist acronematisch und somit glatt. Beide Flagellen entspringen den Basalkörpern, welche direkt unter der Membran des Reservoirs liegen (Beams & Anderson, 1961; Pitelka, 1963). Während der Zellteilung teilt sich jeder Basalkörper, wobei jeweils die entsprechende Flagelle gebildet wird (Ratcliffe, 1927; Pringsheim & Pringsheim, 1952; Beams & Anderson, 1961). Ob die Spitze der acronematischen Flagelle mit der pleuronematischen Flagelle verbunden ist, wie Pringsheim & Pringsheim (1952) postuliert haben, konnte bei elektronenmikroskopischen Studien nicht nachgewiesen werden (Pitelka, 1963). Die Zelle wird durch eine schraubenförmige Rotation der pleuronematischen Flagelle, welche unter ATP-Verbrauch stattfindet, in die anteriore Richtung gezogen, wobei sich die Zelle um die eigene Längsachse dreht (Bovee, 1982). Die lokomotorische Flagelle ist von variabler Länge, kann unter Stressbedingungen oder bei Reizung verloren gehen (Leedale, 1966; Buetow, 1968) und bei Verbesserung der Bedingungen regeneriert werden (Buetow, 1968). Wie alle motilen Flagellen und Cilien weisen auch die Flagellen der Gattung *Euglena* die als Axonem bezeichnete $9 \times 2 + 2$ -Struktur auf (Leedale, 1982). Somit ist die longitudinale Faseranordnung der Flagellen dieser Gattung identisch mit denen, die auch in pflanzlichen (Manton, 1952) und tierischen (Fawcett & Porter, 1954) Flagellen und Cilien vorkommen.

An der Flagellenbasis befindet sich ein Augenfleck. Diese auch als Stigma bekannte Struktur wird in allen normalerweise grünen Vertretern der Gattung *Euglena* gefunden (Buetow, 1968). Dieses Organell ist nicht nur namensgebend für diese Gattung, sondern erlaubt dem Organismus unter Zuhilfenahme der Flagelle eine phototaktische Bewegung. Der eigentliche Photorezeptor ist dabei jedoch der Paraflagellarkörper, welcher dem im Cytoplasma gelegene Stigma direkt gegenüber liegt (Ghetti *et al.*, 1985). Im Cytosol befinden sich üblicherweise bis zu 20 Chloroplasten mit Pyrenoid, dem Speicherorganell von Rubisco, und kontraktile Vakuolen (Buetow, 1968). Letztgenannte sorgen dafür, dass die Zellen aufgrund des osmotischen Drucks nicht platzen. Die Reproduktion erfolgt durch mitotische Zellteilungen, ein sexueller Zyklus ist bei dieser Gattung nicht vorhanden (Johnson, 1968).

3.1.3 Natürliche Habitate

Aufgrund der zum Teil extremen Toleranz gegenüber abiotischen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert und Salinität sind Zellen der Gattung *Euglena* in der Natur weit verbreitet. Zum Beispiel wurden Arten beschrieben, welche bei Temperaturen zwischen $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $38\text{ }^{\circ}\text{C}$

bzw. pH-Werte zwischen 0,9 und 11 tolerieren, was dazu führt, dass im Schnee, in aziden Kohlemien und in alkalinen Sümpfen Vorkommen beschrieben wurden (Lackey, 1968; Buetow, 2011). Die Art *E. gracilis* kommt häufig in z. T. stark eutrophierten Gewässern vor (Lackey, 1938). Daher kann *E. gracilis* auch zur Sanierung von verschmutzten Abwässern verwendet werden (Krajčovič *et al.*, 2015). Diese Art wurde auch in hohlen Baumstämmen, verschmutzten Flüssen und im Brackwasser gefunden (Lackey, 1938). Es ist auch bekannt, dass *E. gracilis* komplexe organische Materie abbauen kann (Chae *et al.*, 2006). Marine Arten bilden eine Ausnahme. Einige Arten der Gattung *Euglena* wurden sogar im Schlamm eines Imhoff-Tanks, einer Vorstufe moderner Biogasanlagen, gefunden (Lackey, 1938).

3.1.4 *E. gracilis* & Trophie

Neben der Fähigkeit aus anorganischem CO₂ und Sonnenlicht unter Wasserspaltung Biomasse aufzubauen, ist dieser Organismus in der Lage eine ganze Reihe an organischen Kohlenstoffquellen zu metabolisieren und für den Aufbau von Biomasse zu verwenden. Die unterschiedlichen *E. gracilis*-Stämme unterscheiden sich mitunter in der Fähigkeit der Metabolisierung einiger Substanzen. Neben Kohlenhydraten wie Glucose und Fructose können auch einige Säuren wie Essigsäure, Glutaminsäure, Äpfelsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, Fumarsäure und Buttersäure sowie die Alkohole Ethanol, Propanol und Butanol metabolisiert werden (Cook, 1968; Kempner, 1982). Andere Substanzen wie Glycolsäure, Glyoxylsäure, Glycin, Citrat und Galactose hingegen können von *E. gracilis* nicht genutzt werden (Cook, 1968). Ein anderer Stamm, *E. gracilis* var. *bacillaris*, kann z. B. bei photoheterotropher Kultivierung Glycerin verstoffwechseln, bei strikt heterotropher hingegen nicht (Cramer & Myers, 1952). Bei autotrophem Wachstum kann *E. gracilis* Z hohe relative CO₂-Sättigungen bis zu 40 % (*v/v*) und sehr hohe Lichtflüsse tolerieren (Cook, 1968; Nakano *et al.*, 1995; Kitaya *et al.*, 1998). Dabei weist *E. gracilis* eine sehr hohe Photosyntheseleistung auf, welche etwa sechzigfach höher liegt als die von *Oryza sativa*, wobei die Effizienz der Umwandlung von CO₂ zu O₂ doppelt so hoch ist wie die von *Chlorella* sp. (Kitaya *et al.*, 1998). *E. gracilis* ist jedoch Thiamin- und Cobalamindefizient, so dass diese Substanzen für das Wachstum und Zellteilungen obligat sind (Calvayrac *et al.*, 1981).

Es wurde beschrieben, dass *E. gracilis* aufgrund photoprotektiver Mechanismen äußerst resistent gegen Ionisations- und UV-Strahlung ist (Jahn & Bovee, 1968), weshalb bereits angedacht wurde, diesen Organismus auch in geschlossenen Lebenserhaltungssystemen wie z. B. Raumstationen als Produzent von Sauerstoff und Nahrung zu verwenden (Kitaya *et al.*, 1998). Der Nährwert von *E. gracilis* ist ausreichend, um als alleiniges Futtermittel für Mäuse und Ratten zu dienen (Antonian *et al.*, 1985). Aufgrund des hohen Proteinanteils wurde die Nutzbarkeit von *E. gracilis* als Tierfutter auch von Chae *et al.* (2006) beschrieben. Da eine

Pathogenität von Wildtypen von *E. gracilis* nicht bekannt ist, könnte dieser Organismus somit auch für die menschliche Ernährung eingesetzt werden.

3.2 Hochwertprodukte aus *E. gracilis*

3.2.1 Das Vitamin E-Isomer α -Tocopherol

Vitamin E wurde von Evans & Bishop (1922) als Ernährungsfaktor beschrieben, welcher für die Reproduktion von Ratten essenziell ist. Aus diesem Grund wird auch der Name aus dem Altgriechischen von „*tokos*“ für „Geburt“ und „*phero*“ für „erzeugen“ zusammengesetzt, wobei die Endung „*ol*“ auf Eigenschaften von Alkoholen hinweist (Sen *et al.*, 2006). Das amphipathische Antioxidans α -Tocopherol ist ein Strukturisomer der β -, γ - und δ -Tocopherole, welche zusammen mit den α -, β -, γ - und δ -Tocotrienolen die in der Natur vorkommenden Vitamin E-Derivate darstellen (Kaiser *et al.*, 1990; Fryer, 1992; Bramley *et al.*, 2000). Vitamin E ist das wichtigste lipophile Antioxidans in biologischen Systemen, wobei die α -Form der Tocopherole eine der wichtigsten chemischen Verbindungen für die menschliche Gesundheit darstellt (Eggersdorfer *et al.*, 2012). Der Begriff Vitamin E wird häufig nur für α -Tocopherol verwendet. Dieser Ausdruck ist zwar nicht falsch, jedoch unvollständig und kann daher irreführend sein (Sen *et al.*, 2006).

3.2.1.1 Struktur von α -Tocopherol

In der Grundstruktur weisen alle Isomere einen Chromanring auf, an welchem an Position C2 eine gesättigte C16-Phytolkette, welche aus Isoprenoiden besteht, geknüpft ist. Die α -, β -, γ - und δ -Formen der Tocopherole und Tocotrienole unterscheiden sich in der Anzahl und der Position der Methylgruppen am Chromanring (Bramley *et al.*, 2000). Während α -Tocopherol und α -Tocotrienol an C5 (R_1), C7 (R_2) und C8 (R_3) Methylgruppen aufweisen, sind δ -Tocopherol und δ -Tocotrienol hingegen nur an Position C8 methyliert (Fryer, 1992). Der Unterschied zwischen den Tocopherolen und den Tocotrienolen liegt in den Sättigungen an der Phytolkette. Während die Bindungen an der Phytolkette bei den Tocopherolen vollständig gesättigt vorliegt, weisen Tocotrienole an den Positionen C3, C7 und C11 ungesättigte Bindungen auf (Bramley *et al.*, 2000). Eine allgemeine Strukturformel ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

Die Methylierungen am Chromanring stehen im direkten Zusammenhang mit der biologischen Aktivität. Rice & Kennedy (1988) konnten zeigen, dass mit steigender Anzahl an Methylierungen am Chromanring auch die biologische Aktivität steigt. Aufgrund der dreifachen Methylierung am Chromanring weist α -Tocopherol die höchste biologische Aktivität der Tocopherole auf (Kaiser *et al.*, 1990; Fryer, 1992; Bramley *et al.*, 2000). Auch

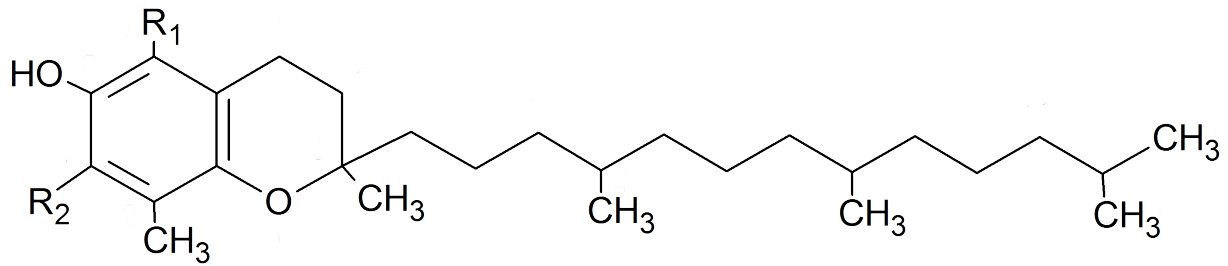


Abbildung 3.2: Allgemeine Strukturformel der Tocopherole.

in vivo zeigt das α -Isomer die höchste biologische Aktivität (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). Generell wird eine Abnahme der Aktivität in der Reihenfolge $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ beschrieben (Burton & Ingold, 1981; Neely *et al.*, 1988). Die relativen Aktivitäten der Tocopherole und einiger Tocotrienole sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Relative Aktivität der Tocopherole und Tocotrienole in Bezug auf die α -Tocopheroläquivalente (Aktivität=1), nach dem Food & Nutrition Board (1989) und Horwitt (1990). Die Aktivität des γ - und δ -Tocotrienols sind unbekannt (Sheppard *et al.*, 1992).

Isomer	Aktivität [-]
<i>RRR</i> - α -Tocopherol	1,00
<i>RRR</i> - β -Tocopherol	0,50
<i>RRR</i> - γ -Tocopherol	0,10
<i>RRR</i> - δ -Tocopherol	0,03
<i>RRR</i> - α -Tocotrienol	0,30
<i>RRR</i> - β -Tocotrienol	0,05
<i>RRR</i> - α -Tocopherylacetat	0,74

3.2.1.2 α -Tocopherol als Radikalfänger

Als freie Radikale werden chemische Spezies bezeichnet, welche ein oder mehrere ungepaarte Elektronen enthalten und zur unabhängigen Existenz befähigt sind. Diese freien Radikale können hoch reaktiv sein und Proteine, Nukleinsäuren sowie andere zelluläre Makromoleküle angreifen, wodurch die reguläre Zellaktivität stark beeinträchtigt werden kann (Bramley *et al.*, 2000). Die Phospholipide der Membranen sind dabei besonders anfällig für die Zerstörung durch freie Radikale (Fryer, 1992; Bramley *et al.*, 2000). Um eine solche Zerstörung zu verhindern, wandeln Enzyme wie Glutathionperoxidase, Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionreduktase freie Radikale zu weniger schädlichen Verbindungen um und halten somit die Anzahl an intrazellulären freien Radikalen, welche aus regulären Stoffwechselaktivitäten oder Entgiftungsreaktionen resultieren, gering. Diese Enzyme benötigen zumeist Cofaktoren in Form von Metallen wie Eisen und Kupfer, deren Konzentrationen

durch komplexierende Stoffe wie Transferrin, Ferritin, Caeruloplasmin und Albumin gering gehalten werden (Halliwell, 1996). Im Fall einer oxidativen Kettenreaktion in Phospholipidmembranen und Lipoproteinen können fettlösliche Antioxidantien wie α -Tocopherol, dessen hydrophobe Seitenkette innerhalb von Membranen in der Nähe von Fettsäuren lokalisiert ist, eine solche Kettenreaktion unterbrechen (Bramley *et al.*, 2000). Dabei gibt α -Tocopherol ein phenolisches Proton ab, wobei es selbst zum α -Tocopheroxyradikal wird. Im Gegensatz zu Fettsäure- oder Peroxyradikalen ist das α -Tocopheroxyradikal selbst ziemlich stabil, da die ungepaarten Elektronen im aromatischen Ring völlig delokalisiert vorliegen (Burton *et al.*, 1985). Unter normalen Umständen reagiert das α -Tocopheroxyradikal nicht mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Membranen, so dass die Ausbreitung einer Kettenreaktion inhibiert wird (Burton, 1994). Membranen beinhalten etwa ein Molekül α -Tocopherol pro 2000 Phospholipide, wobei diese geringe Menge ausreicht, um den Schutz der Membranen vor oxidativer Zerstörung zu gewährleisten (Packer & Kagan, 1993). Dieser bemerkenswert hohe Schutz durch eine solch geringe Menge an α -Tocopherol kann dadurch erklärt werden, dass Peroxyradikale 10.000 mal schneller mit α -Tocopherol reagieren, als mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Buettner, 1993). Wurde α -Tocopherol zu einem α -Tocopheroxyradikal oxidiert, kann dieses entweder mit einem zweiten Radikal reagieren, so dass ein nicht-radikales Produkt entsteht, was jedoch eine irreversible Oxidation zur Folge hat (Foote *et al.*, 1978; Yamauchi & Matsushita, 1979; Neely *et al.*, 1988) oder es wird wieder zu α -Tocopherol konvertiert (Burton, 1994). Studien haben gezeigt, dass diese reversible Reaktion *in vivo* von Reduktionsmitteln wie L-(+)-Ascorbinsäure, Coenzym Q₁₀ und Glutathion übernommen wird (Chan, 1993; Beyer, 1994). Außerdem beeinflusst α -Tocopherol, ähnlich wie Cholesterin, zudem positiv die Permeabilität und Fluidität von Biomembranen (Lucy, 1972; Fryer, 1992), schützt Thylakoidbestandteile vor oxidativen Schäden, spielt eine Rolle in der Elektronentransportkette und stabilisiert auf diese Art und Weise Membranen (Powls & Redfearn, 1967; Giasuddin & Diplock, 1981).

3.2.1.3 Symptome bei Vitamin E-Mangel

Ein Mangel an Vitamin E in Wirbeltieren führt zu verschiedenen Erkrankungen wie Gewebeverletzungen, Arteriosklerose, kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs (Shklar & Schwartz, 1993; Rock *et al.*, 1996). Vitamin E zeigt cholesterinsenkende Eigenschaften (Qureshi *et al.*, 1995) und kann bei höherer Dosierung den Zustand von Alzheimerpatienten verbessern (Sano *et al.*, 1997). Außerdem beugt Vitamin E eine lichtinduzierte Pathologie der Haut und der Augen vor (Chiu & Kimball, 2003) und spielt vermutlich bei Entzündungskrankheiten, neuralen Störungen, altersbedingter Makuladegeneration und bei der Aufrechterhaltung des Immunsystems eine wichtige Rolle (Bramley *et al.*, 2000). In Experimenten in der Aquakultur konnte gezeigt werden, dass Vitamin E aufgrund

einer höheren Stress- und Krankheitsresistenz das Wachstum und das Überleben von Fischen und Crustaceen verbessert, wenn das Futter zuvor mit Mikroalgen wie *E. gracilis*, *Dunaliella salina* und *Tetraselmis suecica* gefüttert wurde (Izquierdo *et al.*, 2001; Vismara *et al.*, 2003). Einige Funktionen, wie die Inhibierung der Thrombozytenaggregation und Monozytenadhäsion, neuroprotektive Effekte und Regulierungen der Zellsignale (Rimbach *et al.*, 2002), sind jedoch nicht direkt mit den antioxidativen Eigenschaften von Vitamin E assoziiert (Ogbonna, 2009). Für Erwachsene wird seitens der Deutschen Gesellschaft für Ernährung ein Grundbedarf von mindestens 4 mg α -Tocopheroläquivalente pro Tag zum Schutz vor Peroxidation für notwendig gehalten (DGE, 2000). Laut Bundesinstitut für Risikobewertung sollte eine Höchstmenge von 15 mg d⁻¹ jedoch nicht überschritten werden (Domke *et al.*, 2004).

3.2.1.4 Vorkommen von α -Tocopherol

Tocopherole und Tocotrienole sind in der Natur weit verbreitet und werden hauptsächlich in Blättern und nicht-photosynthetischen Teilen, wie z. B. Samen von Gefäßpflanzen sowie in Algen gefunden (Green, 1958; Kruk & Strzałka, 1995). Vitamin E kann von tierischen Zellen nicht synthetisiert werden und muss daher mit der Nahrung aufgenommen werden (Fryer, 1992; Tani & Tsumura, 1989). Herkömmliche Quellen von Vitamin E in der menschlichen Ernährung sind hauptsächlich pflanzliche Öle, Getreide, Nüsse, Samen, Hülsenfrüchte, Obst, Gemüse sowie Fleisch- und Fischprodukte, wobei der Gehalt in Pflanzenölen und in Samen am höchsten ist. In Tabelle 3.2 sind spezifische α -Tocopherolkonzentrationen einiger Produkte aufgelistet. Die Menge des Tocopherols in tierischen Produkten hängt dabei sowohl von der Ernährung des Tieres als auch von der Jahreszeit ab (Bauernfeind & Desai, 1977). Ungeachtet der Zusammensetzung der Tocopherolisomere im Tierfutter kann nur das α -Isomer im Blut und im Gewebe von Tieren nachgewiesen werden (McMurray & Rice, 1982), was nahelegt, dass nicht die Gesamttocopherolmenge, sondern vielmehr die Menge des α -Isomers in der Nahrung von Bedeutung ist. Generell macht α -Tocopherol bei Säugern den größten Anteil an fettlöslichen Antioxidantien im Gewebe und im Plasma aus (Burton *et al.*, 1983; Cheeseman *et al.*, 1984).

Der Gehalt und die Isomerie in pflanzlichem Gewebe unterscheidet sich mit dem Erntezeitpunkt, den Wetterbedingungen sowie der Verarbeitung und Lagerung dieser Produkte (Bauernfeind & Desai, 1977). Hauptsächlich werden Tocopherole im Öl und in allen grünen Teilen von Gefäßpflanzen gefunden (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). Tocotrienole hingegen sind die vorherrschenden Vitamin E-Isomere in den Endospermen vom Monokotyledonen, werden jedoch auch in den Endospermen einiger dikotyle Gefäßpflanzen gefunden (Sen *et al.*, 2006). Kommerzielles α -Tocopherol wird hauptsächlich mittels organischer Lösemittel aus Pflanzenölen extrahiert (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010).

Tabelle 3.2: Spezifische α -Tocopherolkonzentrationen einiger Produkte nach verschiedenen Autoren.

Produkt	$S_{\alpha-Toc}$ [mg g ⁻¹]	Referenz
Äpfel ¹	0,04	Lehmann <i>et al.</i> 1986
Avocados ¹	0,12	Lehmann <i>et al.</i> 1986
Broccoli ¹	0,05	Bauernfeind & Desai 1977
Erdnüsse ¹	0,11	Bauernfeind & Desai 1977
Putenfleisch ²	0,001	Lehmann <i>et al.</i> 1986
Fisch ²	0,007-0,039	Hogarty <i>et al.</i> 1989
Karotten ¹	0,04	Lehmann <i>et al.</i> 1986
Kokosnussöl	0,05	Slover 1971
Lattich ¹	0,06	Bauernfeind & Desai 1977
Palmkernöl	0,16	McLaughlin & Weihrauch 1979
Palmöl	0,26	Slover 1971
Paranüsse ¹	1,1	Hogarty <i>et al.</i> 1989
Rindfleisch ²	0,0037-0,0045	Lehmann <i>et al.</i> 1986
Sonnenblumenöl	0,49	Slover 1971
Spinat ³	0,18	Lehmann <i>et al.</i> 1986
Weizenkeimöl	1,33	Slover 1971

¹ bezogen auf Feuchtmasse

² zubereitet, bezogen auf Feuchtmasse

³ gefroren, bezogen auf Feuchtmasse

Eine weitere Quelle für Tocopherole ist die chemische Synthese. Mittlerweile sind viele Methoden zur Synthese bekannt, aber es gibt einige Nachteile von synthetischen und halbsynthetischen Tocopherolen. Einige dieser Nachteile sind z. B. der komplexe Syntheseweg, begrenzte Raum-Zeit-Ausbeuten, exzessive Mengen von Abfallmaterial sowie Komplikationen bei der stereoselektiven Synthese (Eggersdorfer *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu *RRR*- α -Tocopherol weist synthetisch gewonnenes α -Tocopherylacetat nur eine Aktivität von 74 % auf (Bramley *et al.*, 2000). Zudem stellt lediglich 10 % des industriell hergestellten Vitamin E reines *RRR*- α -Tocopherol dar (Eggersdorfer *et al.*, 2012), wobei der weltweite Bedarf an optisch reinem *RRR*- α -Tocopherol jährlich steigt. Wie Ogbonna *et al.* (1998) und Tani & Tsumura (1989) bereits beschrieben haben, sollte die chemische Synthese von racemischem α -Tocopherylacetat sowie die Extraktion eines Isomerengemisches aus Pflanzenölen durch die Gewinnung aus produktiveren Quellen ersetzt werden.

3.2.1.5 α -Tocopherol in *E. gracilis*

Obwohl bereits bekannt war, dass Tocopherole und vor allem das α -Isomer in der Natur weit verbreitet sind, wurde von Green *et al.* (1959) zum ersten Mal deren Vorkommen in Mikroorganismen beschrieben. Bereits in dieser Veröffentlichung wurde gezeigt, dass *E. gracilis* und die goldbraune Alge *Ochromonas malhamensis* α -Tocopherol synthetisieren, Bakterien wie z. B. *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* hingegen nicht. In

einer größer angelegten Studie von Tani & Tsumura (1989) wurden 56 Gattungen von Mikroorganismen auf ihre α -Tocopherolkonzentrationen untersucht, wobei jedoch nur jene Mikroorganismen, welche Chlorophyll aufwiesen, α -Tocopherol synthetisierten. In dieser Studie konnte in *E. gracilis* Z im Vergleich zu anderen Mikroalgen speizes die höchste Tocopherolkonzentration, vor allem des α -Isomers, nachgewiesen werden. Die Kultivierung erfolgte dabei photoheterotroph mit 2 g L^{-1} Glucose und $1,2 \text{ g L}^{-1}$ Pepton als Kohlenstoffquelle, wobei eine α -Tocopherolselektivität von $1,1 \text{ mg g}^{-1}$ erzielt wurde. Durch eine zusätzliche Supplementierung mit L-Tyrosin, Homogentisat, Ethanol und einer Erhöhung der Peptonkonzentration konnten bis zu $5,1 \text{ mg g}^{-1}$ α -Tocopherol erzielt werden. Von Shigeoka *et al.* (1986) wurde beschrieben, dass 97 % des Gesamttocopherols in *E. gracilis* als α -Tocopherol vorliegen. Auch andere einzellige Mikroalgen wie *Dunaliella* sp. und *Chlorella* sp. synthetisieren α -Tocopherol (Kusmic *et al.*, 1998).

Obwohl häufig fälschlicherweise beschrieben wurde, dass Vitamin E ausschließlich von photosynthetisch aktiven Organismen synthetisiert wird (Taketomi *et al.*, 1983; Tani & Tsumura, 1989; Sen *et al.*, 2006; Hunter & Cahoon, 2007; Ogbonna, 2009), findet die Synthese bei *E. gracilis* auch unter heterotrophen Kultivierungsbedingungen statt, wobei unter phototrophen Bedingungen die spezifische Konzentration deutlich höher ist (Threlfall & Goodwin, 1967; Shigeoka *et al.*, 1986; Tani & Tsumura, 1989; Kusmic *et al.*, 1998). Zwar kann eine Abhängigkeit der α -Tocopherolkonzentration und dem applizierten Lichtfluss beobachten werden, jedoch konnte auch nachgewiesen werden, dass kein direkter Zusammenhang mit der Photosynthese besteht. Es wurde eine etiolierte Mutante beschrieben, welche, ebenso wie der Wildtyp, unter phototrophen Kultivierungsbedingungen eine höhere spezifische α -Tocopherolkonzentration als unter heterotrophen Bedingungen aufweist (Shigeoka *et al.*, 1986). Das deutet darauf hin, dass die Synthese zwar lichtabhängig ist, jedoch konnte keine direkte Korrelation zwischen der α -Tocopherolselektivität und der Konzentration an intrazellulärem Chlorophyll gefunden werden. Außerdem konnten auch in einigen Hefen und anderen Pilzen geringe Mengen Vitamin E nachgewiesen werden (Forbes & György, 1957; Diplock *et al.*, 1961).

3.2.2 Das β -1,3-Glucan Paramylon

Paramylon wurde von Gottlieb (1850) aus *Euglena viridis* zum ersten mal isoliert und beschrieben. Der Name Paramylon wird aus dem Lateinischen von „*par*“ für „gleichkommend“ und „*amylum*“ für „Stärke“ zusammengesetzt und deutet darauf hin, dass es sich um eine Substanz handelt, welche der Amylose, einem α -1,4-Glucan, ähnlich ist. Bei der Färbereaktion mit Jod, welche bei Amylose die typische Dunkelfärbung verursacht, konnte jedoch keine Färbung beobachtet werden (Gottlieb, 1850).

Paramylon ist ein β -1,3-Glucan, welches als Speicherpolysaccharid von *E. gracilis* synthetisiert wird und bei Bedarf zu D-(+)-Glucose hydrolysiert werden kann (Vogel & Barber, 1968; Buetow, 1968). β -1,3-Glucane werden auch im Pollenschlauch einiger Gefäßpflanzen, wie z. B. bei *Lilium longiflorum* und *Armillaria mellea* (Bluhm & Sarko, 1977), und als Zellwandbestandteil von Pilzen gefunden (Manners *et al.*, 1973; Bluhm & Sarko, 1977). Es existieren zudem bakterielle β -1,3-Glucane, welche unter der Bezeichnung Curdlan aufgeführt werden und hauptsächlich als extrazelluläre Polysaccharide in Bodenbakterien wie *Agrobacterium* sp. *Rhizobium* sp. und *Cellulomonas* sp. beschrieben wurden (McIntosh *et al.*, 2005). Unter der Bezeichnung Laminarin werden β -1,3-Glucane aus Braunalgen (Friedlaender *et al.*, 1954) und Diatomeen (Lewin & Guillard, 1963) beschrieben, wobei der Tang *Laminaria* sp. namensgebend für diese β -1,3-Glucane ist.

3.2.2.1 Struktur von Paramylon

Das Speicherpolysaccharid Paramylon liegt in Form von Granula vor und wird ausschließlich bei den Euglenoiden gefunden (Barras & Stone, 1968). Die Struktur von Paramylon ist bei den verschiedenen Spezies der Euglenoiden sehr einheitlich, obwohl die Granula der einzelnen Spezies sehr unterschiedliche Größen aufweisen können (Leedale *et al.*, 1965). Die Granula sind von einer Membran umgeben, welche für Paramylon sehr charakteristisch ist, da die Granula zumeist nicht an oder in einer anderen Zellmembran gebunden sind (Kiss *et al.*, 1987). Diese Membran besteht aus einer normalen Phospholipiddoppelschicht (Kiss *et al.*, 1988). Nach Clarke & Stone (1960) weisen die Granula in *E. gracilis* eine Länge von etwa 2,3 bis 2,8 μm und eine Breite von 1 bis 1,6 μm auf. Der Aufbau eines Granulums ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

Die einzelnen Granula sind von ovaler Form und variabler Größe und bestehen aus unterschiedlich großen, vier bis sechs seitlich gelegenen, rechteckigen sowie aus sechs bis acht keilförmigen Segmenten, welche die Enden der Granula ausfüllen. Die Segmente der Granula sind aus Ebenen aufgebaut, die von tangential angeordneten Fasern in konzentrischen Mustern durchzogen werden. Diese Fasern bestehen aus Mikrofibrillen, welche eine Breite von ca. 4 nm aufweisen (Kiss *et al.*, 1987). Die Mikrofibrillen sind hoch polymerisiert und bestehen aus einzelnen oder mehreren Ketten von tripelhelikal angeordneten, unverzweigten β -1,3-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen. Deswegen ist die Kristallinität von Paramylon mit 90 % besonders hoch und somit weitaus höher als die Kristallinität von Curdlan, welche nur etwa 30 % beträgt. Dieser hohe Grad an Kristallinität wird nur in der Cellulose der Grünalge *Valonia* gefunden, dessen cellulosehaltiges Material zu den nativen Materialien mit dem höchsten Grad an Kristallinität zählt. Aus diesem Grund ist Paramylon vollständig wasserunlöslich und weist eine Dichte von 1,53 g cm^{-3} auf (Marchessault & Deslandes, 1979). Ein weiteres Resultat der hohen Kristallinität ist die

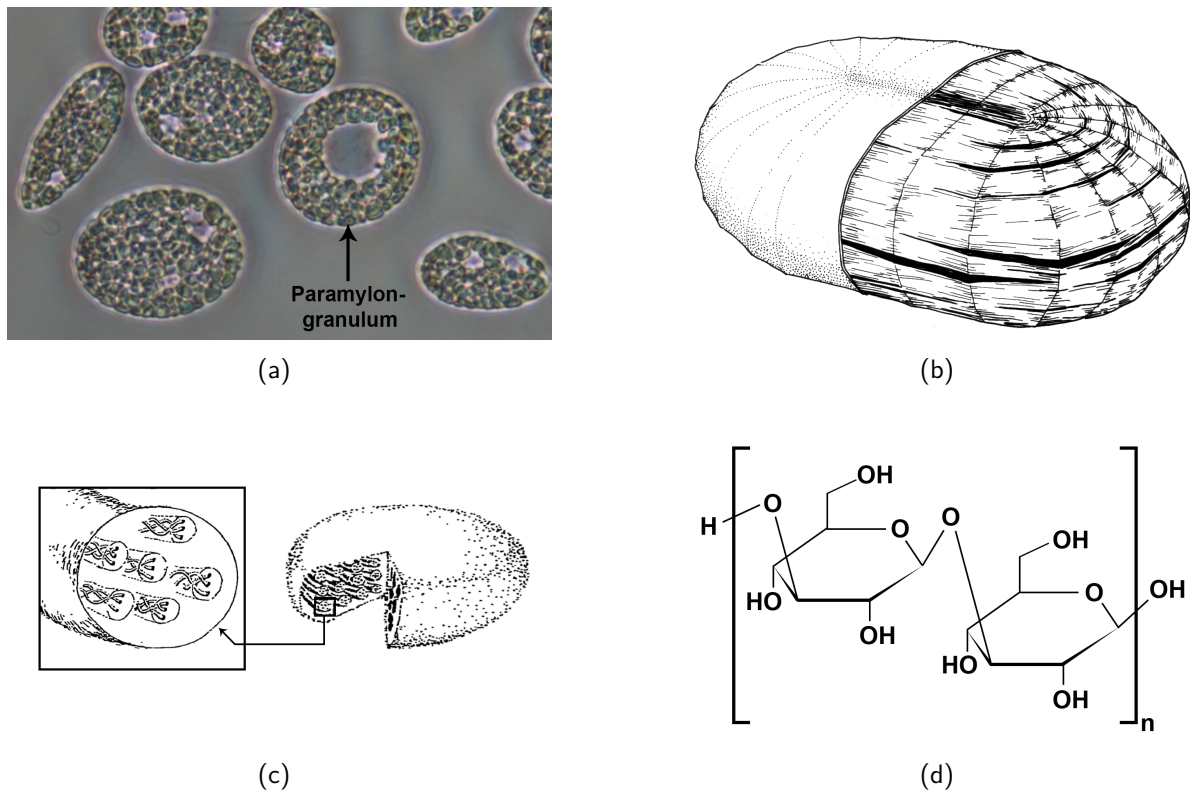


Abbildung 3.3: Lage, Aufbau und Struktur eines Paramylongranulums. (a) Paramylongranula innerhalb einer heterotroph gewonnenen *E. gracilis*-Zelle, (b) schematische Skizze eines Granulums mit den drei- und viereckigen Segmenten und der umgebenden Membran nach Kiss *et al.* (1987), (c) Darstellung der Fasern und der tripelhelikalen Mikrofibrillen nach Marchessault & Deslandes (1979) und (d) Strukturformel der β -1,3-Glucane als Dimer dargestellt.

sehr hohe Resistenz gegenüber physikalischer und chemischer Degradation (Vogel & Barber, 1968). Die enzymatische Hydrolyse dieses Polysaccharids zu Glucose erfolgt über Endo- und Exoglucanasen (Barras & Stone, 1969).

3.2.2.2 Paramylon in *E. gracilis*

Paramylon wird von den Zellen bei Substrat- oder Energieüberschuss gebildet (Cook, 1963; Barras & Stone, 1968; Buetow, 1989; Šantek *et al.*, 2009) und unter Mangelbedingungen für weiteres Wachstum und für das Überleben abgebaut und verwertet (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010). Unter photoheterotrophen Bedingungen in Anwesenheit von Glucose findet jedoch keine Paramylon-Degradation statt (Schwartzbach *et al.*, 1975). Der höchste bisher beschriebene Paramylonanteil wurde unter Lichtabschluss mit Glucose als Kohlenstoffquelle erreicht. Der Anteil an der Trockenmasse betrug dabei 90 % (*w/w*) und wurde bei einer Zufallsmutante erzielt, welche die Fähigkeit zur Photosynthese verloren hat (Barsanti *et al.*, 2001). Es wurde beschrieben, dass unter heterotrophen Bedingungen sechsfach höhere Selektivitäten erreicht werden, als bei photoautotropher Kultivierung (Wolken, 1961).

Auch die Biotrockenmassekonzentration ist bei heterotropher Gewinnung weitaus höher als bei photoautotropher Kultivierung (Ogbonna, 2009). Aus diesem Grund wird für die Gewinnung von Paramylon die heterotrophe Kultivierung mit einer hohen Substratkonzentration bevorzugt (Šantek *et al.*, 2009; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu heterotrophem Wachstum, bei dem ein Teil der Kohlenstoffquelle in Form von Paramylon eingelagert wird, wird bei photoautotrophem Wachstum nur überschüssige Energie als Paramylon gespeichert. Die Synthese des Paramylons ist dabei von der Photonendichte abhängig, so dass bei höheren Lichtflüssen sowohl die Synthesegeschwindigkeit, als auch der Paramylonanteil pro Zelle steigt (Cook, 1963).

Da *E. gracilis* unter bestimmten Bedingungen sehr hohe Mengen an Paramylon synthetisiert, stellt dieser Organismus eine alternative Quelle für β -Glucane dar. Industriell werden β -Glucane zumeist aus *S. cerevisiae* extrahiert, obwohl der Anteil mit 5 bis 7 % (*w/w*) sehr gering ist (Barsanti *et al.*, 2001). Manners *et al.* (1973) haben für *S. cerevisiae* einen Anteil von nur 2 % (*w/w*) beschrieben. In fast allen Pilzen stellen β -Glucane einen Bestandteil der Zellwand dar (Latgé, 2007).

3.2.2.3 Anwendungen von β -Glucanen

β -Glucane finden vor allem im medizinischen Bereich vielseitige Verwendung. Sie werden aufgrund ihrer stimulatorischen Effekte auf das Immunsystem, vor allem auf die Makrophagen, klinisch eingesetzt (Sugawara *et al.*, 1984; Kataoka *et al.*, 2002; Chen & Raymond, 2008). Des Weiteren zeigt Paramylon eine Antitumoraktivität (Quesada *et al.*, 1976) und inhibiert die Entwicklung der atopischen Dermatitis bei Mäusen (Sugiyama *et al.*, 2010). Sulfatierte Paramylonderivate scheinen zudem den cytopathischen Effekt des Humanen Immunodefizienz-Virus zu inhibieren (Koizumi *et al.*, 1993). Es wurde außerdem beschrieben, dass β -Glucane cholesterinsenkende Eigenschaften aufweisen (Kahlon *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997) und positiv auf den Blutzuckerspiegel und die Insulinantwort bei Diabetes mellitus wirken (Wood, 1994; Chen *et al.*, 2008). Für einen Einsatz in der Aquakultur konnte gezeigt werden, dass β -Glucane stimulierend auf das Immunsystem wirtschaftlich bedeutender Fische wirken (Chen & Ainsworth, 1992; Jørgensen & Robertsen, 1995; Efthimiou, 1996). *E. gracilis* wird häufig als Futter für *Artemia salina* und Rotiferen eingesetzt, um deren Nährwert für die Fischzucht zu verbessern (Hayashi *et al.*, 1993).

3.3 Biogas

3.3.1 Die Biologie der Biogasentstehung

Biogas entsteht im Prinzip überall dort, wo totes organisches Material in ein anoxisches Milieu gelangt. Das Präfix „Bio-“ deutet darauf hin, dass es sich dabei um einen natürlichen Prozess handelt. Die abundanteste tote Materie in der Natur stellt abgestorbenes Pflanzenmaterial dar, welches vornehmlich aus dem Polysaccharid Cellulose und dem phenolischen Makromolekül Lignin aufgebaut ist. Manche aquatischen Sedimente weisen zudem einen hohen Eintrag an toten Crustaceen auf, welche zu einem großen Teil aus dem Polysaccharid Chitin bestehen (Deppenmeier, 2002). Lignin ist in hohem Maße resistent gegenüber der Degradation unter anaeroben Bedingungen (Zeikus, 1983), obwohl Methanol aus den Methoxygruppen freigesetzt und bedingt der Methanogenese zugeführt werden kann. Allgemein kann jedoch angenommen werden, dass der anaerobe Abbauprozess weitestgehend mit Kohlenhydraten als prävalentes Substrat erfolgt (Deppenmeier, 2002).

Typische Habitate methanogener Archaeen sind Süßwassersedimente von Flüssen, Seen, Sümpfen, Böden der Tundra, Reisfelder, der Verdauungstrakt von Wiederkäuern und Termiten sowie Faultürme von Kläranlagen (Deppenmeier, 2002). Auch marine Sedimente, geothermale Quellen sowie regelmäßig überflutete Böden stellen Habitate methanogener Mikroorganismen dar (Zinder, 1993). Ein weiteres Habitat für Methanogene, welcher anthropogenen Ursprungs ist, sind Mülldeponien. Das Methan, welches dort auf natürliche Art und Weise entsteht, wird oft aufgefangen und als Energiequelle genutzt (Zinder, 1993). In Bezug auf die großen globalen Stoffflüsse ist die Bildung von Methan einer der wichtigsten biologischen Prozesse auf der Erde (Garcia *et al.*, 2000) und spielt eine große Rolle im globalen Kohlenstoffkreislauf (Zinder, 1993).

In Abwesenheit von Sauerstoff wird organisches Material von fakultativ und obligat anaeroben Mikroorganismen in einem vierstufigen Prozess mineralisiert (Zinder, 1993). Dieser Prozess ist schematisch in Abbildung 3.4 dargestellt. Die erste Stufe stellt die **Hydrolyse** der Biopolymere (Polysaccharide, Proteine, Lipide und Nukleinsäuren) durch hydrolytische Bakterien zu Oligomeren und letztendlich zu Monomeren dar (Garcia *et al.*, 2000; Deppenmeier, 2002). Für die Hydrolyse der Biopolymere werden extrazelluläre Enzyme benötigt (Zhang *et al.*, 2007), da Bakterien im Allgemeinen kein partikuläres organisches Material aufnehmen können (Gujer & Zehnder, 1983).

In der zweiten Stufe, der **Acidogenese**, konvertieren fermentative Bakterien die Hydrolyseprodukte (hauptsächlich Zucker, Aminosäuren, Purine, Pyrimidine und Fettsäuren) zu einfachen Carbonsäuren (z. B. Propionat, Butyrat, Acetat, Formiat, Succinat und Lactat), Alkoholen (z. B. Ethanol, Propanol und Butanol) und anderen Verbindungen (z. B.

Wasserstoff, Kohlenstoffdioxid und Ketone) (Deppenmeier, 2002). Die Zusammensetzung und die Konzentrationen der Produkte wird durch den in diesem Prozess intermediär gebildeten Wasserstoff bestimmt (FNR, 2013). Die ersten beiden Abbaustufen können auch von den gleichen Mikroorganismen durchgeführt werden. Weil diese Bakterien die Anwesenheit von Sauerstoff zwar bevorzugen, aber auch einen anaeroben Metabolismus aufweisen, werden diese auch als fakultative Anaerobier bezeichnet.

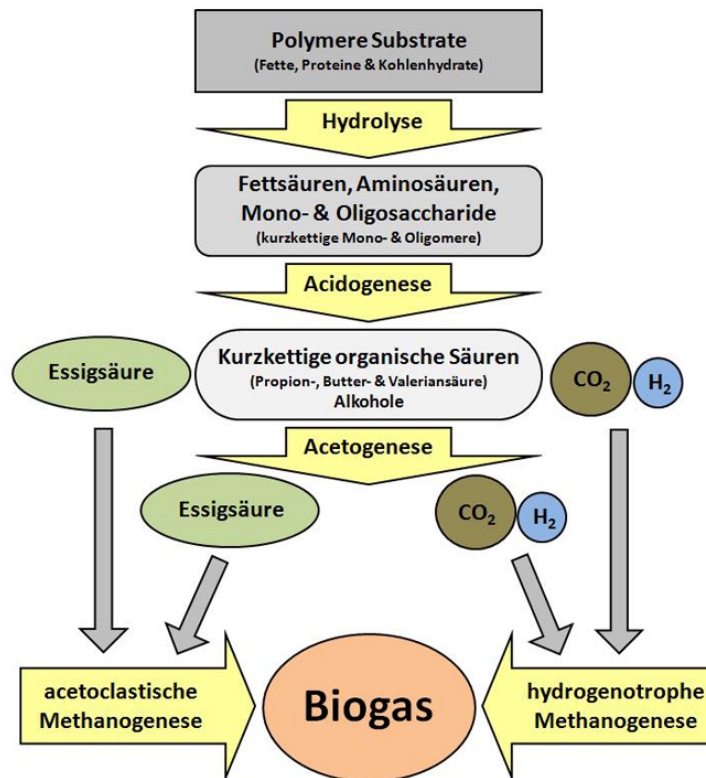


Abbildung 3.4: Fließdiagramm der vierstufigen Biogasbildung.

In der **Acetogenese**, der dritten Stufe der Biogasbildung, werden einige dieser Produkte, wie z. B. flüchtige organische Säuren mit zwei oder mehr Kohlenstoffatomen, Alkohole mit mehr als zwei Kohlenstoffatomen und aromatische Fettsäuren, von acetogenen oder syntrophischen Bakterien zu Acetat und C1-Verbindungen sowie Kohlendioxid und Wasserstoff konvertiert (Diekert & Wohlfarth, 1994; Drake *et al.*, 1997; Schink, 1997; Deppenmeier, 2002). Da auch in dieser Stufe Wasserstoff gebildet wird, hat auch die Acetogenese einen Einfluss auf die Konzentration der Produkte der acidogenen Stufe. Aus thermodynamischen Gründen wird jedoch auch der Abbau der Produkte aus der Acidogenese bei hohen Wasserstoffpartialdrücken verhindert, da Propionat schon bei niedrigen Wasserstoffkonzentrationen schwer abgebaut werden kann (Wandrey & Aivasidis, 1983). Dies kann dazu führen, dass sich die länger-kettigen flüchtigen organischen Säuren anreichern und eine inhibierende Wirkung auf die methanogenen Bakterien ausüben. Die obligat wasserstoffbil-

denden acetogenen Bakterien gehen daher eine Symbiose mit den methanogenen Bakterien ein (Garcia *et al.*, 2000), welche direkt den von den acetogenen Bakterien gebildeten Wasserstoff zur Bildung von Methan unter Verbrauch von Kohlendioxid verwerten. Dieser Prozess wird *Interspecies Hydrogen Transfer* genannt und ermöglicht in einem stabilen Prozess aufgrund einer räumlichen Nähe der Mikroorganismen zueinander einen niedrigen Wasserstoffpartialdruck (Wandrey & Aivasidis, 1983). Beide Gruppen stellen obligat anaerobe Mikroorganismen dar.

In der vierten Stufe, der **Methanogenese**, werden hauptsächlich Wasserstoff, Kohlenstoffdioxid und Essigsäure von den methanogenen Archaeen als Kohlenstoff- und Energiequelle verwendet, wobei als Endprodukt dieser anaeroben Nahrungskette vornehmlich Methan und Kohlenstoffdioxid gebildet werden (Zinder, 1993). Die Methanbildung erfolgt dabei hauptsächlich auf zwei unterschiedlichen Wegen. Bei der hydrogenotrophen Methanogenese wird Methan und Wasser aus Wasserstoff und Kohlendioxid gebildet, wohingegen bei der acetoclastischen Methanbildung aus Essigsäure Methan und Kohlendioxid erzeugt wird. In Versuchen mit Isotopen wurde gezeigt, dass ca. 70 % des gebildeten Methans aus dem Abbau der Essigsäure stammen (Smith & Mah, 1966). Es konnte jedoch ebenfalls gezeigt werden, dass die Methanbildung in landwirtschaftlichen Biogasanlagen hauptsächlich über den hydrogenotrophen Abbauweg abläuft (Bauer *et al.*, 2008). Bei einigen Anlagen, welche mit sehr kurzen Verweilzeiten auf Hochlast betrieben werden, kann jedoch auch der acetoclastische Weg als der Vorherrschende beobachtet werden (Kroiss, 1985; Bauer *et al.*, 2008). Daraus wird deutlich, dass der bevorzugte Methanogeneseweg stark von der Betriebsweise der Anlage abhängig ist. Neben Biogas wird in diesem Prozess außerdem Wärme und neue bakterielle Biomasse gebildet. Mögliche Reaktionen der einzelnen Stufen und deren Gibbs'schen freien Energien im Abbau von Glucose zu Methan sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Der Stoffwechselschritt, welcher letztendlich Methan als Stoffwechselendprodukt generiert, wird nur von bestimmten Archaeen durchgeführt. Die Analyse von 16S-rRNA konnte zeigen, dass das Leben auf der Erde aus drei primären Abstammungslinien besteht, welche als die Domänen Eukarya, Bakteria und Archaea bezeichnet werden (Woese, 1987; Woese *et al.*, 1990; Olsen & Woese, 1993). Es wird angenommen, dass alle drei Organismengruppen aus einen gemeinsamen Vorfahren entstanden sind, bevor sie sich vor etwa drei Milliarden Jahren getrennt haben (Brown & Doolittle, 1997). Die Archaeen weisen keinen eukaryotischen Zellkern auf und ähneln den Eubakterien in Morphologie und in der genomischen Organisation. Auf molekularer Ebene zeigen sie jedoch einige eukaryotische Merkmale (Brown & Doolittle, 1997). Die Ähnlichkeit in der Replikation, Transkription und Translation ist Beweis für ihre gemeinsame Abstammung mit Eukaryoten (Klenk & Doolittle, 1994; Langer *et al.*, 1995; Cann & Ishino, 1999; Andrade *et al.*, 1999).

Tabelle 3.3: Standard Gibbs'sche freie Energien definierter Zustände im Abbau von Glucose zu Methan (berechnet nach Thauer *et al.* (1977)) mit Kohlendioxid im gasförmigen Zustand nach Conrad (1999).

#	Reaktion	ΔG° [kJ mol ⁻¹]
Fermentation		
1.1	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHOHCOOH$	-198,1
1.2	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2OH + 2 CO_2$	-235,0
1.3	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2/3 CH_3CH_2CH_2COOH + 2/3 CH_3COOH + 2 CO_2 + 8/3 H_2$	-248,0
1.4	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4/3 CH_3CH_2COOH + 2/3 CH_3COOH + 2/3 CO_2 + 2/3 H_2O$	-311,4
1.5	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3 CH_3COOH$	-311,2
Syntrophie		
2.1	$CH_3CHOHCOOH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 2 H_2$	-48,7
2.2	$CH_3CH_2OH \rightarrow CH_3COOH + 2 H_2$	+9,6
2.3	$CH_3CH_2CH_2COOH + 2 H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2 H_2$	+48,3
2.4	$CH_3CH_2COOH + 2 H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 3 H_2$	+31,8
1-2	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COOH + 2 CO_2 + 4 H_2$	-216,1
Hydrogenotrophe Methanogenese		
3	$4 H_2 + CO_2 \rightarrow 2 H_2O + CH_4$	-32,7
1-3	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3COOH + CO_2 + CH_4$	-346,8
Acetoclastische Methanogenese		
4	$CH_3COOH \rightarrow CO_2 + CH_4$	-35,6
1-4	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3 CO_2 + 3 CH_4$	-418,1

Im Jahr 2000 waren 83 Spezies von Methanogenen beschrieben. Nach Garcia *et al.* (2000) werden diese in drei Kategorien eingeteilt. Von den hydrogenotrophen Methanogenen existieren 61 Arten. Von diesen Arten sind 38 zudem auch formiatotroph. Sie oxidieren also Formiat zu Methan. Von den acetoclastischen bzw. acetotrophen Methanogenen sind nur neun Arten bekannt, von denen zwei Arten obligat acetotroph sind. Dieser Weg der Methanbildung wird z. B. von *Methanosarcina barkeri*, *Metanococcus mazei* und *Methanotrix soehngenii* vollzogen, wobei sämtliche methanogenen Bakterien in der Lage sind den hydrogenotrophen Stoffwechselweg zur Bildung von Methan aus Wasserstoff und Kohlendioxid zu nutzen (Weiland, 2010). Zu der nächsten Kategorie werden die 20 methylotrophen Archaeen gezählt. Diese nutzen Methylverbindungen wie Methanol, Methylamin oder Dimethylsulfoxid. Von diesen Spezies sind 13 obligat methylotroph. Einige Methanogene weisen eine spezielle Ernährungseigenschaften auf und können keiner der oben genannten Kategorie zugeordnet werden. Zum Beispiel existieren zwei Spezies, welche hydrogenomethylotroph sind. Diese nutzen Wasserstoff, um Methanol zu Methan zu reduzieren. Eine Reihe von alcoholotrophen Methanogenen bilden Methan in der Gegenwart von Kohlenstoffdioxid und bestimmten Alkoholen als Wasserstoffdonor. In diesem Fall wird der Alkohol zu flüchtigen organischen Säuren oder einem Keton während der CO₂-Reduktion oxidiert. Zum Beispiel wird Ethanol zu Acetat, *n*-Propanol zu Propionat, Isopropanol zu Aceton und Isobutanol zu Butanon oxidiert. Des Weiteren kann auch

Kohlenstoffmonoxid zu Methan konvertiert werden. Jedoch ist dieses methanogene Substrat für den Prozess kaum von Bedeutung (Garcia *et al.*, 2000).

3.3.2 Milieuanforderungen & Prozessparameter

3.3.2.1 Einfluss der Temperatur

Die Temperatur ist ein wesentlicher Faktor für den Ablauf chemischer und biochemischer Reaktionen. Generell gilt, je höher die Temperatur, desto höher ist die Stoffwechselaktivität. Da die Biogasbildung auch auf Permafrostboden stattfindet, kann dieser Prozess auch bei sehr niedrigen Temperaturen von 0,6 bis 1,2 °C stattfinden. Unter Laborbedingungen konnte sogar bei -3 °C noch eine Methanbildung nachgewiesen werden (Deublein & Steinhauser, 2008). Für die Bakterien und Archaeen, welche für die Umwandlung organischer Materie zu Biogas zuständig sind, wurden verschiedene Temperaturoptima beschrieben. Diese lassen sich in drei Temperaturbereiche einteilen: der psychrophile, mesophile und thermophile Temperaturbereich (Khanal, 2008). Der Zusammenhang zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und den Optimumstemperaturen ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

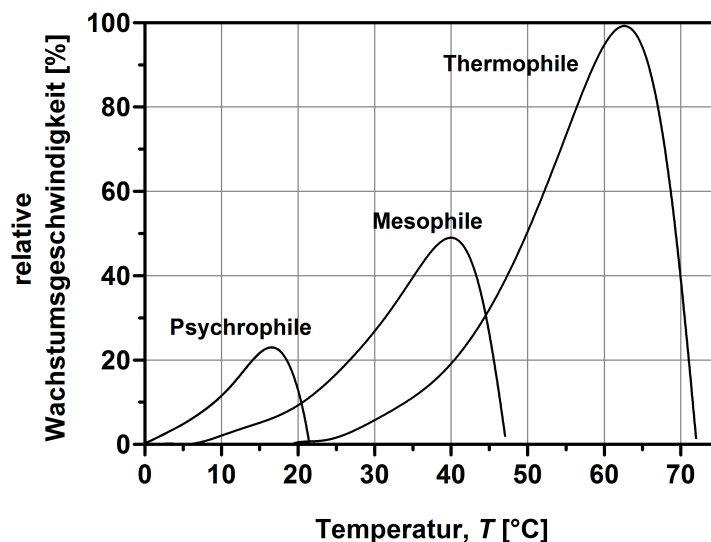


Abbildung 3.5: Relative Wachstumsgeschwindigkeiten von psychrophilen, mesophilen und thermophilen Methanogenen nach Wiegel (1990) und Lettinga *et al.* (2001). Die relative Wachstumsgeschwindigkeit der thermophilen Methanogenen wurde als 100 % definiert.

Während die psychrophile Betriebsweise bei der kommerziellen Biogasgewinnung nur eine untergeordnete Rolle spielt, werden Biogasreaktoren sowohl mesophil bei ca. 40 °C als auch thermophil bei etwa 60 °C betrieben (Pfeffer, 1974). Für den Prozess der Biogasgewinnung haben beide Betriebsweisen einige Vor- und Nachteile. Bei thermophiler Betriebsweise können höhere Substratumsätze und Wachstumsgeschwindigkeiten sowie eine schnellere

Feststoffdegradation beobachtet werden (Varel *et al.*, 1980; Hashimoto, 1982). Der Einfluss der Temperatur auf die Prozessdauer bei mesophiler und thermophiler Betriebsweise ist in Abbildung 3.6 gezeigt. Ein weiter Vorteil des Betriebs bei höheren Temperaturen stellt die Abtötung eventuell pathogener Keime, welche im Substrat vorhanden sein könnten, dar (Varel *et al.*, 1980). Bei problematischen Substraten könnte daher auf die notwendige Hygienisierung des Substrates verzichtet werden (Deublein & Steinhauser, 2008). Zudem stellt sich das anoxische Milieu bei höheren Temperaturen schneller ein, da sich unter diesen Bedingungen weniger Sauerstoff binden lässt.

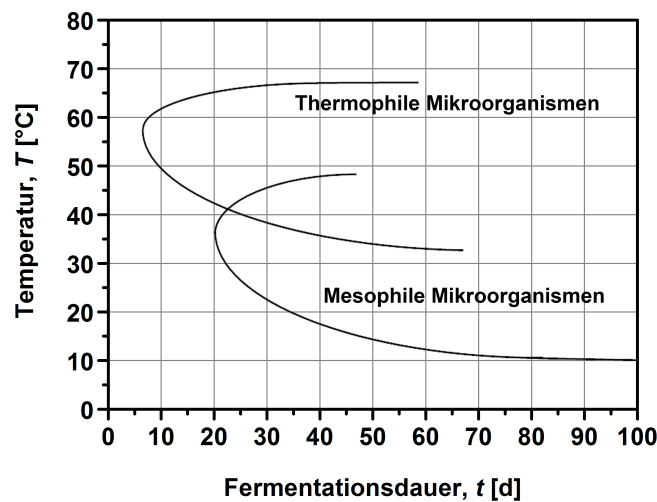


Abbildung 3.6: Einfluss der Temperatur auf die Prozessdauer bei mesophilen und thermophilen Mikroorganismen nach Deublein & Steinhauser (2008).

Der größte Vorteil des mesophilen Betriebs ist dahingegen die höhere Prozessstabilität, da thermophile Methanogene viel sensitiver auf Temperaturschwankungen reagieren (Buhr & Andrews, 1977). Sogar kleine Abweichung bewirken dabei eine beachtliche Abnahme der Aktivität (Deublein & Steinhauser, 2008). Das liegt darin begründet, dass unter thermophilen Bedingungen ein engeres Spektrum von Mikroorganismen selektiert wird, was zu besser definierten, aber weniger stabilen Bedingungen führt (Wandrey & Aivasidis, 1983). Ein weiterer wesentlicher Faktor stellt der enorme Energiebedarf dar, welcher für die Heizung des Reaktors bei der thermophilen Betriebsweise benötigt wird. Aus diesem Grund werden für mesophil betriebene Reaktoren bessere Energiebilanzen angegeben (Deublein & Steinhauser, 2008). Außerdem ist bei mesophiler Betriebsweise die Ammoniakkonzentration geringer, was die Gefahr einer Inhibition durch Ammoniak verringert (Angelidaki *et al.*, 1993; Angelidaki & Ahring, 1994). Für die thermophile Betriebsweise wurden auch höhere Konzentrationen an flüchtigen organischen Säuren, welche den Prozess inhibieren können, beschrieben (Garber *et al.*, 1975; Zeeman *et al.*, 1985). Generell sollten

Temperaturschwankungen während eines Prozesses, auch bei mesophiler Betriebsweise ± 2 °C nicht überschreiten (Deublein & Steinhauser, 2008).

3.3.2.2 pH-Wert

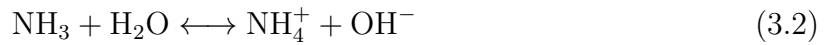
Für die Mikroorganismen der Hydrolyse und Acidogenese sowie der Acetogenese und Methanogenese werden unterschiedliche pH-Optima angegeben. Während die hydrolytischen und fermentativen Mikroorganismen einen sauren pH-Bereich von 5,2 bis 6,3 bevorzugen (Weiland, 2001), benötigen die syntrophischen und methanogenen Mikroorganismen ein eher neutrales bis leicht basisches Milieu von 6,5 bis 8 (Lebuhn *et al.*, 2008), wobei häufig ein Optimum von 7 bis 8 angegeben wird (Weiland, 2010). Weil die hydrolytischen und fermentativen Mikroorganismen jedoch einen größeren pH-Toleranzbereich aufweisen, kann der Substratumsatz, wenn auch etwas verlangsamt, auch bei höheren pH-Werten erfolgen. Bei den syntrophischen und methanogenen Mikroorganismen erfolgt der Umsatz jedoch ausschließlich im pH-neutralen Bereich, was bedeutet, dass bei einem einstufigen Prozess dieser pH-Bereich eingehalten werden muss (FNR, 2013). In einem stabilen Prozess stellt sich dieser pH-Wert aufgrund alkalischer und saurer Metabolite automatisch im neutralen pH-Bereich ein (Kaltschmitt *et al.*, 2009). Dieses empfindliche Gleichgewicht wird durch den Carbonat- und Ammoniakpuffer aufrecht gehalten. Bei zu hohem Eintrag von schnell abbaubarem Substrat, Temperaturschwankungen, sehr hohen Faulraumbelastungen oder toxischen Substanzen können beide Puffersysteme jedoch erschöpft werden, was z. B. mit einem Anstieg der Konzentrationen der flüchtigen organischen Säuren einhergeht und somit eine Verringerung des pH-Wertes bewirkt (Deublein & Steinhauser, 2008; FNR, 2013). Dadurch wird die Hemmwirkung von Essigsäure und Propionsäure erhöht, da sich die inhibierende Wirkung flüchtiger organischer Säuren auf den undissoziierten Anteil zurückführen lässt. Dies führt dazu, dass bei sinkendem pH-Wert der Anteil an undissoziierten Säuren steigt, wodurch die inhibierende Wirkung zusätzlich verstärkt wird (Scholwin *et al.*, 2009).

Das chemische Gleichgewicht von Kohlendioxid in einer wässrigen Lösung ist stark pH-Wert abhängig, wobei Protonen freigesetzt werden. Der Zusammenhang ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Dieses chemische Gleichgewicht kann wie folgt wiedergegeben werden:



Es kann aber auch der gegenteilige Effekt auftreten. Wenn Substrate mit sehr hohem Stickstoffanteil zugeführt werden, führt dies zu einer Erhöhung der Ammoniakkonzentration und somit zu einem Anstieg des pH-Wertes, da Ammoniak mit Wasser zu Ammonium

reagiert, wobei ein Hydroxidion freigesetzt wird (FNR, 2013). Dieser Zusammenhang ist in folgender Gleichung veranschaulicht:



Aufgrund der beschriebenen Pufferwirkung des Carbonat- und des Ammoniakpuffers, deren Stärke zudem von der Betriebsweise und der Substratzusammensetzung abhängen, eignet sich der pH-Wert wegen seiner Trägheit nur bedingt als Prozesskontrolle für Biogasprozesse. Aufgrund seiner großen Bedeutung für den Prozess sollte dieser jedoch stets beobachtet werden (Angelidaki & Ahring, 1994; FNR, 2013).

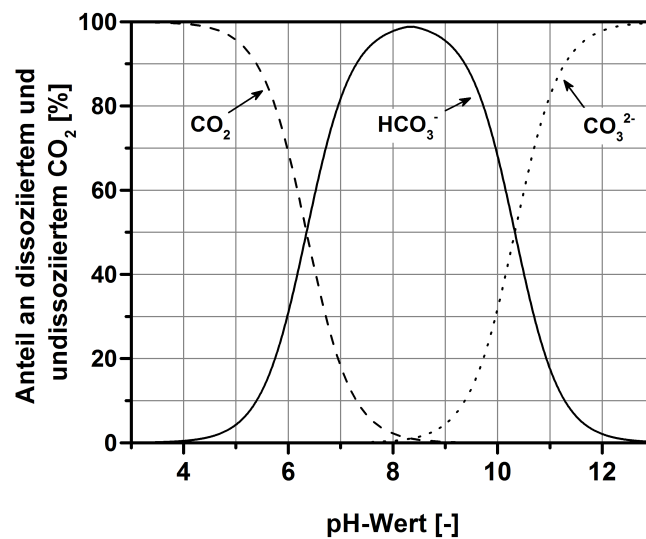


Abbildung 3.7: Protonierungsgleichgewicht von Kohlendioxid nach Jördening & Winter (2006).

3.3.2.3 Sauerstoffpartialdruck

Für die Bildung von Methan sind anoxische Bedingungen obligat. Die Domäne der Archaeen stammt aus einer Zeit, zu der die Atmosphäre noch keinen Sauerstoff aufwies (Barley *et al.*, 2005). Infolgedessen sind diese Mikroorganismen auch heute noch auf die Abwesenheit von Sauerstoff angewiesen. Auch die essigsäurebildenden Bakterien stellen strikte Anaerobier dar (Whitman *et al.*, 2006). Hohe Sauerstoffkonzentrationen können nicht nur inhibitorisch, sondern auch toxisch auf die Archaeen und acetogenen Bakterien wirken (Shen & Guiot, 1996; Zitomer & Shrout, 1998). Die Inhibition der methanogenen Archaeen, welche anstelle von Sauerstoff Nitrat, Sulfat oder Carbonat als Wasserstoffdonor nutzen, beginnt bereits ab einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 0,1 mg L⁻¹ (Deublein & Steinhauser, 2008). Die Toxizität oder der Grad der Inhibition ist jedoch artspezifisch, so dass geringe Mengen Sauerstoff durchaus toleriert werden können (Whitman *et al.*, 2006; Zitomer, 1998). Der

geringe Sauerstoffeintrag, welcher häufig zur Entschweflung in die Gasphase des Reaktors eingebracht wird, zeigt gewöhnlicherweise keinen inhibitorischen Effekt, da innerhalb eines Reaktors auch viele fakultative Anaerobier existieren, welche den Sauerstoff rasch konsumieren. Auf diese Art und Weise wird der Sauerstoffpartialdruck im Reaktor auf natürliche Art und Weise gering gehalten (Deublein & Steinhauser, 2008).

3.3.2.4 Redoxpotential

Stoffwechselprozesse sind von Redoxreaktionen abhängig. Damit der Prozess der Biogasbildung stattfinden kann, werden niedrige Redoxpotentiale benötigt. Die obligat anaeroben Archaeen benötigen für ihr Wachstum ein weit geringeres Redoxpotential als die meisten anderen Anaerobier (Weiland, 2010). Reinkulturen von methanogenen Archaeen benötigen z. B. ein sehr geringes Redoxpotential zwischen -300 und -330 mV als Optimum, wobei das Redoxpotential während des Biogasprozesses im Fermenter auf 0 mV ansteigen kann (Deublein & Steinhauser, 2008; Scholwin *et al.*, 2009). Die fakultativ anaeroben hydrolytischen und acidogenen Bakterien hingegen weisen einen sehr weiten Toleranzbereich zwischen -300 bis $+400$ mV auf. Da die methanbildenden Archaeen ihr Optimum im Gegensatz zu den hydrolytischen und acidogenen Bakterien ausschließlich im negativen Bereich bezüglich des Redoxpotentials aufweisen, muss während des gesamten Prozesses ein negatives Redoxpotential vorherrschen. Folglich ist es sinnvoll, die Zugabe von Oxidationsmitteln wie Sauerstoff, Sulfaten, Nitriten und Nitraten, welche zu einer Erhöhung des Redoxpotentials führen, möglichst gering zu halten (Scholwin *et al.*, 2009). Eine Erhöhung des Redoxpotentials um wenige Millivolt kann bereits auf eine Prozessstörung hinweisen und kann daher, im Gegensatz zum pH-Wert, zur Prozesskontrolle eingesetzt werden (Rieger & Weiland, 2006). Aufgrund der komplexen Dynamik des Prozesses kann die Interpretation der erhobenen Daten jedoch schwierig sein (Brauer & Weiland, 2009).

3.3.2.5 Elementarzusammensetzung & Spurenelemente

Damit der Prozess der Biogasbildung stabil ablaufen kann, benötigen die Mikroorganismen eine ausreichende Versorgung an Nährstoffen. Dabei müssen die Elemente C, N, P und S in einem ausgewogenen Verhältnis zueinander stehen. Ist z. B. zu wenig Stickstoff im Gärmedium vorhanden, können die Mikroorganismen nicht genügend Biomasse und Enzyme synthetisieren, was unter anderem zu einer geringen Substratnutzung führt. Bei zu hoher Konzentration an Stickstoff wird zu viel Ammoniak gebildet, was wiederum selbst in geringen Konzentrationen den Prozess inhibieren kann (Kroiss, 1985; Angelidaki *et al.*, 1993; Dornack, 2009). Schwefel ist Bestandteil der Aminosäuren Cystein und Methionin und wird infolgedessen ebenfalls für den Aufbau von Biomasse und Enzymen benötigt. Bei zu hohem Schwefelanteil im Substrat wird vermehrt Schwefelwasserstoff gebildet, was ebenfalls

den Prozess inhibieren kann (Deublein & Steinhauser, 2008). Phosphorverbindungen sind Bestandteile der DNA und werden für die zellulären Energieträger ATP und NADP⁺ benötigt. Nach Braun (1982) und Zubr (1986) beträgt das optimale C/N-Verhältnis 15:1 bis 30:1. Andere Quellen geben C/N-Verhältnisse von 16:1 bis 25:1 an (Deublein & Steinhauser, 2008). Als Optimales C/N/P/S-Verhältnis wird oft 600:15:5:1 angegeben (Weiland, 2010).

Für das Überleben und für bestimmte Stoffwechselprozesse benötigen die Mikroorganismen neben Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor und Schwefel eine geringe, aber dennoch notwendige Konzentration an Spurenelementen. Ein Mangel an Spurenelementen hat eine verringerte Gasausbeute zur Folge (Schattauer *et al.*, 2011), wobei zu hohe Konzentrationen an Schwermetallen wiederum den Prozess inhibieren können (Oleszkiewicz & Sharma, 1990; Seyfried *et al.*, 1990). Es wurde zudem ein positiver Effekt der Spurenelemente auf den Abbau von Acetat und Propionat beschrieben (Karlsson *et al.*, 2012). Gewöhnlicherweise erfolgt die Versorgung der Spurenelemente ausschließlich über die Substratzufuhr, was bedeutet, dass das Substrat einen direkten Einfluss auf die Versorgung mit Spurenelementen ausübt (Schattauer *et al.*, 2011). Vor allem bei der Fermentation von Monosubstraten wird häufig eine unzureichende Nährstoffzufuhr beschrieben, was zu Prozessimbilanzen führt (Scholwin *et al.*, 2009; FNR, 2013). Je nach Konzentration werden die Spurenelemente in zwei Gruppen eingeteilt: Mikronährstoffe, deren Konzentration gewöhnlicherweise $< 50 \text{ mg L}^{-1}$ beträgt und Makronährstoffe mit einer Konzentration von $> 50 \text{ mg L}^{-1}$. Vor allem die methanogenen Archaeen, besonders diejenigen, die bei dem hydrogenotrophen Stoffwechselweg involviert sind, benötigen die Mikronährstoffe Kobalt, Nickel, Selen und Molybdän (Lebuhn *et al.*, 2008; Gronauer *et al.*, 2009). Weitere benötigte Mikronährstoffe sind Zink, Kupfer, Chrom und Bor sowie die Makronährstoffe Magnesium, Eisen, Schwefel und Calcium (Schattauer *et al.*, 2011). Sämtliche Schwermetalle werden für enzymatische Reaktionen benötigt (Bischoff, 2009; Schattauer *et al.*, 2011).

Die benötigten Konzentrationen an Spurenelementen sind je nach Prozessführung, Substrat und Zusammensetzung des bakteriellen Konsortiums sehr unterschiedlich, was dazu führt, dass in der Literatur keine einheitlichen Angaben zu finden sind. In Tabelle 3.4 sind die benötigten Spurenelementkonzentration nach verschiedenen Autoren aufgelistet.

3.3.2.6 Flüchtige organische Säuren

Die flüchtigen organischen Säuren werden als Intermediate im anaeroben Gärungsprozess ständig produziert und konsumiert. In einem stabilen Prozess steht die Bildung und der Abbau dieser Carbonsäuren im Gleichgewicht, was dazu führt, dass die Konzentrationen gewöhnlicherweise gering sind (Scholwin *et al.*, 2009). Dieses Gleichgewicht kann jedoch gestört werden, so dass diese Säuren langsamer verbraucht als gebildet werden. Eine Akkumulation dieser Säuren hat eine Verschiebung des pH-Wertes zur Folge, so dass der Prozess

Tabelle 3.4: Benötigte Konzentrationen an Spurenelementen für anaerobe Prozesse in mg L⁻¹ nach verschiedenen Autoren.

Element	Sahm (1981)	Kloss (1986)	Seyfried <i>et al.</i> (1990)	Takashima <i>et al.</i> (1990)	Mudrack & Kunst (2003)
Co	0,06	0,5-20	0,003-0,06	>0,00059-0,12	0,003-0,06
Cr	0,005-52	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Fe	k. A.	10-200	1-10	>0,28-50,4	1-10
Mn	0,005-55	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Mo	0,05	0,1-0,35	0,005-0,05	>0,00096-0,048	0,005-0,05
Ni	0,006	0,5-30	0,005-0,5	0,0059-5	0,005-0,5
Se	0,008	0,1-0,35	0,008	0,079-0,79	k. A.
W	k. A.	0,1-0,35	0,1-0,4	0,018-18,3	k. A.

inhibiert werden kann. Da der pH-Wert bei ausreichender Pufferwirkung jedoch durch den Carbonat- und Ammoniakpuffer abgepuffert werden kann, lassen sich beginnende Imbalancen nur bedingt über den pH-Wert ermitteln (Angelidaki & Ahring, 1994; FNR, 2013). Die häufigsten Imbalancen werden durch einen zu hohen Eintrag an organischer Fracht und organischer oder anorganischer Toxine sowie Veränderungen der Prozessparameter wie Temperatur oder Substratzusammensetzung verursacht (Switzenbaum *et al.*, 1990).

Dass die Konzentration dieser Säuren als guter Indikator für die Prozessstabilität verwendet werden kann, wurde schon vor längerer Zeit beschrieben (McCarty & McKinney, 1961a; Chynoweth & Mah, 1971; Hill & Bolte, 1989). Die Konzentrationen der einzelnen flüchtigen organischen Säuren kann auch als Summenparameter angegeben werden. Dieser als Essigsäureäquivalente bezeichneter Parameter basiert auf der Summe der Säurekonzentration, welche gewöhnlich in mg L⁻¹ angegeben und auf Basis der molaren Masse der Essigsäure berechnet wird. Es wird angenommen, dass die Akkumulationen der flüchtigen organischen Säuren nicht die Ursache einer Inhibition sind, sondern das Ergebnis einer Prozessimbalance darstellen (Ahring *et al.*, 1995). Im Wesentlichen werden Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure und Valeriansäure sowie die Isoformen der Butter- und Valeriansäure gebildet (Ahring *et al.*, 1995; Scholwin *et al.*, 2009). Da diese Säuren bei höheren pH-Werten hauptsächlich in der dissoziierten Form vorliegen, sind im Reaktor hauptsächlich Acetat, Propionat, Butyrat, Isobutytrat, Valerat und Isovalerat präsent. Acetat wird dabei zu weitaus höheren Konzentrationen gebildet als andere Carbonsäuren, wobei Propionat und Butyrat einen höheren inhibitorischen Effekt bewirken (Wang *et al.*, 1999; Mösche & Jördening, 1999). Dieser ist stark von der Konzentration und dem Dissoziationsgrad der jeweiligen Spezies abhängig (Ahring *et al.*, 1995). Die Inhibition geht dabei hauptsächlich von der undissoziierten Form der einzelnen Fettsäurespezies hervor,

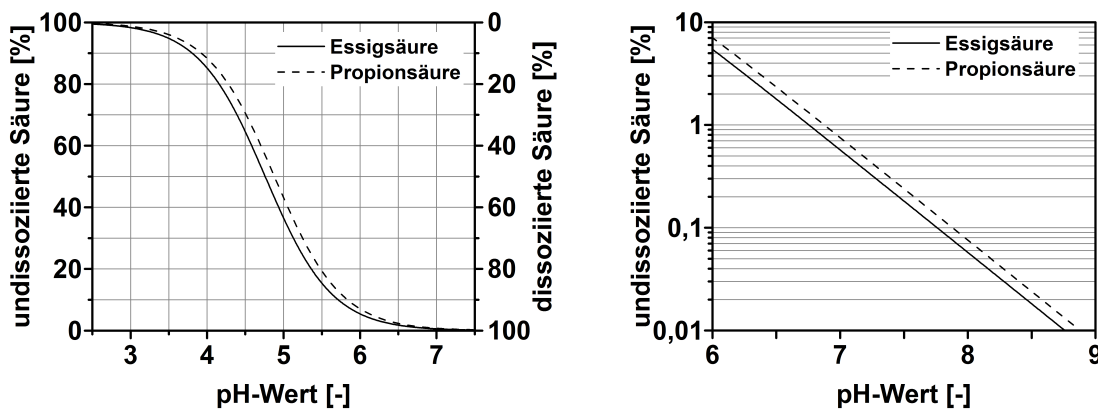
was dazu führt, dass die inhibitorische Wirkung mit sinkendem pH-Wert steigt (Weiland, 2010). Der Anteil an undissoziierter Säure kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{FOS}_{\text{undiss.}} = \frac{10^{pK_S - \text{pH}}}{1 + 10^{pK_S - \text{pH}}} \quad (3.3)$$

Abbildung 3.8 (a) zeigt den Anteil der dissoziierten und undissoziierten Säurespezies in Abhängigkeit vom pH- und pK_S -Wert. Da der für die Methanbildung wichtige pH-Bereich zwischen 6,5 und 8 liegt, ist die Verteilung des Dissoziationsgrades für diesen pH-Bereich in Abbildung 3.8 (b) semilogarithmisch dargestellt. Daraus wird deutlich, dass bei einem pH-Wert von 8 lediglich 0,06 % der Essigsäure undissoziiert vorliegt, wohingegen bei einem pH-Wert von 6,5 bereits 1,8 % in Form der inhibitorisch wirkenden Spezies zugegen sind. Die Inhibition durch Essigsäure ist jedoch generell relativ gering. Es wurde beschrieben, dass selbst bei einem vergleichsweise niedrigen pH-Wert von 7 und einer Gesamtacetatkonzentration von 1000 mg L^{-1} , was einer Konzentration an undissoziierter Säure von $5,7 \text{ mg L}^{-1}$ entspricht, keine Inhibition zu beobachten sei. In der gleichen Quelle wurde angegeben, dass durch Propionat bereits ab einer Konzentration von 700 mg L^{-1} , bzw. $5,2 \text{ mg L}^{-1}$ undissoziierter Propionsäure, starke inhibitorische Effekte auftreten (Deublein & Steinhauser, 2008).

Generell werden Prozessimbalancen häufig im Zusammenhang mit Propionat beschrieben (Weiland, 2010). Die Entstehung einer solchen Imbalance steht dabei im direkten Zusammenhang mit dem Wasserstoffpartialdruck. Da nur ein kleines Fenster bezüglich des Wasserstoffpartialdrucks vorhanden ist, bei dem Propionat abgebaut werden kann, und durch den Abbau von Propionat weniger Energie gewonnen werden kann als beim Abbau von Acetat, kann sich Propionat entsprechend anreichern. Dabei wird bei niedriger Wasserstoffkonzentration vermehrt Acetat gebildet, während ein hoher Wasserstoffpartialdruck die Bildung von Propionat und Butyrat begünstigt (Scholwin *et al.*, 2009). Eine Möglichkeit der Prozessüberwachung bietet das Verhältnis von Propionat zu Acetat (Hill, 1982). Von Weiland (2008) wurde vorgeschlagen, dass dieses Verhältnis > 1 als Indikator für eine Prozessimbalance verwendet werden kann, wenn die Propionatkonzentration $> 1000 \text{ mg L}^{-1}$ beträgt. Andere Autoren gaben weit geringere Verhältnisse unabhängig von der Propionatkonzentration an (Marchaim & Krause, 1993).

Auch die längerkettigen flüchtigen organischen Säuren (C4 bis C6) und vor allem deren Isoformen haben sich als Inhibitor herausgestellt (Fischer *et al.*, 1983; Chen & Day, 1986; Hill & Bolte, 1989; Ahring *et al.*, 1995). Ein plötzlicher Anstieg von Butyrat und Isobutytrat kann daher als guter Indikator für eine Prozessimbalance und als Kontrolle für anaerobe Prozesse angesehen werden. Bereits ein oder zwei Tage nach Beginn der Störung kann ein signifikanter Anstieg der Konzentrationen beobachtet werden (Ahring *et al.*, 1995).



(a) Lineare Auftragung in einem pH-Intervall von 2,5 bis 7,5

(b) Semilogarithmische Auftragung in einem pH-Intervall von 6 bis 9

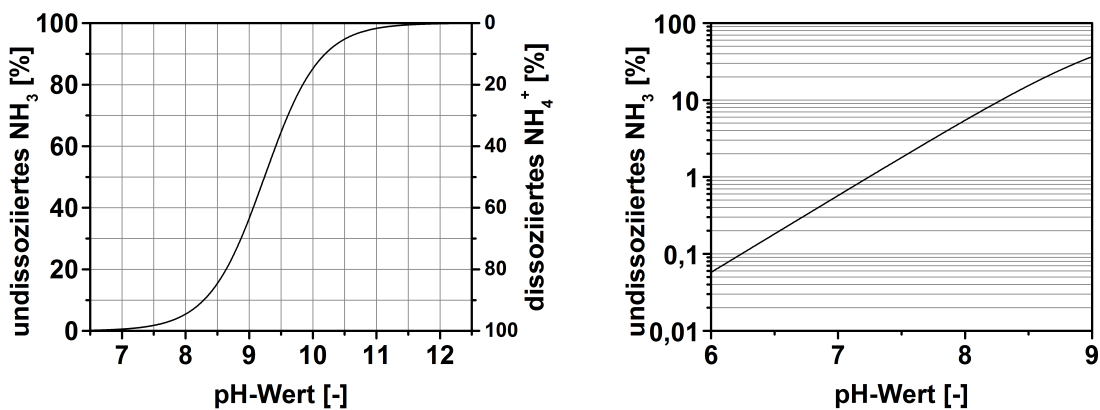
Abbildung 3.8: Zusammenhang zwischen pH-Wert und Dissoziationsgrad der Essigsäure ($pK_S=4,76$) und Propionsäure ($pK_S=4,88$).

Hill & Holmberg (1988) konnten zeigen, dass Isobutyrat- und Isovaleratkonzentrationen $< 0,06$ mM auf einen stabilen Prozess hindeuten, während Konzentrationen zwischen 0,06 und 0,17 mM eine Prozessimbalance nahelegen. Hill *et al.* (1987) haben eine Acetatkonzentrationen von > 13 mM beschrieben, ab welchen eine Prozessimbalance auftritt. Da aber viele unterschiedliche Konzentrationen an flüchtigen organischen Säuren bei stabilen Prozessen beschrieben wurden, kann keine maximale Konzentration definiert werden, ab welcher eine Inhibition in Erscheinung tritt. Verschiedene anaerobe Systeme weisen ihre eigenen „normalen“ Konzentration an flüchtigen organischen Säuren auf, welche durch die Substratzusammenstellung oder Betriebsbedingungen bestimmt werden (Angelidaki *et al.*, 1993).

3.3.2.7 Ammoniak

Obwohl sich das Ammoniak-Ammonium-Puffersystem positiv auf den Prozess auswirken kann, indem es einen ansatzweise konstanten pH-Wert gewährleistet, stellt Ammoniak selbst bei geringen Konzentrationen einen Inhibitor dar (Kroiss, 1985; Angelidaki *et al.*, 1993; Dornack, 2009). Dabei geht die Inhibition hauptsächlich von der Konzentration des undissoziierten Ammoniaks aus (Braun *et al.*, 1981; Zeeman *et al.*, 1985; Koster & Kooen, 1988). Die hydrophoben Ammoniakmoleküle diffundieren dabei passiv in die Zellen und verursachen dort Protonenimbalancen und können einen Kaliummangel verursachen (Sprott & Patel, 1986; Gallert *et al.*, 1998). Dabei gelten die methanogenen Archaeen innerhalb des bakteriellen Konsortiums anaerober Prozesse als die am wenigsten toleranten Mikroorganismen gegenüber hohe Ammoniakkonzentrationen (Kayhanian, 1994).

Ammoniak stellt gleichzeitig einen wichtigen Nährstoff für das Wachstum der Bakterien und Archaeen in anaeroben Prozessen dar (McCarty, 1964). Durch die Exposition der Mikroorganismen an eine langsam steigende Ammoniakkonzentration können sich diese jedoch auch an höhere Konzentrationen adaptieren (Melbinger *et al.*, 1971; Koster & Lettinga, 1988). Aus Abbildung 3.9 wird deutlich, dass die Konzentration an undissoziiertem Ammoniak und somit auch die Hemmwirkung mit steigendem pH-Wert zunimmt. Für eine durch Ammoniak verursachte Inhibition werden in der Literatur keine einheitlichen Werte angegeben. So wurde von Angelidaki *et al.* (1993) eine Hemmwirkung ab einer Konzentration undissoziierten Ammoniaks von 700 mg L^{-1} beschrieben, während von McCarty & McKinney (1961b) eine beginnende Toxizität ab einer Ammoniakkonzentration von 150 mg L^{-1} beschrieben wurde. Dies macht deutlich, dass auch in diesem Fall eine hohe Adaptationsfähigkeit der beteiligten Mikroorganismen beobachtet werden kann.



(a) Lineare Auftragung im pH-Bereich von 6,5 bis 12,5 (b) Semilogarithmische Auftragung im pH-Bereich von 6 bis 9

Abbildung 3.9: Zusammenhang zwischen pH-Wert und Dissoziationsgrad von Ammoniak ($pK_S=9,24$).

3.3.2.8 Faulraumbelastung & hydraulische Verweilzeit

Bei der Faulraumbelastung und der hydraulischen Verweilzeit handelt es sich um wichtige Parameter beim Betrieb von Biogasanlagen. Die Faulraumbelastung gibt an, wie viel Masse an organischer Trockensubstanz pro Arbeitsvolumen pro Zeiteinheit zugeführt wird (FNR, 2013). Da das Substrat zum Teil sehr langsam abgebaut wird, werden hohe hydraulische Verweilzeiten benötigt. Dies bedeutet jedoch auch, dass nur wenig Substrat dem Reaktor zugeführt werden kann, was wiederum die Produktivität vermindert. Die Faulraumbelastung B_R wird dabei in $g_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ angegeben, wobei \dot{m} als die Substratmenge im Zulauf in Bezug auf die organische Trockensubstanz in $g_{oTS} \text{ d}^{-1}$ und V_R das Reaktorvolumen in L definiert ist. Folgende Gleichung gibt den Zusammenhang wieder:

$$B_R = \frac{\dot{m}}{V_R} [\text{g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}] \quad (3.4)$$

Die hydraulische Verweilzeit $\tau_{hyd.}$ ist als jene Zeit definiert, welche das Substrat durchschnittlich im Reaktor verbleibt und kann wie folgt wiedergegeben werden:

$$\tau_{hyd.} = \frac{V_R}{\dot{V}} [\text{d}] \quad (3.5)$$

wobei V_R das Reaktorvolumen in L und \dot{V} den Volumenstrom in L d^{-1} darstellt. Die hydraulische Verweilzeit stellt jedoch lediglich einen theoretischen Wert dar, da ein Teil des Substrates aufgrund der vollständigen Durchmischung eines Rührkesselreaktors aus dem System ausgespült wird.

Diese Parameter stehen dabei in direktem Zusammenhang und werden von der Konzentration an organischer Trockensubstanz beeinflusst. Bei geringen Trockensubstanzkonzentrationen von $50 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1}$ ist zwar die hydraulische Verweilzeit auch bei niedriger Faulraumbelastung gering, jedoch wird aufgrund des hohen Wasseranteils aktive Biomasse aus dem Reaktor ausgespült, da einige Archaeen sehr langsame Verdopplungszeiten von weit mehr als zehn Tagen aufweisen (Kaltschmitt *et al.*, 2009). Bei sehr hohen Trockenmassekonzentrationen von $150 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1}$ hingegen ist die hydraulische Verweilzeit weit größer, jedoch kann dies aufgrund des geringeren Volumenstrom zu einer Akkumulation von flüchtigen organischen Säuren, Ammoniak und anderen Inhibitoren führen. Außerdem sind Substrate mit hohem Trockenmasseanteil schlecht oder gar nicht mit Pumpen zu befördern. Der Zusammenhang zwischen Substratkonzentration, hydraulischer Verweilzeit und Faulraumbelastung ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

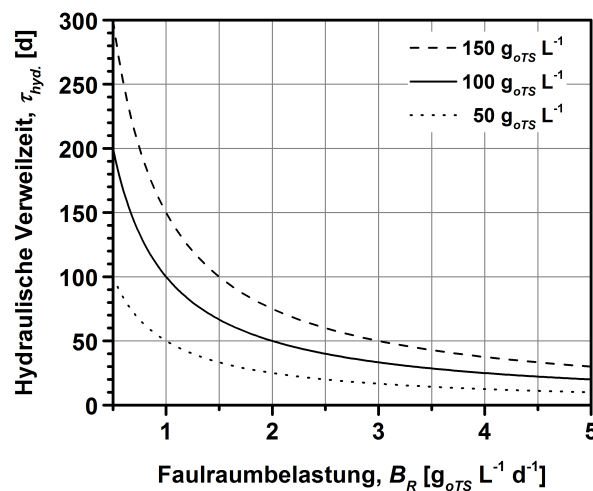


Abbildung 3.10: Einfluss der Substratkonzentration auf die hydraulische Verweilzeit in Abhängigkeit der Faulraumbelastung.

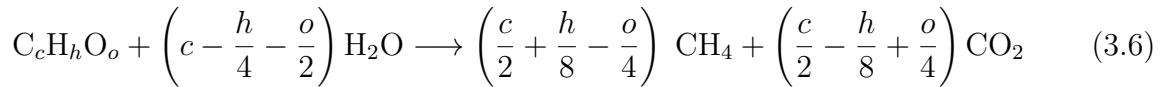
3.3.3 Bestimmung des Biogaspotentials

Das Biogas- bzw. Methanpotential von Substraten lässt sich auf verschiedenste Arten bestimmen. Laut der Richtlinie 4630 vom Verein Deutscher Ingenieure (2004) gibt es im Wesentlichen zwei verschiedene Methoden zur experimentellen Bestimmung des Potentials, wobei jede Methode diverse Vor- und Nachteile aufweist. Satzverfahren erlauben Aussagen zur grundsätzlichen Bewertung des möglichen Biogasertrages sowie der anaeroben, biologischen Abbaubarkeit eines Stoffes oder Stoffgemisches. Des Weiteren erlauben solche Methoden qualitative Beurteilungen über die Geschwindigkeit des anaeroben Abbaus der untersuchten Substanz sowie eine Bewertung der Hemmwirkung im untersuchten Konzentrationsbereich. Es können jedoch keine Aussagen über die Prozessstabilität und über die Grenzen der organischen Raumbelastung bei kontinuierlicher Beschickung gemacht werden. Zudem können mögliche positive oder negative Synergieeffekte im Satzverfahren unentdeckt bleiben und keine Aussagen über eine kontinuierliche Monovergärung gemacht werden. Das Ergebnis des Gärtests im Satzverfahren ist aufgrund einer nicht erfolgten Adaptation der Mikroorganismen außerdem von der mikrobiologischen Aktivität des Impfschlammes abhängig.

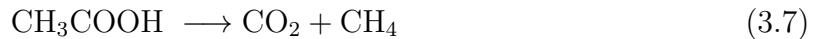
Für die Simulation eines Prozesses unter Praxisbedingungen eignen sich kontinuierliche Verfahren. Damit können Aussagen über organische Raumbelastung, mittlerer Verweilzeit, Bildung und Akkumulation von Stoffwechselprodukten sowie ihren Einfluss auf die Prozessstabilität, Effizienz, Bewertung von Schockbelastungen und qualitativen Schwankungen der Substratzusammensetzung sowie Hemmungen und Limitierungen im Dauerbetrieb gemacht werden. Des Weiteren können größere Mengen an Probematerial zur Untersuchen des Schlammes z. B. auf flüchtige organische Säuren sowie Veränderungen der Biogasqualität bereitgestellt werden. Der Einfluss der Qualität des Impfschlammes durch Nutzung einer adaptierten Biozönose im Langzeitversuch wird ebenfalls eliminiert. Ein wesentlicher Nachteil von kontinuierlichen Verfahren ist der zum Teil extrem hohe Betreuungsaufwand. Kontinuierliche Verfahren sind ebenfalls ungeeignet, wenn keine ausreichenden Probenmengen verfügbar sind, Risikomaterial untersucht werden soll, die umweltgerechte Entsorgung größerer Mengen an Versuchsrückständen Schwierigkeiten bereitet oder prinzipielle Aussagen über die Gärfähigkeit den Aufwand kontinuierlicher Versuche nicht rechtfertigt, wenn diese auch im Satzverfahren erzielt werden können. Es sollte vorher bedacht werden, dass eine kontinuierliche Testreihe einen extrem langen Zeitrahmen benötigt (VDI, 2004).

Zusätzlich gibt es noch die Möglichkeit, das Biogas- bzw. Methanpotential sowie die Gasqualität theoretisch über die Stöchiometrie zu bestimmen. Dazu muss allerdings die Elementarzusammensetzung in Bezug auf die Elemente C, H und O und eventuell auch N, S, und P bekannt sein. Nach der Gleichung von Symons & Buswell (1933) kann der

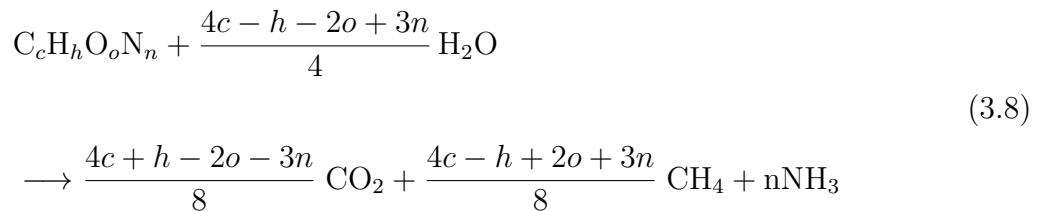
theoretische Methangehalt berechnet werden, wenn die elementare Zusammensetzung des Substrates bekannt ist:



Daraus geht hervor, dass der Abbau von einem Mol Essigsäure in exakt je einem Mol Methan und einem Mol Kohlenstoffdioxid resultiert:



Unter Einbeziehung von Stickstoff kann auch der Ammoniakanteil nach Tchobanoglous *et al.* (1993) berechnet werden:



Nach Angelidaki & Sanders (2004) kann auch der theoretische Methanertrag berechnet werden:

$$Y_{CH_4,th.} = \frac{\left(\frac{c}{2} + \frac{h}{8} - \frac{o}{4}\right) \cdot V_m}{12c + h + 16o} [\text{mL}_{CH_4} \text{ g}_{oTS}^{-1}] \quad (3.9)$$

wobei V_m das Normvolumen von einem Mol Methan darstellt. Wenn die Gaszusammensetzung und der Methanertrag bekannt ist, lässt sich daraus auch der Biogasertrag berechnen:

$$Y_{Biogas,th.} = \frac{Y_{CH_4,th.}}{CH_4} \cdot CO_2 + Y_{CH_4,th.} [\text{mL} \text{ g}_{oTS}^{-1}] \quad (3.10)$$

Von dem theoretischen Biogaspotential lässt sich jedoch nur bedingt auf das tatsächliche Biogaspotential schließen. Dieser theoretische Wert entspräche nur dann dem praktischen Wert, wenn das organische Material vollständig zu Methan und Kohlendioxid konvertiert würde. Laut Angelidaki & Sanders (2004) ist der praktische Wert aufgrund mehrerer Faktoren immer geringer. Zum einen wird typischerweise 5 bis 10 % des abgebauten organischen Materials für den Metabolismus und die Synthese der bakteriellen Biomasse verwendet und zum anderen wird eine weitere Fraktion, welche ebenfalls als 10 % anzunehmen ist, mit dem Ablauf aus dem System ungenutzt herausgespült, für den Fall, dass kontinuierliche Verfahren eingesetzt werden. Beim Einsatz von ligninhaltigem Substrat, würde der praktische Biogasertrag ebenfalls geringer ausfallen, weil Lignin unter anaeroben

Bedingungen nicht abgebaut werden kann. Häufig ist ein Teil des organischen Materials deshalb nicht verfügbar, weil es in strukturreicher organischer Materie gebunden vorliegt. Auch eine Limitierung durch andere Nährstoffe kann der Grund für einen unvollständigen Abbau darstellen. Unter günstigen Bedingungen mit hauptsächlich wasserlöslicher Materie, können Abbaugrade von 90 bis 95 % erreicht werden. Im Falle von partikel- und strukturreichem Substrat wie Gülle sind Abbaugrade von 30 bis 60 % eher normal (Angelidaki & Sanders, 2004). Laut VDI 4630 (2004) kommt noch hinzu, dass der im Versuch gemessene Kohlendioxidgehalt immer geringer als der theoretische Wert ist, weil Kohlendioxid vom Gärmedium, abhängig vom pH-Wert, stärker absorbiert wird als Methan.

Wenn die Zusammensetzung eines komplexen Substrats in Bezug auf Lipide, Proteine und Kohlenhydrate bekannt ist, kann der theoretische Biogasertrag und die Biogaszusammensetzung auch darüber approximiert werden. Tabelle 3.5 zeigt den Biogasertrag und die Biogaszusammensetzung beim Einsatz von Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten als Monosubstrat nach Baserga (1998). Daraus wird deutlich, dass beim Einsatz von Lipiden die höchsten Biogaserträge von ca. 1225 mL g_{oTS}^{-1} mit sehr hohen Methangehalten von 67 bis 68 % (v/v) erzielt werden können. Werden hingegen Kohlenhydrate als Monosubstrat eingesetzt, können zwar relativ hohe Biogaserträge von etwa 790 mL g_{oTS}^{-1} erzielt werden, jedoch ist der Methangehalt mit 50 % (v/v) verhältnismäßig gering.

Tabelle 3.5: Theoretischer Biogasertrag und Gaszusammensetzung beim Einsatz von Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten als Substrat nach Baserga (1998).

Substrat	Biogasertrag [mL g_{oTS}^{-1}]	CH ₄ [% (v/v)]	CO ₂ [% (v/v)]
Lipide	1200–1250	67–68	32–33
Proteine	700	70–71	29–30
Kohlenhydrate	790–800	50	50

Die Biogaszusammensetzung lässt sich auch von der mittleren Oxidationszahl der Kohlenstoffe der Substrate vorhersehen. Dieser Zusammenhang ist für einige Substrate nach Gujer & Zehnder (1983) in Abbildung 3.11 dargestellt. Daraus geht hervor, dass Harnstoff vollständig in Kohlendioxid umgewandelt wird und ein höchstmöglicher Methangehalt von 75 % (v/v) mit Methanol und Methylamin erreicht werden kann. Ebenfalls ist aus diesem Diagramm abzulesen, dass mit dem Einsatz von Algenbiomasse Methangehalte zwischen 60 und 65 % (v/v) zu erwarten sind. Bei einem Vergleich der Werte aus Tabelle 3.5 und denen aus Abbildung 3.11 wird auch deutlich, dass die theoretischen Werte je nach Methode durchaus inhomogen ausfallen können.

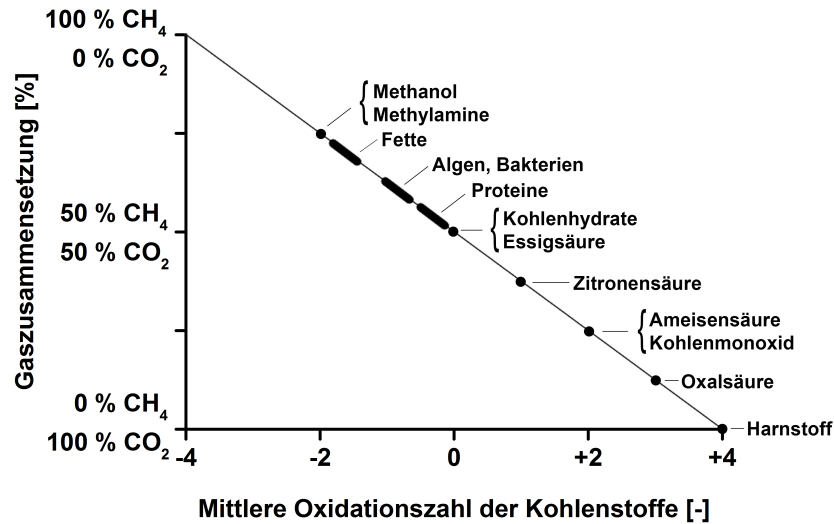


Abbildung 3.11: Verhältnis von Methan zu Kohlenstoffdioxid beim Einsatz verschiedener Substrate in Abhängigkeit der mittleren Oxidationszahl der Kohlenstoffe im Substrat, nach Gujer & Zehnder (1983).

3.4 Bioraffinerien

Bioraffinerien fußen, im Gegensatz zu der Verwertung fossiler Rohstoffe, auf der Nutzung nachwachsender, biogener Edukte. Durch die Auskoppelung von Hochwertprodukten wird bei diesen Prozessen das Ausgangsmaterial mehrfach stofflich genutzt. Dabei kann die Restbiomasse energetisch, z. B. als Substrat für Biogasanlagen, genutzt werden. Die Nutzung der Restbiomasse zur Gewinnung von Bioenergie kann die Wirtschaftlichkeit einer Bioraffinerie weiterhin erhöhen (Rosello Sastre & Posten, 2010).

Laut des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV, 2014) werden Bioraffinerien wie folgt definiert:

„Eine Bioraffinerie zeichnet sich durch ein explizit integratives, multifunktionelles Gesamtkonzept aus, das Biomasse als vielfältige Rohstoffquelle für die nachhaltige Erzeugung eines Spektrums unterschiedlicher Zwischenprodukte und Produkte (Chemikalien, Werkstoffe, Bioenergie inklusive Biokraftstoffe) unter möglichst vollständiger Verwendung aller Rohstoffkomponenten nutzt; als Koppelprodukte können gegebenenfalls zusätzlich auch Nahrungs- und/oder Futtermittel anfallen. Hierfür erfolgt die Integration unterschiedlicher Verfahren und Technologien. Die Verfahrenskette der Bioraffinerie besteht im Wesentlichen aus der Vorbehandlung und Aufbereitung der Biomasse sowie der Auftrennung der Biomassekomponenten (Primärraffination) und nachfolgenden Konversions- und Veredelungsschritten (Sekundärraffination).“

Unter den Bioraffineriekonzepten haben sich folgende Pfade herauskristallisiert, die sich im Wesentlichen durch ihre Plattform und damit auch durch die Art der Sekundärraffination unterscheiden (BMELV, 2014):

1. Zucker-Bioraffinerie bzw. Stärke-Bioraffinerie
2. Pflanzenöl-Bioraffinerie bzw. Algenlipid-Bioraffinerie
3. Lignocellulose-Bioraffinerie bzw. Grüne Bioraffinerie
4. Synthesegas-Bioraffinerie
5. Biogas-Bioraffinerie

Dabei wird zwischen einer stofflich getriebenen und einer energetisch getriebenen Bioraffinerie unterschieden. Während die stofflich getriebene Bioraffinerie vor allem auf die Produktion von Chemikalien und Werkstoffen basiert, bei welcher die Reststoffe zudem zur Erzeugung von Bioenergie und/oder Nahrungs- und/oder Futtermittel Verwendung finden, liegt der Fokus der energetisch ausgerichteten Bioraffinerie hauptsächlich auf die Produktion eines oder mehrerer Energieträger, wobei Chemikalien und Werkstoffe lediglich in geringen Mengen ausgekoppelt werden (BMELV, 2014). Seit 2014 existiert eine offizielle Richtlinie vom Verein Deutscher Ingenieure, „VDI 6310 - Klassifikation und Gütekriterien für Bioraffinerien“ (VDI, 2014). In dieser Richtlinie wurden Bioraffineriekonzepte erstmals klassifiziert und eine standardisierte Basis zur Charakterisierung von Bioraffinerien hinsichtlich technischer, ökologischer, ökonomischer und sozialer Kriterien formuliert.

Die Biokraftstoffe werden in drei Generationen unterteilt. Als Biokraftstoffe der 1. Generation werden hauptsächlich Bioethanol aus Stärke und Zucker, Biodiesel aus Pflanzenölen sowie Biogas, welche ausschließlich aus zu diesem Zweck kultivierten Nutzpflanzen gewonnen werden, bezeichnet (Naik *et al.*, 2010; Adolf *et al.*, 2013). Der Nachteil besteht darin, dass die Produktion aufgrund des Anbaus von Monokulturen einen negativen Einfluss auf die Biodiversität hat und die Fläche nicht mehr für die Produktion von Nahrungsmitteln zur Verfügung steht (Naik *et al.*, 2010). Dies führte zu der „Tank-oder-Teller-Debatte“, da die Produktion dieser Kraftstoffe teilweise zu erhöhten Nahrungsmittelpreisen geführt hat (Laursen, 2005). Dabei bieten die Biokraftstoffe der 1. Generation einige Vorteile. Zum einen weisen diese teilweise positive CO₂-Bilanzen auf und zum anderen können diese Biokraftstoffe zur Sicherung des Energiebedarfs beitragen (Naik *et al.*, 2010).

Die Gesamtbiomasse der weltweiten Agrarprodukte im Jahr 2008 betrug etwa zehn Gigatonnen. Der Anteil an nachwachsenden Rohstoffen mit dem primären Anbauziel für die Energiegewinnung betrug 3,7 % und für die stoffliche Nutzung 4,3 %, während 18 % für

die Nahrungsmittel- und 74 % für die Futtermittelgewinnung gewonnen wurden (Raschka & Carus, 2012). Dabei stellen mehr als 99 % aller heute produzierten Biokraftstoffe aus nachwachsenden Rohstoffen Biokraftstoffe der 1. Generation dar (Adolf *et al.*, 2013). Im Jahr 2010 betrug das weltweite Produktionsvolumen an Biokraftstoffen 50.000.000 m³. Der Anteil an Biogas für den Transportsektor ist dabei relativ klein (Naik *et al.*, 2010).

Als 2. Generation der Biokraftstoffe werden Biokraftstoffe aus lignocellulosehaltigen Rohstoffen bezeichnet (Simpson-Holley *et al.*, 2007). Als Ausgangsmaterial für Lignocellulose können agrarische Reststoffe (z. B. Stroh), Reststoffe aus der Forstwirtschaft, aber auch Anbaubiomasse wie Gräser (z. B. Chinaschilf) oder Holz aus Kurzumtriebsplantagen verwendet werden (Adolf *et al.*, 2013). Obwohl lignocellulosehaltige Pflanzenbiomasse zu den abundantesten biologischen Ressourcen zählt (Naik *et al.*, 2010), ist die Nutzung aufgrund einiger technischer Barrieren, welche zunächst überwunden werden müssten, häufig ineffektiv und unökonomisch (Eisberg, 2006; Morweiser *et al.*, 2010). Neben Bioethanol aus lignocellulosehaltigen Rohstoffen werden auch hydrierte Pflanzenöle, also synthetischer Biodiesel, welcher mittels Fischer-Tropsch-Synthese gewonnen wird, als Biokraftstoffe der 2. Generation bezeichnet. Kommerziell erhältlich ist heute jedoch nur synthetischer Biodiesel, deren Rohstoffe jedoch noch der 1. Generation entsprechen (Adolf *et al.*, 2013).

Bezüglich der Zuordnung der Biokraftstoffe aus Algenbiomasse wird in der Literatur keine einheitliche Definition beschrieben. Einerseits werden diese den Biokraftstoffen der 2. Generation (Schenk *et al.*, 2008; Singh & Dhar, 2011) und andererseits den Biokraftstoffen der 3. Generation zugeordnet (Dragone *et al.*, 2010; Nigam & Singh, 2011).

3.5 Bioenergiegewinnung mit Mikroalgen

Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft haben Mikroalgen das Potential als Ausgangsmaterial für viele verschiedene Bioenergieträger zu dienen (Wijffels & Barbosa, 2010). Mikroalgen lagern, vor allem unter Mangelbedingungen, chemische Energie insbesondere in Form von neutralen Lipiden oder Triglyceriden ein (Hu *et al.*, 2008). Dieses Öl kann extrahiert und zu Biodiesel (Chisti, 2007; Campbell, 2008; Scott *et al.*, 2010) oder zu linearen Kohlenwasserstoffen (Lestari *et al.*, 2009) umgewandelt werden. Auch langkettige Kohlenwasserstoffe, welche denen von Rohöl ähneln, können mit Mikroalgen gewonnen werden (Banerjee *et al.*, 2002). Mikroalgen sind außerdem unter anaeroben Bedingungen in der Lage Biowasserstoff zu produzieren (Gaffron & Rubin, 1942; Healey, 1970; Benemann, 2000; Melis & Happe, 2001; Kruse *et al.*, 2005; Kruse & Hankamer, 2010). Des Weiteren können Mikroalgen Kohlenhydrate für die Ethanolgewinnung bereitstellen (Deng & Coleman, 1999; Lee *et al.*, 2011). Die Firma Algenol Biofuels Inc. in Florida, USA, berichtete z. B. von einem Ertrag von 8,4 L m⁻² a⁻¹ Bioethanol aus Algenbiomasse (Lane, 2013).

Die Nutzung von Algenbiomasse hat nach Rosello Sastre & Posten (2010) zudem einige Vorteile gegenüber der Nutzung von Landpflanzen:

1. im Vergleich zum offenen Landbau wird wesentlich weniger Wasser benötigt, da in geschlossenen Reaktoren und daher mit Wasserrückführung gearbeitet werden kann
2. durch die Wasserrückführung kann die Algenproduktion auch in ariden Gebieten erfolgen, wo sie keine Konkurrenz zur Lebensmittelproduktion darstellt
3. auf Insektizide und Herbizide kann nach derzeitigen Kenntnisstand verzichtet werden. Die Zufuhr von Stickstoff und Phosphor sollte nach Möglichkeit aus geschlossenen Stoffkreisläufen erfolgen
4. durch ihre einfache Morphologie (keine Wurzeln, Blätter, Sprossachsen und komplexe Fortpflanzungsorgane) kann die gesamte Algenbiomasse geerntet und genutzt werden
5. Mikroalgen vermehren sich meistens asexuell durch einfache Zellteilung innerhalb weniger Stunden. Auch dadurch werden höhere Flächenerträge erzielt

Weitere Vorteile sind, dass dabei Salzwasser zum Einsatz kommen kann, was den Bedarf an Süßwasser ebenfalls minimiert, ganzjährig geerntet werden kann und die gewonnenen Treibstoffe ungiftig und biologisch abbaubar sind (Schenk *et al.*, 2008). Außerdem ist die Photonenkonversionseffizienz weitaus höher als bei Gefäßpflanzen, was in fünf bis dreißigfach höheren Flächenerträgen resultiert (Sheehan *et al.*, 1998). Die Biomasseproduktivität wird auf 40 bis 80 t ha⁻¹ a⁻¹ berechnet (Wijffels, 2008).

Die Gründe, warum Mikroalgenbiomasse heutzutage nicht bereits für die energetische Nutzung im industriellen Maßstab kultiviert werden, sind vielfältig. Eines der Hauptprobleme liegt darin, dass die Kosten für die Biomasseproduktion selbst sehr hoch sind und dass die Nettoenergiebilanz negativ ausfällt. Das bedeutet, dass mit dem heutigen Stand der Technik mehr Energie für die Gewinnung der Biomasse und für die Aufreinigung der Produkte benötigt wird, als mit der Biomasse bzw. der Restbiomasse gewonnen werden kann (Morweiser *et al.*, 2010), obwohl Hersteller von Photobioreaktoren zum Teil positive Energiebilanzen angeben (Ripplinger, 2009). Biokraftstoffe aus Mikroalgen scheinen dennoch das Potential zu haben, positivere Energiebilanzen als Biokraftstoffe aus Landpflanzen aufzuweisen und können außerdem nachhaltiger produziert werden (Chisti, 2008).

Das Hauptprodukt der heutzutage produzierten Mikroalgenbiomasse stellt die Biomasse selbst dar und findet in der Nahrungsmittel- und Futterindustrie Einsatz. Die hohen Produktionspreise können jedoch durch hohe Verkaufspreise der Hochwertprodukte für die Pharma- und Kosmetikindustrie gerechtfertigt werden, wobei für die Bedienung der sich abzeichnenden Märkte der Mittel- und Niedrigpreisprodukte noch Entwicklungsbedarf

besteht. Dadurch kann die mehrfache stoffliche Nutzung dieses Rohstoffs in Bioraffineriekonzepten durch die Gewinnung von Hochwertprodukten und der energetischen Nutzung der Restbiomasse wirtschaftlich gestaltet werden (Rosello Sastre & Posten, 2010).

3.6 Biogas aus Mikroalgen als Substrat für die Biogasgewinnung

Die Gewinnung von Biogas aus der Biomasse einer Mischkultur von Mikroalgen, hauptsächlich bestehend aus *Chlorella* sp. und *Scenedesmus* sp., wurde zum ersten Mal Ende der Fünfzigerjahre des letzten Jahrhunderts von Golueke *et al.* (1957) beschrieben, aber erst im Zuge der Ölkriese in den 1970er Jahren wurde die Idee der Nutzung von Algenbiomasse zur Energiegewinnung wieder aufgegriffen (Sheehan *et al.*, 1998; Wijffels & Barbosa, 2010). Seitdem, jedoch vermehrt in den letzten Jahren, wurden viele verschiedene Mikroalgenpezies auf den möglichen Biogasertrag beim Einsatz in Biogasreaktoren untersucht. In Tabelle 3.6 sind die Gas- bzw. Methanerträge einiger Mikroalgen, Braunalgen und häufig in landwirtschaftlichen Produktionsanlagen eingesetzte höhere Pflanzen aufgelistet.

Nach Klassen *et al.* (2015) gibt es im Wesentlichen drei Hindernisse, welche die Gewinnung von Biogas aus Algenbiomasse im Produktionsmaßstab bisher verhindert haben. Die erste Hürde stellen die hohen Kosten zur Gewinnung der Algenbiomasse dar (Posten, 2009; Rosello Sastre & Posten, 2010; Stephens *et al.*, 2010; Slade & Bauen, 2013). Des Weiteren sind viele Mikroalgenpezies dadurch charakterisiert, dass diese aufgrund ihrer Zellwandstrukturen eine hohe Resistenz gegenüber den Abbau durch anaerobe Mikroorganismen aufweisen (Golueke *et al.*, 1957; Mussnug *et al.*, 2010; Passos *et al.*, 2014; Mahdy *et al.*, 2015). Als dritte Hürde wird der hohe Proteinanteil der Biomasse und das daraus resultierende, geringe C/N-Verhältnis genannt, welches häufig in einem Bereich zwischen 5:1 bis 9:1 liegt (Yen & Brune, 2007; Lardon *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2012). Tabelle 3.7 zeigt die elementare Zusammensetzungen und die C/N-Verhältnisse einiger Mikroalgenpezies.

Geringe C/N-Verhältnisse führen zu hohen Ammoniumkonzentrationen und somit zu hohen pH-Werten im Biogasreaktor. Bei höheren pH-Werten liegt, wie bereits in Abschnitt 3.3.2.7 beschrieben, ein Teil des Ammoniums als Ammoniak vor, welches selbst in geringen Konzentrationen einen extrem inhibitorisch wirkenden Effekt auf die methanogenen Archaeen aufweist (Kroiss, 1985; Angelidaki *et al.*, 1993; Dornack, 2009). Es gibt jedoch Ansätze, das C/N-Verhältnis durch Cofermentation von Algenbiomasse mit kohlenstoffreichem Substrat (Yen & Brune, 2007; Zhong *et al.*, 2012) oder mittels alternativer Kultivierungsbedingungen, wie z. B. die Gewinnung der Mikroalgenbiomasse unter Stickstoffmangel,

Tabelle 3.6: Biogas- bzw. Methanerträge einiger Mikroalgenpezies, der Braunalgen *Macrocystis pyrifera* und *Durviella antarctica* sowie der häufig eingesetzten Substrate Zuckerrübe (*Beta vulgaris vulgaris*), Sonnenblumen (*Helianthus annuus*) und Maissilage (*Zea mays*).

Spezies	Y [mL g _{oTS} ⁻¹]	Gas	Referenz
<i>Arthrospira maxima</i>	173	Methan	Inglesby & Fisher 2012
<i>Arthrospira platisis</i>	481	Biogas	Mussgnug <i>et al.</i> 2010
<i>Beta vulgaris vulgaris</i>	730–770	Biogas	Weiland 2010
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	422	Biogas	Klassen <i>et al.</i> 2015
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ¹	698	Biogas	Klassen <i>et al.</i> 2015
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ²	690	Methan	Sialve <i>et al.</i> 2009
<i>Chlorella kessleri</i>	335	Biogas	Mussgnug <i>et al.</i> 2010
<i>Chlorella minutissima</i>	340	Biogas	Prajapati <i>et al.</i> 2014b
<i>Chlorella sorokiniana</i>	212	Biogas	Polakovičová <i>et al.</i> 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	403	Biogas	Lü <i>et al.</i> 2013
<i>Chlorella vulgaris</i> ²	690–790	Methan	Sialve <i>et al.</i> 2009
<i>Dunaliella salina</i>	505	Biogas	Mussgnug <i>et al.</i> 2010
<i>Dunaliella salina</i> ²	680	Methan	Sialve <i>et al.</i> 2009
<i>Durviella antarctica</i>	179	Biogas	Vergara-Fernández <i>et al.</i> 2008
<i>Euglena gracilis</i>	485	Biogas	Mussgnug <i>et al.</i> 2010
<i>Euglena gracilis</i> ²	530–800	Methan	Sialve <i>et al.</i> 2009
<i>Helianthus annuus</i>	230	Methan	Oechsner <i>et al.</i> 2003
<i>Macrocystis pyrifera</i>	181	Biogas	Vergara-Fernández <i>et al.</i> 2008
<i>Nannochloropsis oculata</i>	204	Methan	Buxy <i>et al.</i> 2013
<i>Nannochloropsis salina</i> ¹	130	Methan	Park & Li 2012
<i>Scenedesmus obliquus</i>	284	Biogas	Klassen <i>et al.</i> 2015
<i>Scenedesmus obliquus</i> ¹	586	Biogas	Klassen <i>et al.</i> 2015
<i>Scenedesmus</i> sp.	140	Methan	Ramos-Suárez & Carreras 2014
<i>Scenedesmus</i> sp. ²	272	Methan	Sialve <i>et al.</i> 2009
<i>Spirulina maxima</i>	240	Methan	Varel <i>et al.</i> 1988
<i>Spirulina maxima</i> ²	630–740	Methan	Sialve <i>et al.</i> 2009
<i>Tetraselmis</i> sp.	310	Methan	Asinari di San Marzano <i>et al.</i> 1982
<i>Zea mays</i>	560–650	Biogas	Weiland 2010

¹ unter Stickstoffmangel kultiviert

² theoretisch berechneter Methanertrag auf Basis der Lipid-, Protein- und Kohlenhydratanteile

Tabelle 3.7: Elementare Zusammensetzungen und C/N-Verhältnisse einiger Mikroalgenspezies nach Biller *et al.* (2012) und Elliott *et al.* (2013).

Spezies	C [% (w/w)]	H [% (w/w)]	O [% (w/w)]	N [% (w/w)]	C/N [-]
<i>Arthrospira platensis</i> ¹	55,7±0,4	6,8±0,1	26,4	11,2±0,1	8,1:1
<i>Chlorogloeopsis fritschii</i> ¹	54,4±2,1	6,9±0,5	31,4	7,3±0,3	5,0:1
<i>Chlorella vulgaris</i> ¹	52,6±0,8	7,1±0,1	32,2	8,2±0,2	6,4:1
<i>Scenedesmus dimorphous</i> ¹	53,4±0,6	7,8±0,2	31,0	7,9±0,2	6,8:1
<i>Nannochloropsis</i> sp. ²	47,6	6,6	21,7	5,5	8,6:1
<i>Nannochloropsis</i> sp. ^{2,3}	49,7	7,1	26,7	5,8	8,7:1

¹ unter Stickstoffmangel kultiviert, nach Elliott *et al.* (2013)

² nach Biller *et al.* (2012)

³ lipidextrahierte Biomasse

was in einer vermehrten Einlagerung intrazellulärer Speicherpolysaccharide bzw. Lipide resultiert, zu erhöhen (Klassen *et al.*, 2015).

Die Gewinnung von Biogas bietet im Gegensatz zu anderen Formen von Bioenergie einige Vorteile. Es konnte gezeigt werden, dass die Biogasgewinnung eine der energieeffizientesten und umweltfreundlichsten Technologien für die Bioenergieproduktion darstellt (Fehrenbach *et al.*, 2008). Im Vergleich zu fossilen Rohstoffen, kann durch die Nutzung lokal verfügbarer Ressourcen dabei die Treibhausgasemission enorm reduziert und der Gärrest als optimales Düngemittel für Nutzpflanzen verwendet werden, wodurch auf den Einsatz von Mineraldünger verzichtet werden kann (Chisti, 2008; Weiland, 2010). Bezüglich eines Bioraffineriekonzeptes mit Mikroalgenbiomasse wäre zudem denkbar, dass die Kultivierung auch mit Gärresten als Medienbestandteile erfolgen kann (Prajapati *et al.*, 2014a). Eine weitere Möglichkeit, einen nahezu geschlossenen Kreislauf zu realisieren, stellt die Nutzung des Kohlenstoffdioxids als Kohlenstoffquelle für die photoautotrophe Gewinnung der Mikroalgenbiomasse aus dem Rauchgas von Blockheizkraftwerken dar (Brown, 1996; Kadam, 1997; Doucha *et al.*, 2005). Auch für *E. gracilis* wurde beschrieben, dass Gärreste als Medienbestandteile (Khanh *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2015) und Kohlenstoffdioxid aus Rauchgasen für die Kultivierung eingesetzt werden können (Chae *et al.*, 2006).

4 Material & Methoden

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Carl Roth, VWR, Merck, Sigma-Aldrich oder AppliChem bezogen und wiesen den höchsten Reinheitsgrad auf.

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Medien

Für alle Kultivierungen sowie für die Stammhaltung wurde das Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) verwendet. Die Zusammensetzung dieses Mediums ist in Tabelle 4.1 wiedergegeben. Die Konzentration des Vitamins Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂) wurde jedoch aufgrund einer höheren Replizierbarkeit im Vergleich zur Originalzusammensetzung von 0,5 ng L⁻¹ auf 0,05 µg L⁻¹ erhöht. Für heterotrophe Kultivierungen wurde das Medium zusätzlich mit 22 g L⁻¹ D-(+)-Glucose-Monohydrat supplementiert. Die Sterilisation erfolgte in einem Autoklaven bei einer Temperatur von 121 °C und 1 bar Überdruck für 45 min. Um bei dem Sterilisationsvorgang die unerwünschte Maillard-Reaktion der Glucose mit Stickstoffverbindungen zu vermeiden, wurde die Glucoselösung zehnfach angesetzt und nach Abkühlung auf < 60 °C dem Medium zugeführt. Auch die Sterilisation des Calciumchlorids und des Magnesiumsulfats erfolgte getrennt, da sich unter Umständen eine undefinierte Menge von unlöslichem Gips bilden kann. Das Magnesiumsulfat wurde zusammen mit der Glucose sterilisiert.

Die *E. gracilis*-Biomasse, welche in einem der kontinuierlichen Biogasprozesse als Substrat eingesetzt wurde, wurde mit dem EG5.1-Medium in einem photoautotrophen, kontinuierlichen Prozess gewonnen. Bei diesem Medium handelt es sich um eine Eigenkomposition von Herrn Dominik Cholewa, Lehrstuhl für Fermentationstechnik, Universität Bielefeld und stellt, wie das Basalmedium nach Cramer & Myers (1952), ein Minimalmedium dar. Der pH-Wert wurde mit HCl auf einen Wert von 3,5 eingestellt. Tabelle 4.2 zeigt die Zusammensetzung dieses Mediums.

Die Vitaminlösung mit Thiaminhydrochlorid ($\geq 99,0\%$ (*w/w*), Sigma-Aldrich, USA) und Cyanocobalamin ($\geq 98,5\%$ (*w/w*), Sigma-Aldrich, USA) wurden als Tausendfachstammmlösung angesetzt, mittels Sterilfiltration mit einem Sterilfilter mit Lueranschluss (Porengröße 0,22 µm, Millex[®] GP, Millipore, USA) sterilisiert und ebenfalls dem erkalteten

Tabelle 4.1: Zusammensetzung des Basalmediums nach Cramer & Myers (1952). Angegeben sind die finalen Konzentrationen des komplementierten Mediums.

Salze	[g L⁻¹]
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,41
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 5,5 H ₂ O	0,626
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,026
Spurenelemente	[mg L⁻¹]
Fe ₂ (SO ₄) ₃ · 6 H ₂ O	3,0
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	1,8
Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O	1,3
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,4
H ₂ MoO ₄	0,2
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,02
Vitamine	[μg L⁻¹]
Thiamin · HCl (Vitamin B ₁)	0,01
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	0,05

Medium gemäß der Tabellen 4.1 und 4.2 zugefügt. Die Vitaminstammlösungen wurde in einem sterilen Gefäß bei 4 °C und unter Lichtausschluss gelagert. Die Spurenelemente für das Basalmedium wurden als Tausendfachstammlösung und die des EG5.1-Mediums als Zehntausendfachstammlösung angesetzt. Beim Letztgenannten wurde zudem das FeCl₂ separat angesetzt. Zur besseren Löslichkeit der einzelnen Substanzen, wurden alle Spurenelementstammlösungen mit 37 %-iger (*w/w*) Salzsäure auf einen pH-Wert von ca. 1 eingestellt. Das Basalmedium wies ohne Korrektur einen pH-Wert von ca. 6,8 auf, wobei kein bestimmter Wert eingestellt wurde. Das EG.5-Medium wurde mit HCl auf einen pH-Wert von 3 eingestellt.

4.1.2 Stammhaltung

Der Wildtyp *E. gracilis* Z (Klebs) wurde aus der Sammlung von Algenkulturen der Georg-August-Universität Göttingen (SAG, Stammmnummer: 1224-5/25) bezogen. Die Stammhaltung erfolgte heterotroph unter Lichtausschluss in einem Brutschrank bei 28 °C in 300 mL-Erlmeyerkolben mit Silikonstopfen (SILICOSEN[®], C40, Hirschmann[®], Deutschland) und einem Arbeitsvolumen von 100 mL. Als Substrat wurde 22 g L⁻¹ D-(+)-Glucose-Monohydrat verwendet. Ein Orbitalschüttler mit einer Frequenz von 120 min⁻¹ und einer Amplitude von 12,5 mm sorgte für die Durchmischung. Die Überführung von 5 mL Kultur auf 95 mL frisches Medium erfolgte wöchentlich.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung des EG5.1-Mediums. Eigenkomposition von Dominik Cholewa, Lehrstuhl für Fermentationstechnik, Universität Bielefeld. Angegeben sind die finalen Konzentrationen des komplementierten Mediums.

Salze	[g L⁻¹]
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,03
EDTA	0,01
Spurenelemente	[mg L⁻¹]
FeCl ₃	1
MnCl ₄ · 4 H ₂ O	1,80
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,40
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,20
Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O	1,3
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,02
Vitamine	[μg L⁻¹]
Thiamin · HCl (Vitamin B ₁)	10
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	0,2

4.1.3 Schüttelkolbenkultivierungen

Für alle Kultivierungen im Schüttelkolben wurden 300 mL-Erlmeyerkolben ohne Schikanen verwendet. Um die Kulturen axenisch zu halten, wurden luftdurchlässige Silikonstopfen (SILICOSEN[®], C40, Hirschmann[®], Deutschland) eingesetzt. Das Arbeitsvolumen betrug 100 mL. 95 mL Medium wurden mit 5 mL einer heterotroph gewonnenen Vorkultur aus der frühstationären Phase inokuliert und auf einem Orbitalschüttler bei einer Rotationsfrequenz von 120 min⁻¹ und einer Amplitude von 12,5 mm kultiviert. Die Temperatur wurde auf 28 °C geregelt. Heterotrophe Kulturen wurden in Abwesenheit von Licht in einem lichtundurchlässigen Brutschrank kultiviert. Photoautotrophe und photoheterotrophe Kultivierungen erfolgten in einer Atmosphäre aus 5 % (*v/v*) CO₂ in Luft und einer Illumination durch neun LEDs (Power SuperFlux-LED, Warmweiß, Nichia Inside, Japan) pro Schüttelkolben mit variablen Lichtflüssen von 750 μmol m⁻² s⁻¹ und 1000 μmol m⁻² s⁻¹. Die Beleuchtung erfolgte dabei von unten und die Schichtdicke der Suspension betrug bei einem Füllvolumen von 100 mL ca. 2,1 cm. Das Emissionsspektrum dieser Emitter ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

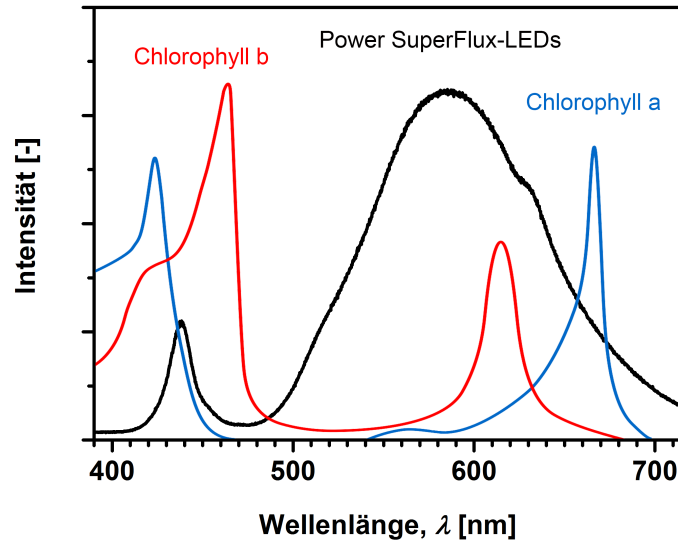


Abbildung 4.1: Emmissionsspektrum der PowerSuperFlux-LEDs, Warmweiß, Nichia Inside, Japan und das Absorptionsspektrum von Chlorophyll a und b nach Campbell *et al.* (2006).

4.2 Analytische Methoden

4.2.1 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte rein gravimetrisch als Dreifachbestimmung. Dazu wurden 2 mL-Reaktionsgefäße verwendet, welche zuvor mindestens 24 Stunden bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet und deren exaktes Gewicht auf einer Analysenwaage bestimmt wurden. 2 mL einer Kultur wurden in das Gefäß überführt und die Zellen mittels Zentrifugation bei 7500 *g* geerntet. Der Überstand der photoheterotrophen und heterotrophen Kulturen wurde für die Substratanalytik verwendet. Ansonsten wurde dieser verworfen. Darauf folgte ein Waschschriff mit demselben Volumen *ddH*₂O und eine erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Nach Dekantieren des Überstands wurde das Zellpellet über Nacht mittels Lyophilisation getrocknet. Das Reaktionsgefäß mit dem getrockneten Pellet wurde erneut gewogen und die Biotrockenmasse aus der Differenz bestimmt. Wurde die Biotrockenmassekonzentration zu Beginn einer Kultivierung bestimmt, wurden 5 bis 10 mL Kultur und ein 15 mL-Reaktionsgefäß verwendet, um Messungenauigkeiten aufgrund der geringen Probenmenge zu vermeiden.

4.2.2 Bestimmung der Glucosekonzentration

Für die Bestimmung der Glucosekonzentration $c_{Glucose}$ bei heterotropher und photoheterotropher Kultivierung wurde mindestens 1 mL Kultur bei 7500 *g* zentrifugiert. 800 μ L des Überstands wurden in ein 1,5 mL-HPLC-Vial (Techlab, Deutschland) überführt und mit

2 μL einer 100 g L^{-1} Natriumazidlösung versehen, um mikrobielle Kontaminationen und den dadurch resultierenden Fehlern bei den Messergebnissen vorzubeugen.

Die Bestimmung der Substratkonzentration erfolgte mittels HPLC zu jeweils drei Replika. Die HPLC-Anlage bestand aus einem Marathon-Autosampler (Spark Holland, Niederlande) und einem Injektionsventil Modell 7010 von Rheodyne (IDEX Health & Science, Deutschland), welches mit einer $20 \mu\text{L}$ -Probenschleife versehen wurde. Als Pumpe diente eine IRICA-Pumpe (Σ 871, Japan). Als stationäre Phase wurde eine $300 \text{ mm} \times 7,8 \text{ mm}$ NUCLEOGEL[®] ION 300 OA-Säule (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland) verwendet. Zudem wurde die HPLC-Anlage mit einem Entgaser (ERC-3612, ERMA CR. Inc., Japan) und einem Säulenofen (Gecko 2000, ERMA CR. Inc., Japan) versehen. Die Detektion erfolgte durch die Veränderung des Brechungsindex über einen RI-Detektor (ERC-7515 A, ERMA CR. Inc., Japan). Ein Umwälzthermostat der Firma Julabo (Julabo GmbH, Deutschland), an welchem eine Temperatur von $1 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt wurde, diente der Kühlung der Proben im Autosampler, um ebenfalls eventuelle mikrobielle Verunreinigungen vorzubeugen.

Als mobile Phase wurde $2,5 \text{ mM}$ Schwefelsäure eingesetzt, welche mit einem Volumenstrom von $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ befördert wurde. Die stationäre Phase der Säule bestand aus einem sulfonierten, sphärischen Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer in der protonierten Form. Die Trennung der in der Probe enthaltenen Substanzen erfolgte nach dem Prinzip des Ionenausschlusses über einen Zeitraum von 25 min . Zur Verminderung des Säulendrucks und für optimale Trenneigenschaften wurde die Säule auf $73 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert. Mit Hilfe der Software Chromstar Light, Version 6.3 (Software für Chromatographie & Prozessanalytik GmbH, Deutschland) wurden die Chromatogramme aufgenommen und ausgewertet. Über die Steigung einer Kalibriergeraden, welche anhand der Peakflächen der Standards berechnet wurde, erfolgte die Konzentrationsbestimmung. Die Konzentrationen der Standards betragen $2,2$, $5,5$ und 22 g L^{-1} D-(+)-Glucose-Monohydrat. Bei der chromatographischen Messung des Mediums ohne Kohlenstoffquelle wurde kein Peak detektiert. Aus diesem Grund wurde der y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden als „0“ definiert.

4.2.3 α -Tocopherol-Extraktion

Die Zellen aus 2 mL einer submersen *E. gracilis*-Kultur wurden in ein 2 mL -Reaktionsgefäß überführt, mittels Zentrifugation bei 7500 bis 10.000 g geerntet und anschließend mit demselben Volumen $dd\text{H}_2\text{O}$ einmal gewaschen. Nach dem Dekantieren des Überstands wurde das Pellet lyophilisiert. Die Extraktion des α -Tocopherols erfolgte mittels Methanol *p.A.* Durch vortexen und unter Zuhilfenahme eines Einwegrührspatels wurde das Pellet vollständig in 1 mL des Lösemittels resuspendiert und mindestens für zwei Stunden an einem Vertikalrotator (Eigenbau des Lehrstuhls für Fermentationstechnik) bei einer Frequenz

von 20 min^{-1} bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ invertieren gelassen. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 14.000 g und $1 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde der Überstand in ein $1,5 \text{ mL}$ -HPLC-Vial (Techlab, Deutschland) überführt. Erfolgte die Analyse zu einem späteren Zeitpunkt, wurde die Probe bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Bei der Extraktion wurde darauf geachtet, dass die Proben keinem direkten Sonnenlicht und nur kurze Zeit dem Luftsauerstoff ausgesetzt waren, da α -Tocopherol eine hohe Licht- und Sauerstoffsensitivität aufweist.

Erfolgte die Extraktion aus einer größeren Menge an Biomasse, wurde je Gramm lyophilisierter Biomasse 20 mL Methanol *p.A* eingesetzt. Die Biomasse wurde vor der Trocknung zur Entfernung von Medienbestandteilen zweimal mit etwa dem selben Kulturvolumen mit $dd\text{H}_2\text{O}$ gewaschen. Die Extraktion erfolgte, je nach eingesetzter Masse, in einem 250 mL - oder 1 L -Rundkolben für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Dazu wurde der Rundkolben an einen Rotationsverdampfer appliziert und bei einer Frequenz von ca. 50 min^{-1} rotieren gelassen, wobei jedoch kein Vakuum angelegt wurde. Daraufhin wurde das Filtrat unter Zuhilfenahme eines Faltenfilters und eines Trichters von dem Retentat getrennt. Die Lösemittelreste im Retentat wurden unter einem Abzug über Nacht bei Raumtemperatur abgedampft. Ein Teil des Filtrats wurde bei 10.000 g für 10 min zentrifugiert und die α -Tocopherolkonzentration mittels HPLC bestimmt.

4.2.4 Bestimmung der α -Tocopherolkonzentration

Die Quantifizierung der α -Tocopherolkonzentration $c_{\alpha\text{-Toc}}$ erfolgte mittels HPLC. Die HPLC-Anlage bestand aus einem Marathon-Autosampler (Spark Holland, Niederlande), welcher mit einem Injektionsventil Modell 7010 von Rheodyne (IDEX Health & Science, Deutschland) und einer $50 \text{ }\mu\text{L}$ -Probenschleife ausgerüstet war. Die Detektion erfolgte fluorimetrisch über einen Fluoreszenzdetektor (RF-551, Shimadzu Corp., Japan) mit einer Anregungswellenlänge von 290 nm und einer Emissionswellenlänge von 330 nm .

Als mobile Phase wurde $100 \text{ } \%$ (v/v) redestilliertes Methanol mit einem Wassergehalt von 100 bis 400 ppm verwendet, welches mit einem Volumenstrom von $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ mittels einer IRICA-Pumpe ($\Sigma 871$, Japan) für 25 min bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ befördert wurde. Ein Entgaser (ERC-3612, ERMA CR. Inc., Japan) entfernte gelöste Gase aus dem Laufmittel. Als Säule wurde eine $150 \times 4,6 \text{ mm}$ Eurospher II 100-5 C18 P-Säule mit Vorsäule (Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH, Deutschland) eingesetzt. Die stationäre Phase der Säule bestand aus einem C18-Silicagel, welches durch *endcapping* einen erhöhten Kohlenstoffgehalt aufwies. Das Trennprinzip beruhte dabei auf hydrophoben und sterischen Effekten. Als Standard wurde (\pm)- α -Tocopherol ($\geq 96 \text{ } \%$ HPLC) von Fluka[®] Analytical (T3251, Sigma-Aldrich, USA) in den Konzentrationen 5 , 10 und 20 mg L^{-1} , gelöst in reinem Methanol *p. A.*, eingesetzt. Die Aufzeichnung und die Auswertung der Chromatogramme erfolgte über die Software Chromstar Light, Version 6.3 (Software für Chromatographie &

Prozessanalytik GmbH, Deutschland). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine Kalibriergerade zu je drei Replika. Da reines Methanol bei der eingestellten Anregungswellenlänge keine Emission zeigte, wurde der y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden als „0“ definiert.

4.2.5 Bestimmung der Paramylonkonzentration über die Aufreinigung der Granula

Die Aufreinigung der Paramylongranula erfolgte in Anlehnung an die Methode von Clarke & Stone (1960) mit folgenden Modifikationen: Die Zellen aus 2 mL heterotropher oder photoheterotropher Kultur wurden mittels Zentrifugation geerntet und der Überstand verworfen. Erfolgte die Aufreinigung der Granula zu Beginn der Kultivierung oder aus einer photoautotrophen Kultur, wurden aufgrund geringerer Biotrockenmassekonzentrationen Zellen aus 15 mL Kultur eingesetzt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 7500 g für 10 min. Nach Resuspension in 2 mL ddH_2O folgte eine zweimalige Desintegration der Zellen mittels Ultraschall (Branson Sonifier 450, Branson Ultrasonics Co., USA) für 30 s bei 80 W. Daraufhin wurde das Pellet erneut mit 2 mL ddH_2O und zweimal mit jeweils 2 mL Ethanol *p. A.* gewaschen. Wurde zuvor die α -Tocopherolkonzentration der selben Kultur bestimmt, wurde das extrahierte Pellet auch für die Paramylonaufreinigung verwendet. Dabei entfiel der Waschschrift mit ddH_2O sowie der erste Waschschrift mit Ethanol *p. A.* Der Waschschrift mit einem organischem Lösemittel diente der Entfernung lipophiler Substanzen. Für die Entfernung der restlichen Proteine wurden diese mittels 1 mL einer Lösung aus 1 $g L^{-1}$ Trypsin (13,5 $U mg^{-1}$, T4799, Sigma-Aldrich, USA) in 100 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 7,6 für ca. zwölf Stunden bei 37 °C auf einem Vertikalrotator (Eigenbau des Lehrstuhls für Fermentationstechnik) bei einer Frequenz von 20 min^{-1} proteolytisch gespalten und in Lösung gebracht. Das Proteolysat wurde anschließend mittels Zentrifugation vom Pellet getrennt und durch zweimaliges Waschen mit 1 mL einer Lösung aus 500 $g L^{-1}$ Harnstoff entfernt. Zur Entfernung des Harnstoffs wurde das Pellet erneut zweimal mit 2 mL ddH_2O gewaschen. Nach Lyophilisation des aufgereinigten Paramylons wurde die Paramylontrockenmasse analog zu der Biotrockenmasse gravimetrisch zu je drei Replika bestimmt.

4.2.6 Bestimmung der Biogaszusammensetzung mittels Micro-GC

Die Bestimmung der Zusammensetzung des Biogases erfolgte mittels Gaschromatographie. Die Micro-GC-Anlage GCM[®] Micro Box III (Elster GmbH, Deutschland) wurde mit Argon (Reinheit 5.0, Linde Gas, Deutschland) als Trägergas, welches mit einem Druck von 3,5 bar appliziert wurde, betrieben. Die Säule, eine Micropacked HayeSep A-Säule

(Elster GmbH, Deutschland), welche einen Innendurchmesser von 300 μm und eine Länge von 65 cm aufwies, wurde vor jeder Messung mit der Probe gespült. Pro Detektion wurde eine Injektion von 8 μL Probengas eingesetzt. Je nach Dauer der Spülzeit benötigte der Gaschromatograph ca. 5 bis 20 mL Gas pro Messung. Die Gesamtdauer der Methode betrug 120 s. Die Temperatur der Säule wurde für die ersten 50 s auf 50 °C eingestellt. Darauf folgte eine Erhöhung der Temperatur um 4 °C s⁻¹, bis eine finale Temperatur von 165 °C erreicht wurde, welche bis zum Ende der Messung beibehalten wurde. Die einzelnen *Peaks* ergaben sich durch die Veränderung der Spannung am Wärmeleitfähigkeitsdetektor. Das bei den kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktoren gewonnene Biogas wurde mittels einer gasdichten Glasspritze (SGE Analytical Science, Australien) mit einem Volumen von 25 mL entnommen und manuell in die Micro-GC injiziert. Das in Satzreaktoren entstandene Gas wurde aufgrund des inhomogenen Drucks in der Gasphase der Satzreaktoren über eine vorgeschaltete Pumpe (Elster GmbH, Deutschland) appliziert. Zwischen der Spritze bzw. der Pumpe und dem Injektor wurde ein Sterilfilter mit Lueranschluss (Porengröße 0,22 μm , Millex[®] GP, Merk Millipore, USA) eingebaut, um Verunreinigungen der Säule durch z. B. Staub zu vermeiden.

Die Kalibrierung erfolgte über ein Kalibriergas (Linde Gas, Deutschland) mit zertifizierter Gaszusammensetzung nach DIN EN ISO 6141 (2013). Dieses Kalibriergas bestand aus 59,4 % (v/v) CH₄, 34,4 % (v/v) CO₂, 0,498 % (v/v) H₂, 0,208 % (v/v) H₂S, 0,103 % (v/v) O₂ und 5,391 % (v/v) N₂. Die Chromatogramme wurden mit der Mess- und Auswertesoftware GC[®]-Manager (Elster GmbH, Deutschland) aufgenommen und ausgewertet. Die Messungen erfolgten als Duplikate.

4.2.7 Konzentrationsbestimmung der flüchtigen organischen Säuren

Die Konzentrationsbestimmung der flüchtigen organischen Säuren wurde mittels Gaschromatographie gemäß Methode 5560 der Standardmethoden für die Untersuchung von Wasser und Abwasser (Eaton *et al.*, 1985) in Zweifachbestimmung durchgeführt. Die GC-Anlage bestand aus einem Shimadzu GC-2010 Plus-Gaschromatographen (Shimadzu Corp., Japan) mit einem AOC-20i-Autosampler und einem Flammenionisationsdetektor, welcher mit Wasserstoff und synthetischer Luft betrieben wurde. Alle verwendeten Gase wiesen die Reinheit 5.0 auf und wurden von Linde Gas (Deutschland) bezogen. Die Auftrennung der einzelnen Komponenten erfolgte über eine OPTIMA[®] FFAPplus-Säule (Macherey-Nagel GmbH & Co., Deutschland), welche einen Innendurchmesser von 0,25 mm und eine Länge von 30 m aufwies. Die Filmdicke betrug 50 μm . Dieser Säule war eine kohlenwasserstoffdesaktivierte Kapillarsäule (Macherey-Nagel GmbH & Co., Deutschland) mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm und eine Länge von 10 m vorgeschaltet. Die Analyse wurde unter konstantem Druck von 231,9 kPa mit Helium als Trägergas und

Stickstoff als *Makeup*-Gas durchgeführt, welche mit einer linearen Geschwindigkeit von 60 cm s^{-1} durch die Säule befördert wurden. Die Temperatur des Injektors wurde auf $230 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt. Das Probevolumen betrug $0,5 \text{ } \mu\text{L}$, welches mit einem *Split* von 10 auf die Säule aufgetragen wurde. Die Temperatur des Säulenofens wurde für die ersten 2 min auf $100 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt. Darauf folgte eine Erhöhung der Temperatur um $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, bis eine finale Temperatur von $175 \text{ }^\circ\text{C}$ erreicht wurde. Die Gesamtdauer einer Messung betrug 19 min.

Für die Konditionierung der Proben wurden je 1 mL des Schlamms in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000 g für 10 min zentrifugiert. $800 \text{ } \mu\text{L}$ des Überstands wurden in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit $8 \text{ } \mu\text{L}$ einer 85 %igen (*w/w*) Phosphorsäure versehen, um einen finalen pH-Wert von etwa 2 zu gewährleisten, da die flüchtigen organischen Säuren für die Detektion vollständig in der undissoziierten Form vorliegen mussten. Die Proben mussten vor der Messung einen Sterilfilter mit Lueranschluss (Porengröße $0,22 \text{ } \mu\text{m}$, Millex[®] GP, Merk Millipore, USA) passieren, um eine Auftragung von Partikeln auf die Säule zu vermeiden. Daraufhin wurden $100 \text{ } \mu\text{L}$ je Probe in ein 1,5 mL-HPLC-Vial mit $150 \text{ } \mu\text{L}$ -Mikroinsert (Techlab, Deutschland) überführt. Die Proben wurden bis zur Messung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Bestimmung der Konzentration der flüchtigen organischen Säuren erfolgte in Zweifachbestimmung.

Als Standard wurde ein VFA-Mix (46975-U, Supelco Analytical, Sigma-Aldrich, USA) eingesetzt. Dieser Mix bestand aus Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, n-Buttersäure, Isobuttersäure, n-Valeriansäure, Isovaleriansäure, 4-Methylvaleriansäure, n-Hexansäure und n-Heptansäure, welche jeweils eine Konzentration von 10 mM aufwiesen. Bei jeder Messung wurden die Standards in den Konzentrationen 0,1 mM, 1 mM und 10 mM eingesetzt. Die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte über die Software GCsolution (Version 2.4, Shimadzu Corp., Japan).

4.2.8 Bestimmung der Ammonium- und Ammoniakkonzentration

Die Bestimmung der Ammoniumkonzentration erfolgte gemäß DIN 38406-5 (1983) mittels des Ammonium Küvetten-Tests LCK 302 (Hach-Lange, Deutschland) in Zweifachbestimmung. Der Messbereich dieses Tests betrug 47 bis $130 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4\text{-N}$. Für eine Reaktion mit dem Reagenz mussten die Moleküle als dissoziiertes Ammonium vorliegen, so dass die Proben einen pH-Wert von $< 6,5$ aufweisen mussten. Dazu wurde 1 mL der Probe in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000 g für 10 min zentrifugiert. Nach Überführung von $800 \text{ } \mu\text{L}$ des Überstandes in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäßes wurde mit $8 \text{ } \mu\text{L}$ einer 85 %igen (*w/w*) Phosphorsäure ein pH-Wert von ca. 2 eingestellt. Die Messungen erfolgten in Zweifachbestimmung. Die genaue Durchführung der photometrischen Messungen erfolgte gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers.

Die Ammoniakkonzentration wurde unter Einbeziehung der Temperatur, des pH-Wertes und der Ammoniumkonzentration mittels der Formel nach Dornack (2000) berechnet:

$$c_{NH_3} = c_{NH_4^+} \cdot \frac{10^{pH}}{e^{\frac{6344}{273+T}} + 10^{pH}} \quad (4.1)$$

4.2.9 Elementaranalyse

Die Analyse der Elemente C, H, O, N, P, S sowie der Spurenelemente Kobalt, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän und Zink wurde von der Firma Wessling GmbH durchgeführt. Die Analyse der Elemente C, H, O und N erfolgte dabei nach DIN 51732 (2014). Die Spurenelementanalyse sowie die Analyse von Phosphor wurde nach DIN EN ISO 11885 (2009) mittels induktiv gekoppelter Plasma-Atom-Emissionsspektrometrie (ICP-OES) und Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) durchgeführt. Die Feststoffe wurden zuvor mittels Königswasser-Extraktion nach DIN EN ISO 11466 (1995) extrahiert. Die Messungen erfolgten aus jeweils 3 g gewaschener, lyophilisierter Biomasse.

4.2.10 Bestimmung der organischen Trockensubstanz

Die Bestimmung des Anteils an organischen Trockensubstanz erfolgte über die Glührückstände in einer Dreifachbestimmung. Dazu wurden ca. 500 mg trockene Biomasse in ein 4 mL-Braunglasfläschchen mit G12-Gewinde (Shimadzu, Japan), deren exaktes Leergewicht zuvor mittels einer Analysenwaage bestimmt wurde, überführt, das Gewicht inklusive Biomasse erneut bestimmt und im Anschluss für mindestens 12 h in einem Muffelofen bei 550 °C eingeäschert. Nach erneuter Wägung wurde der Gehalt an organischer Substanz gravimetrisch über die Differenz ermittelt.

4.3 Verfahrenstechnische Methoden

4.3.1 Kultivierungen von *E. gracilis* im Rührkesselreaktor

Für alle heterotrophen Kultivierungen von *E. gracilis* im Labormaßstab wurden die Kleinlabborfermenter des Typs KLF (Bioengineering AG, Schweiz) eingesetzt. Dieser Bioreaktortyp wies ein Fassungsvermögen von 3,7 L auf, wobei mit einem Arbeitsvolumen von 2 L gearbeitet wurde. Als Rührorgan wurde ein Schrägblattrührer verwendet, dessen zwei Blätter um 45° zur Achse versetzt waren und von der mechanischen Werkstatt der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld angefertigt wurde. Der Rührer ist in Abbildung 4.2 (a) als Seitenansicht und 4.2 (b) als Aufsicht dargestellt. Im Betrieb wurde dieser so rotieren

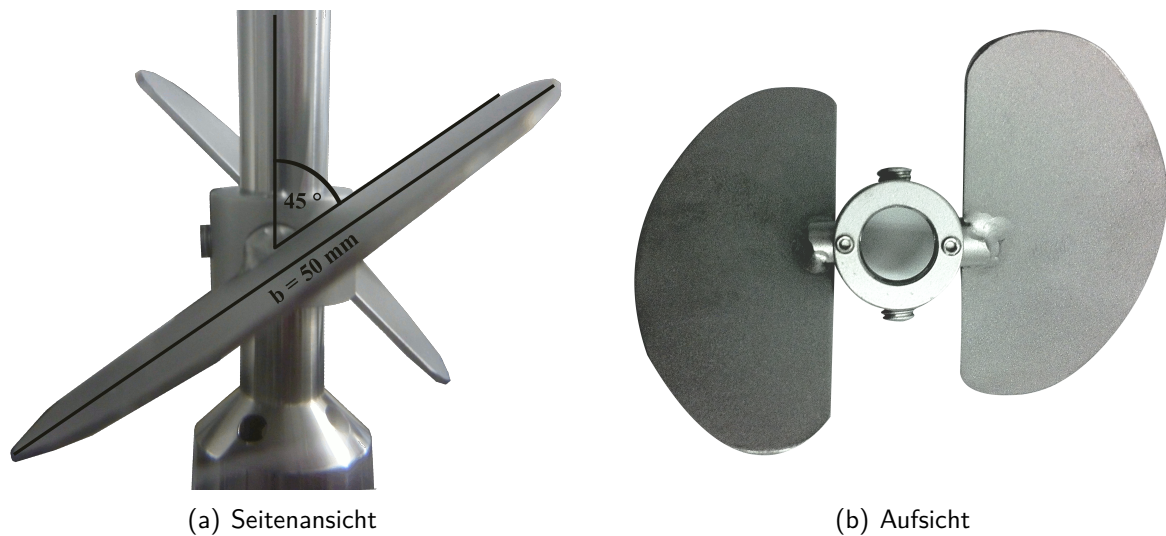


Abbildung 4.2: Fotografische Darstellung des Schrägblattrührers.

gelassen, dass die Kulturbrühe in Richtung des Fermenterbodens befördert wurde und somit für eine axiale Durchmischung sorgte. Die Länge der einzelnen Blätter, welche eine halbkreisförmige Geometrie aufwiesen, betrug 50 mm und die Breite 32 mm. Der assemblierte Rührer wies einen Durchmesser von 84 mm auf. Aufgrund der Scherempfindlichkeit von *E. gracilis*, welche aufgrund der flexiblen Pellicula im Zusammenhang mit der Zellgröße des Organismus gegeben war, wurde auf die Verwendung von Sechsblasscheibenrührern, welche gewöhnlich in dreifacher Ausführung an der Rührerwelle befestigt sind, verzichtet. Bei der Verwendung von Rührern mit derartiger Geometrie musste mit sehr hohen Drehzahlen gearbeitet werden, da ansonsten Konzentrationseffekte aufgrund des raschen Sedimentationsverhalten heterotroph kultivierter *E. gracilis*-Zellen aufgetreten waren. Der Abstand des Rührers vom Boden betrug 50 mm.

Für die Messung des pH-Wertes wurde ein pH-Meter (EasyFerm Plus K8 325, Hamilton[®], USA), welches vor der *in situ*-Sterilisation mittels Zweipunktkalibrierung kalibriert wurde, verwendet. Die Messung der relativen Gelöstsauerstoffkonzentration erfolgte mittels eines pO₂-Sensors (InPro[®] 6000, Mettler-Toledo International Inc., Schweiz), welcher nach der Inokulation nach Erreichen eines konstanten Wertes mittels Einpunktkalibrierung auf 100 % kalibriert wurde. Für alle Kultivierungen wurde, wenn nicht anders angegeben, eine Temperatur von 28 °C, eine Rührerdrehfrequenz von 200 min⁻¹, ein Luftvolumenstrom von 0,2 vvm und ein Überdruck von 100 mbar gewählt. Der Überdruck wurde mittels eines Druckmessgerätes (43271.1, Bioengineering AG, Schweiz) geregelt.

Der Bioreaktor wurde vor jeder Kultivierung zusammen mit dem Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) ohne Substrat mittels Heißdampf *in-situ* sterilisiert. Zuvor wurde die Abluftstrecke und das Probenahmeventil für etwa 10 min bedampft. Nach Anlegen des

Berstschatzes wurde die Schrittkette für das Sterilisierprogramm, welches eine Temperatur von 121 °C bei einem Überdruck von 1 bar für 45 min gewährleistet, gestartet. Das Substrat, welches im vervollständigten Medium eine Konzentration von 22 g L⁻¹ D-(+)-Glucose-Monohydrat aufwies, wurde zehnfach konzentriert angesetzt, separat autoklaviert und nach Abkühlen auf einer Temperatur von < 60 °C mit der Vitaminlösung versehen. Nach Abkühlen des Fermenterinhalt, ebenfalls auf < 60 °C, wurde die Substrat-Vitamin-Lösung mittels einer Peristaltikpumpe zur Vervollständigung des Mediums hinzugefügt.

Die Inokulierung erfolgte mit 10 % (v/v) einer vier Tage alten, heterotroph gewonnenen Vorkultur unter Zuhilfenahme einer Peristaltikpumpe. Vor Kultivierungsbeginn wurde der Glaszylinder des Bioreaktors mit Alufolie lichtundurchlässig eingewickelt, um strikt heterotrophe Bedingungen zu gewährleisten. Die Probenahme zur Bestimmung der Biotrockenmasse-, Substrat- sowie der Produktkonzentration erfolgte über den Probenahmehahn. Zuvor wurde dieser für etwa 30 s bedampft. Ein Vorlauf von ca. 20 mL wurde verworfen. Nach der Entnahme wurde der Probenahmehahn erneut für 30 s bedampft. Die Proben wurden bis zur Analytik, bei der die Biotrockenmasse-, Paramylontrockenmasse-, α -Tocopherol- und Substratkonzentration zu je drei technischen Replika bestimmt wurde, bei 4 °C gelagert.

4.3.2 Quasikontinuierliche, heterotrophe Kultivierung im Rührkesselreaktor

Für die quasikontinuierliche Kultivierung von *E. gracilis* wurde der KLF-Rührkesselreaktor, wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, mit folgenden Modifikationen aufgebaut: Durch die Deckelplatte des Reaktors wurde ein auf die 2 L-Markierung verkürztes Steigrohr aus Edelstahl mit einem Innendurchmesser von 4 mm verschraubt. Über dieses verkürzte Steigrohr erfolgte der Ablauf, wodurch ein gleichbleibendes Arbeitsvolumen gewährleistet wurde. Der Ablauf wurde mittels einer Peristaltikpumpe mit einer Frequenz von 50 min⁻¹ in ein 50 L-Erntetank aus Kunststoff überführt. Aufgrund des geringen Volumenstroms erfolgte der Ablauf einmal stündlich für 10 min über die Prozessautomatik, da vor allem heterotroph gewonnene *E. gracilis*-Zellen infolge des hohen intrazellulären Gehaltes an Paramylongranula ein ausgeprägtes Sedimentationsverhalten zeigten. Bei sehr geringen Volumenströmen wären die Zellen innerhalb des Steigrohres sedimentiert, so dass ein Teil der Zellen im Reaktor verblieben wäre, was einen Konzentrierungseffekt zur Folge gehabt hätte. Als Zulaufmedium wurde ebenfalls das Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) mit 22 g L⁻¹ D-(+)-Glucose-Monohydrat eingesetzt. Auch der Zulauf wurde über die Prozessautomatik über eine Peristaltikpumpe gesteuert und erfolgte ebenfalls einmal stündlich über ein Stutzen in der Deckelplatte. Eine exakte, kontinuierliche Zudosierung an frischem Medium konnte mittels der verwendeten Peristaltikpumpen nicht gewährleistet

werden, so dass der Zulauf bei einer Frequenz von 10 min^{-1} über die Zeit gesteuert wurde. Um die Menge an zudosiertem Medium zu dokumentieren, wurde das Medium aus einem 50 L-Vorlagetank aus Edelstahl manuell über eine Peristaltikpumpe in eine auf einer Waage platzierten 2 L-Zulaufflasche aus Borosilikat befördert. Diese Waage wurde mit dem Prozessleitsystem verbunden, welches die Abnahme des Volumens als Gewicht aufzeichnete. Dabei wurde angenommen, dass das Medium eine Dichte von 1 g mL^{-1} aufwies. Der Zulauf wurde über eine Schrittkette in der exponentiellen Phase gestartet. Zuvor wurde der Volumenstrom des Zulaufs bei der gewählten Frequenz der Peristaltikpumpe von 10 min^{-1} gravimetrisch bestimmt und die Schrittkette entsprechend der gewählten Raumgeschwindigkeit programmiert.

4.3.3 Quasikontinuierliche, sequenziell heterotrophe und photoheterotrophe Kultivierung im Rührkessel- und Blasensäulenphotobioreaktor

Bei der quasikontinuierlichen, sequenziell heterotrophen und photoheterotrophen Kultivierung erfolgte die heterotrophe Stufe im KLF-Rührkessel- und die photoheterotrophe Stufe in einer Blasensäulenphotobioreaktorkaskade, welche im Zuge dieser Arbeit vom Verfasser entwickelt wurde. Die heterotrophe Kultivierung erfolgte gemäß der Abschnitte 4.3.1 und 4.3.2. Der Ablauf erfolgte dabei nicht in den Erntetank, sondern in die erste von insgesamt vier hintereinander geschalteten Blasensäulen. Diese dienten als Photobioreaktoren, wobei die Illumination einer erhöhten Induktion der α -Tocopherolsynthese diene. Im weiteren Verlauf der Kultivierung wurden die Zellen sukzessive durch alle vier Blasensäulen geleitet. Eine schematische Darstellung der technischen Umsetzung ist in Abbildung 4.3 gezeigt.

Jede Blasensäule bestand aus einer Borosilikatglas (Spezialanfertigung der glastechnischen Werkstatt der Universität Bielefeld) und wies einen Innendurchmesser von 7,5 cm und eine Höhe von 60 cm auf. Das Arbeitsvolumen betrug 2 L. Jede Säule wurde mit einem Schraubdeckel mit einem GL 45-Gewinde versehen, welcher drei ca. 5 cm lange und 4 mm breite Rohre aus Edelstahl aufwies, wodurch die Begasung und die Überführung der Kulturbrühe in die darauffolgende Blasensäule bzw. in den Erntetank realisiert wurde. Diese modifizierten Deckel wurden von der mechanischen Werkstatt der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld angefertigt. Die Begasung erfolgte mit $dd\text{H}_2\text{O}$ -vorgesättigter Luft mit einem Volumenstrom von etwa 0,1 vvm pro Säule über eine Membranpumpe. Der Einlass der Begasung war außerdem mit einem Sterilfilter (Midisart[®]-2000, $0,2 \mu\text{m}$, Sartorius AG, Deutschland) versehen. Im Innern der Blasensäule wurde die Zuluft mit einem 5 x 2 mm Silikonschlauch bis ca. 4 cm über dem Reaktorboden geleitet. Die Regelung der Volumenströme der einzelnen Blasensäulen erfolgte manuell über Schraubklemmen.

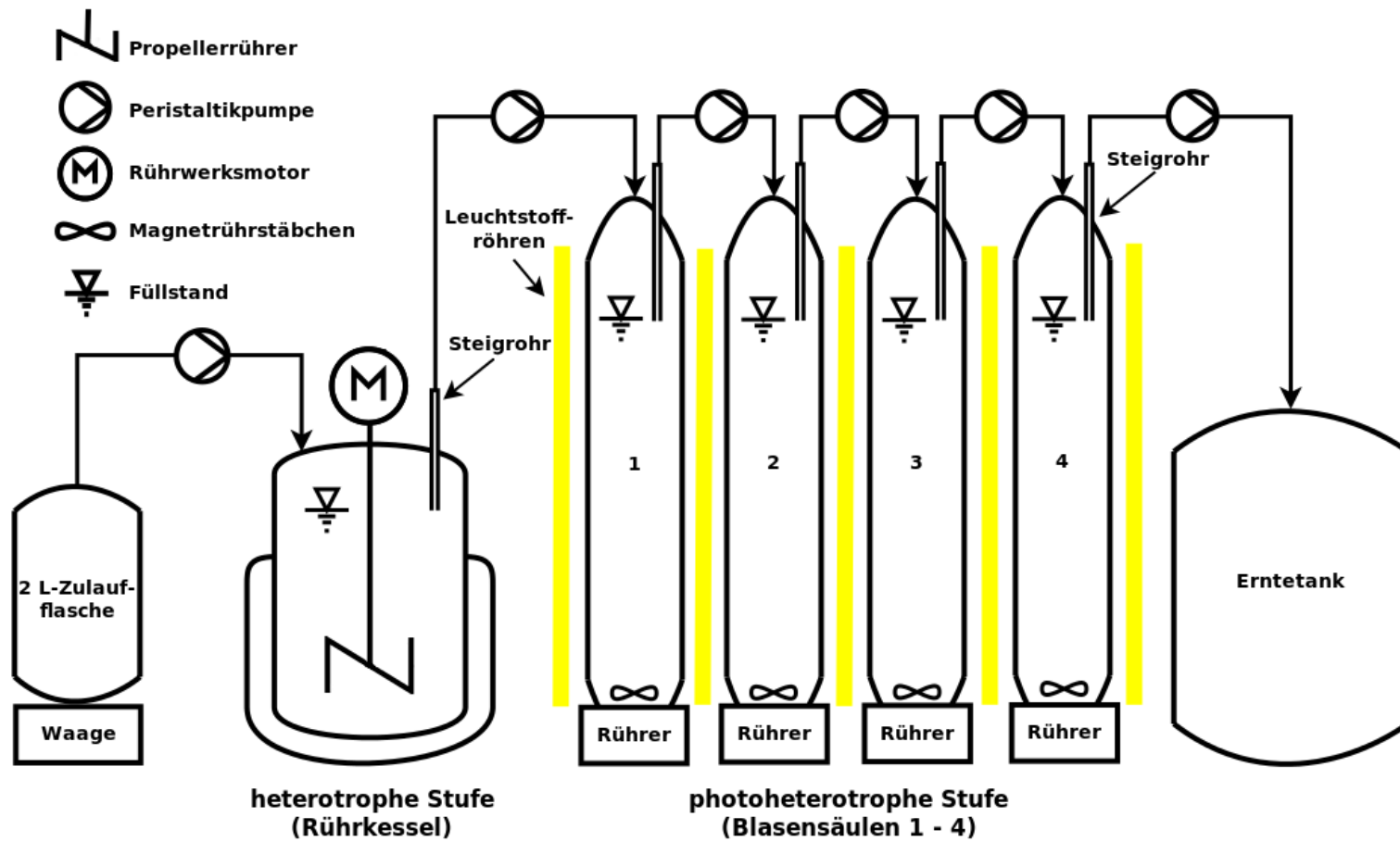


Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau der quasikontinuierlichen, sequenziell heterotrophen und photoheterotrophen Kultivierung im Rührkessel- und Blasensäulen-photobioreaktor, welcher als Kaskade betrieben wurde.

Um eine Agglomeration der Zellen am Reaktorboden zu vermeiden, wurde jeder Reaktor zusätzlich mit einem 54 mm langen, hantelförmigen Magnetrührstäbchen versehen. Ein Magnetrührer, welcher unterhalb eines jeden Reaktors platziert wurde, sorgte mit einer Frequenz von etwa 150 min^{-1} für die Durchmischung der Kulturbrühe am Reaktorboden. Die Sterilisation der zusammgebauten und durch 5 x 2 mm Silikonschläuche miteinander verbundenen Blasensäulen erfolgte in einem Autoklaven für 45 min bei $121 \text{ }^\circ\text{C}$. Anschließend wurden diese mit dem verkürzten Steigrohr, über welchem der Ablauf aus dem KLF-Kleinlaborfermenter realisiert wurde, verbunden.

Die Illumination der Blasensäulen erfolgte von zwei Seiten mittels Leuchtstoffröhren (Hagen Aqua-Glo T8, 20 W, Deutschland) mit einem Lichtfluss von etwa $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bei einer maximalen Schichtdicke der Suspension von 3,25 cm. Der Abstand zwischen Emitter und Reaktor betrug 1,5 cm. Ein Emissionsspektrum dieser Leuchtmittel ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Die Temperatur der Kulturbrühe wurde nicht geregelt und betrug etwa 26 bis $29 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Bestimmung der Temperatur erfolgte stichprobenartig unmittelbar nach der Entnahme einer Probe.

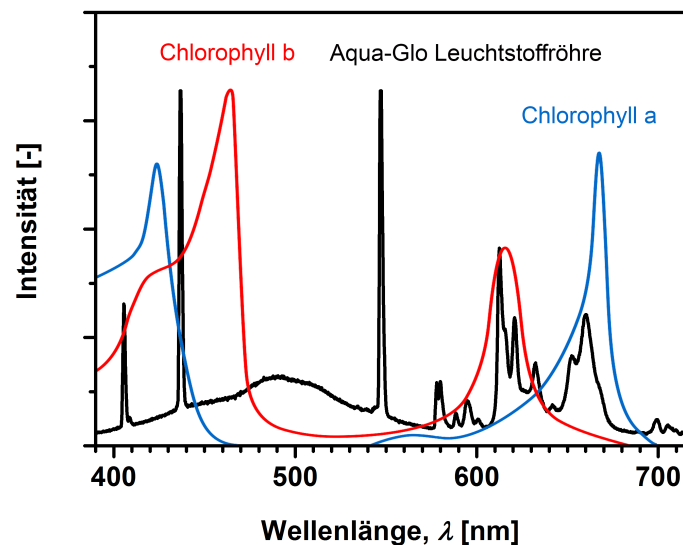


Abbildung 4.4: Emissionsspektrum der Hagen Aqua-Glo T8-Leuchtstoffröhre (20 W), Deutschland und das Absorptionsspektrum von Chlorophyll a und b nach Campbell *et al.* (2006).

Die Überführung der Kultur aus der heterotrophen Stufe in die erste Blasensäule erfolgte, wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, stündlich. Die Überführung der Kultur von einer Blasensäule in die Nächste erfolgte aufgrund technischer Gegebenheiten einmal täglich manuell unter Verwendung einer Peristaltikpumpe. Die Probenahme aus den einzelnen Blasensäulen erfolgte mittels 25 mL-Einwegspritzen über ein T-Stück in einem 48 h-Rhythmus.

4.3.4 Repetitive, photoautotrophe Satzkultivierung im Blasensäulenphotobioreaktor

Die repetitive, photoautotrophe Satzkultivierung erfolgte in einem 25 L-Blasensäulenphotobioreaktor in einem Arbeitsvolumen von 20 L im Basalmedium nach Cramer & Myers (1952). Der Reaktor bestand aus einem Glaszylinder mit einer Höhe von 130 cm und einem Innendurchmesser von 20 cm. Die Temperierung der Kulturbrühe erfolgte über einen 15 cm breiten und 119 cm langen Kühlfinger aus Edelstahl, welcher zentral im Reaktor angeordnet war. Die Schichtdicke der Kulturbrühe betrug 2,5 cm. Ein Umwälzthermostat (Julabo GmbH, Deutschland) sorgte für eine gleichmäßige Temperatur von 28 °C. Die Illumination erfolgte mittels 56 20-W-Decostar-Halogenstrahlern (OSRAM, Deutschland) von außen, welche einen Lichtfluss von etwa $1.250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in der Mitte des Lichtkegels aufwiesen. Das Emissionsspektrum eines Halogenstrahlers ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

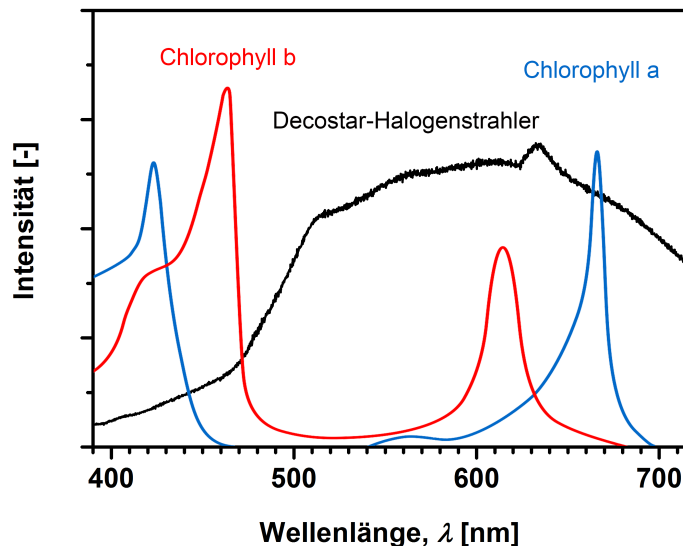


Abbildung 4.5: Emissionsspektrum des Decostar-Halogenstrahlers, OSRAM, Deutschland und das Absorptionsspektrum von Chlorophyll a und b nach Campbell *et al.* (2006).

Die Begasung erfolgte über einen Begasungsring aus Edelstahl am Boden des Reaktors mit einem Volumenstrom von ca. 0,2 vvm mit 5 % (*v/v*) CO₂ in Luft, wobei kein Überdruck angelegt wurde. Der pH-Wert wurde nicht aufgezeichnet und stichprobenartig *offline* bestimmt. Eine fotografische Aufnahme dieses Blasensäulenphotobioreaktors im Betrieb ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

Die Inokulierung erfolgte mit 10 % (*v/v*) einer vier Tage alten, heterotroph gewonnenen Vorkultur. Die Entnahme von 10 mL Probe zur Bestimmung der Biotrockenmasse- und der α -Tocopherolkonzentration zu je drei Replika erfolgte täglich manuell über eine Öffnung in der Deckelplatte mit einer Pipette. Die Proben wurden bis zur Analytik bei 4 °C gelagert.

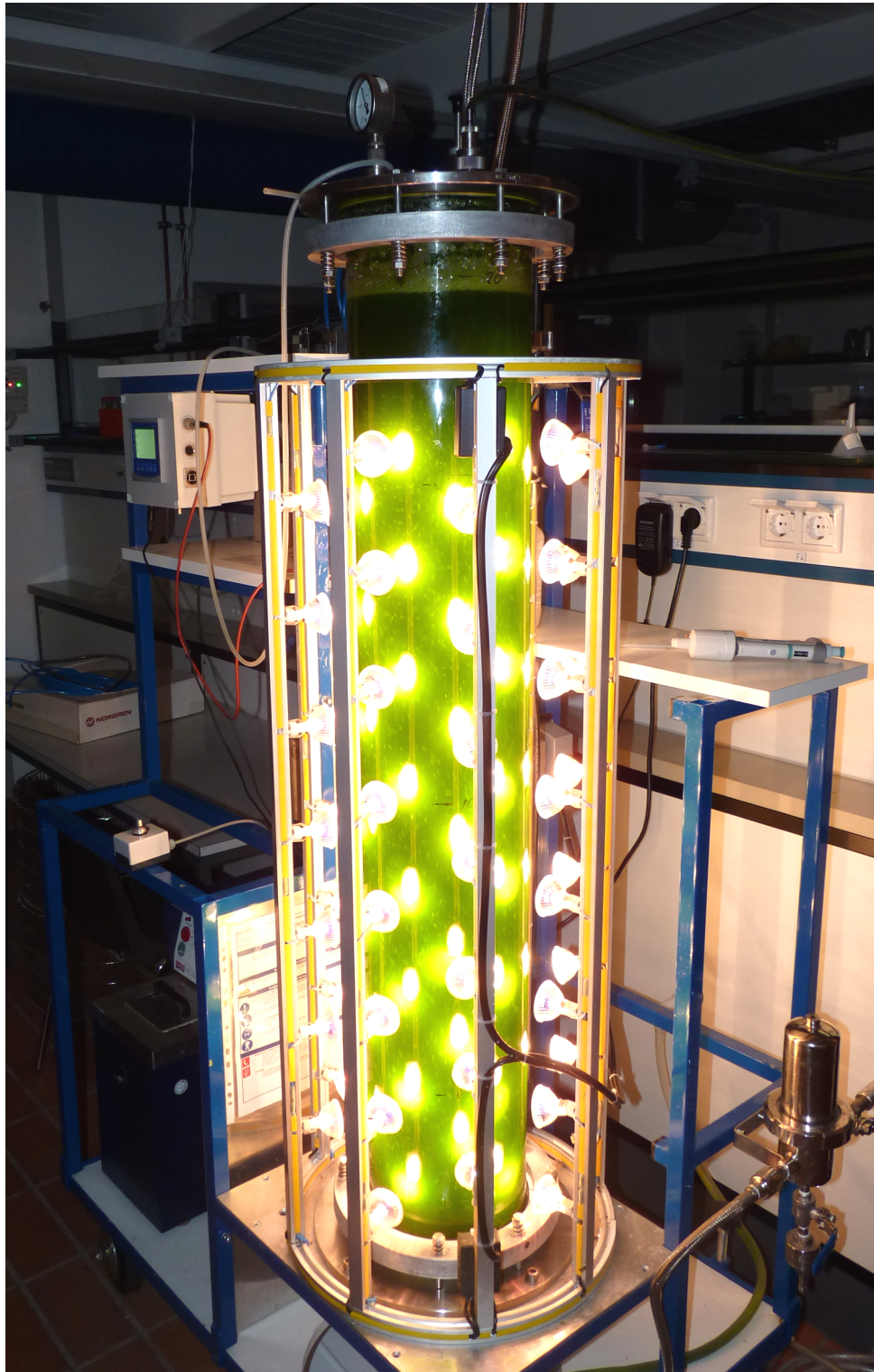


Abbildung 4.6: Fotografische Aufnahme des 25 L-Blasensäulenphotobioreaktors mit einer Mikroalgenkultur im Betrieb. Mit freundlicher Genehmigung von Viktor Klassen.

Bei jeder Repetition dienten ca. 10 bis 33 % (v/v) der Kultur als neues Inokulum. Dazu wurde jeweils der Großteil der Kultur über einen Kugelhahn in der Bodenplatte abgelassen und das exakte Volumen bestimmt. Daraufhin wurde der Reaktor auf ein finales Volumen von 20 L mit frischem Basalmedium aufgefüllt. Die Fermentation erfolgte ohne vorherige Sterilisation des Reaktors und des Mediums, da kein Heißdampf zur Sterilisation zur Verfügung stand und außerdem ein Prozess ohne axenische Bedingungen untersucht werden sollte.

4.3.5 Diskontinuierliche Biogasproduktion im Satzreaktor

Die quantitative Bestimmung des Gasbildungspotentials der Substrate wurde diskontinuierlich nach DIN EN ISO 11734 (VDI, 2004) durchgeführt. Die Fermentation erfolgte unter mesophilen Bedingungen bei $38\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ in 260 mL-Laborglasflaschen, welche als Satzreaktor dienten. Diese wiesen eine Öffnung von 14 mm auf, welche mit einem Septum, einem Gummistopfen aus Naturkautschuk mit einem Durchmesser von 14,9 mm (Saint Gobain Performance Plastics, Frankreich), gasdicht verschlossen wurden. Jeder Ansatz wurde dabei als Triplikat durchgeführt. Der Klärschlamm wurde von einer lokalen Kläranlage (Stadtwerke Bielefeld GmbH, Bielefeld-Heepen, Deutschland) bezogen. Die Lagerung und die Behandlung des Klärschlammes erfolgte nach DIN 38414-8 (2006).

Jeder Satzreaktor wurde mit 60 mL Impfschlamm und 200 mg frischem Substrat versehen, wobei sich die eingewogene Masse auf die organische Trockensubstanz bezog. Dazu wurden die *E. gracilis*-Zellen durch Zentrifugation bei 7500 g geerntet, zweimal mit etwa dem zehnfachen Volumen des Zellpellets in ddH_2O resuspendiert und erneut bei 7500 g zentrifugiert. Die Überstände wurde dabei jedes Mal verworfen. Im Anschluss der Waschschritte wurde das Substrat auf etwa 100 g L^{-1} aufkonzentriert. Das Waschen der Zellen diente der Entfernung eventueller Glucoseresste, um eine Verfälschung der Messergebnisse durch zusätzliches Substrat zu vermeiden.

Der Luftsauerstoff, welcher zu Beginn in den Satzreaktoren vorhanden war, wurde mit mindestens 1 L Argon aus dem Kopfraum eines jeden Satzreaktors verdrängt, um inhibitorische Effekte auf die obligat anaeroben Mikroorganismen zu vermeiden. Um eine konstante Temperatur zu gewährleisten, wurden die Satzreaktoren in einem temperierbaren Wasserbad oder Brutschrank inkubiert. Die Durchmischung erfolgte manuell durch mehrfaches Schwenken der einzelnen Satzreaktoren vor jeder Messung.

Die Biogasbildung wurde mittels eines Manometers (BMP-Testsystem 3150, WAL, Deutschland) direkt im Kopfraum des Satzreaktors gemessen. Dazu wurde das Septum mit einer dünnen Kanüle (Sterican[®] 0,4 x 20 mm, B. Braun, Deutschland) durchstoßen und der Absolutdruck innerhalb des Satzreaktors gemessen. Der Gasdruck im Inneren der Satzreaktoren korrelierte mit der Menge an gebildetem Gas. Für die Massenbilanz

wurde der Biogasertrag des Impfschlammes ohne zusätzliches Substrat ermittelt. Zur Kontrolle der Qualität des Impfschlammes und um unterschiedliche Messungen vergleichen zu können, wurde außerdem ein Ansatz mit 200 mg Avicel® (Mikrokristalline Cellulose für die Säulenchromatographie, Merck, Deutschland), wie vom Verein Deutscher Ingenieure (2004) vorgeschlagen, zusätzlich vermessen. Aufgrund der hohen Reinheit dieser Substanz entfielen die beiden Waschschrirte für dieses Substrat, welches im trockenen Zustand eingesetzt wurde. Für die Berechnung des Volumens des trockenen Gases im Normalzustand (V_0^{tr}) wurde folgende Gleichung verwendet:

$$V_0^{tr} = V \cdot \frac{(p - p_w) \cdot T_0}{p_0 \cdot T} \quad (4.2)$$

dabei ist V das Volumen des Kopfraums des Satzreaktors (in mL), p der Druck der Gasphase zum Zeitpunkt der Ablesung (in mbar), p_w der Dampfdruck des Wassers als Funktion der Temperatur des umgebenden Raumes (in mbar), T_0 die Normaltemperatur (in K), p_0 der Normaldruck (in mbar) und T die Temperatur des Biogases bzw. des umgebenden Raumes (in K).

Der Trend des Biogasertrags wurde als die Differenz zwischen den Volumina der gesamten (V_t) und der endogenen (V_e) Gasproduktion berechnet und mit der Ausgangsmenge an Substrat (m_S) dividiert:

$$V = \frac{V_t - V_e}{m_S} \quad (4.3)$$

4.3.6 Kontinuierliche Biogasproduktion im Rührkesselreaktor

Die kontinuierlichen Versuche zur Biogasproduktion erfolgten nach dem Prinzip einer volumetrischen Methode in einem kontinuierlich durchmischten Rührkesselreaktor mit einem Volumen von 3,9 L, wobei das Arbeitsvolumen aufgrund der hohen benötigten Substratmenge 1 L betrug. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Der Glaskorpus des Rührkesselreaktors (Normag Labor- und Prozesstechnik GmbH, Deutschland) wies einen Innendurchmesser von 147 mm und eine Höhe von 170 mm auf. An der Ober- und Unterseite befand sich jeweils ein DN-150-Laborplanflansch ohne Nut. Mittels DN-150-Schnellverschlüsse aus Edelstahl (Normag Labor- und Prozesstechnik GmbH, Deutschland) wurde der Glaskorpus an die Boden- und Deckelplatte aus Edelstahl (Eigenbau der mechanischen Werkstatt der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld), welche eine Nut aufwies und mit jeweils einer DN-150-O-Ring-Dichtung aus Silikon (Normag Labor- und Prozesstechnik GmbH, Deutschland), gasdicht befestigt.

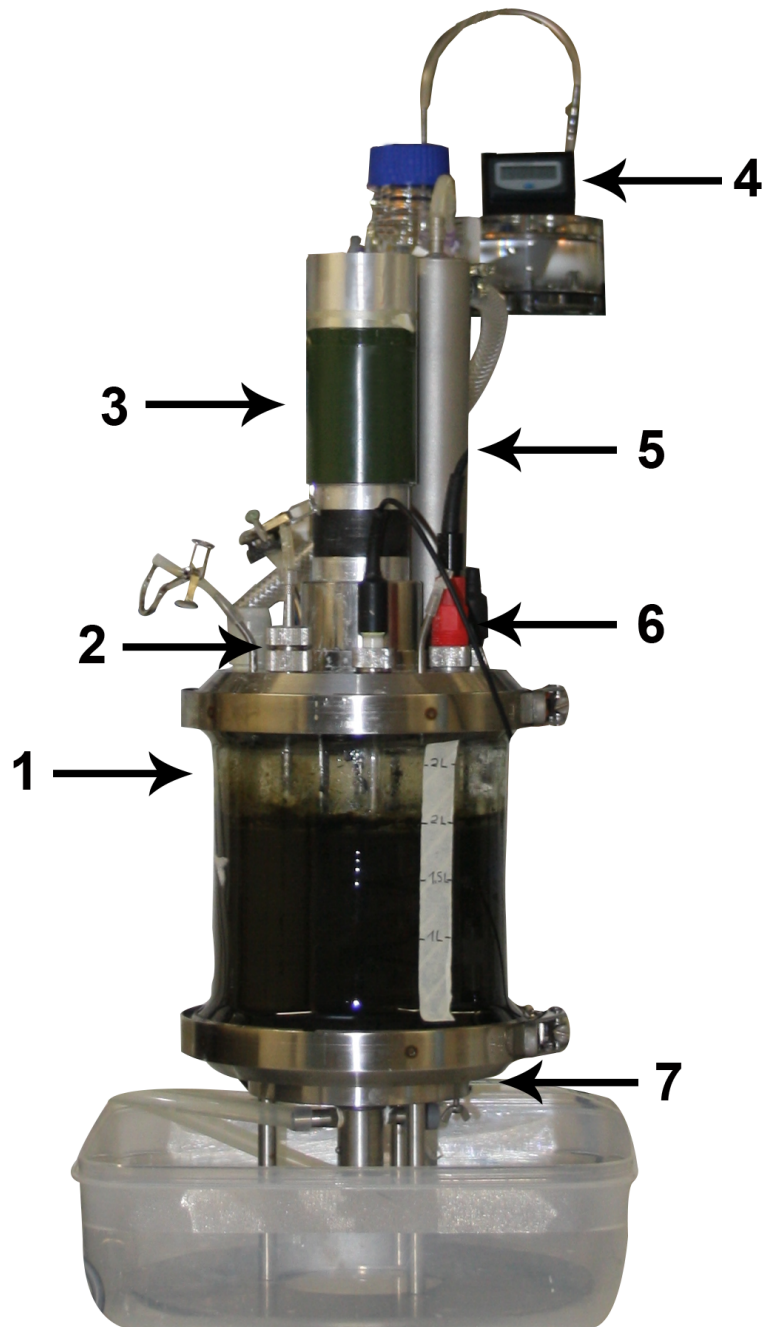


Abbildung 4.7: Versuchsaufbau der kontinuierlichen Gärtesteinheit mit 3,7 L-Rührkesselreaktor. 1. Reaktor, 2. Stutzen für Zufütterung und Probenahme, 3. Rührwerksmotor, 4. Gaszähler (MilliGascounter[®]), 5. Gasleitung mit Rückflusskühler, 6. Elektroden (pH und Redox), 7. Heizung.

Der Reaktor verfügte über ein Rührwerk, dessen Welle über eine Magnetkupplung mit einem Rührwerksmotor (Planetengetriebe GP 52, Maxon Motor AG, Schweiz) verbunden war. Über einen Frequenzregler wurde die Drehfrequenz eingestellt. Als Rührorgan diente ein Internrührer (Ekato Holding GmbH, Deutschland) mit einem Durchmesser von 111 mm, welcher mit einer Frequenz von 200 min^{-1} für eine kontinuierliche Durchmischung des Reaktorinhalts sorgte und ca. 10 mm über der Bodenplatte montiert wurde. Vier Stromstörer, welche eine Breite von 10 mm aufwiesen, verhinderten, dass der Fermenterinhalt aufgrund der Trägheit des Mediums mitrotierte. Das entstandene Biogas wurde praktisch drucklos durch einen Rückflusskühler (Eigenbau der mechanischen Werkstatt der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld) befördert und passierte als nahezu trockenes Gas über einen $5 \times 2 \text{ mm}$ Silikonschlauch einen MilliGascounter[®] (MGC-1 V 3.0, 3,2 mL, Dr. Ing Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG, Deutschland), welcher nach dem Prinzip eines Kippzählers mit einem Volumen von 3,2 mL arbeitete. Die entstandene Gasmenge wurde mittels des Programms RIGAMO (Dr. Ing Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG, Deutschland) visualisiert und aufgezeichnet.

Der Reaktor war mit M20x1,5- sowie PG 13,5-Gewindebohrungen in der Deckelplatte versehen, durch die der Rückflusskühler, Temperaturfühler, die pH- und Redox-Einstabmessketten sowie ein Steigrohr zur Probenahme und Substratzugabe gasdicht in den Fermenterinhalt geführt wurden. Zur Messung des pH-Wertes wurde eine Xerolyt[®] Einstabmesskette (405-DPAS, Mettler-Toledo International Inc., Schweiz) und für den Redoxwert die kombinierten Redox-Elektroden (PT-4805, Mettler-Toledo International Inc., Schweiz) eingesetzt. Die Beheizung erfolgte über einen 50 W-Heizstab, welcher in einer Bohrung in der Bodenplatte eingelassen war. Die Steuerung der Heizung erfolgt über ein Prozessleitsystem (IKS Aquastar, IKS Computersysteme GmbH, Deutschland). Die Fermentation erfolgte mesophil bei $38 \pm 1 \text{ °C}$.

Zunächst wurde der Fermenter nach dem Zusammenbau und nach Zugabe des Impfschlammes auf Gasdichtigkeit überprüft. Dazu wurde mittels einer Luftpumpe oder 100 mL-Spritze ein Überdruck von etwa 100 mbar angelegt und mittels Manometer (BMP-Testsystem 3150, WAL, Deutschland) auf Dichtheit überprüft. Daraufhin wurde der Rührer auf eine Frequenz von 200 min^{-1} und die Temperatur auf 38 °C eingestellt und der Impfschlamm ausfaulen gelassen, bis keine Gasproduktion mehr zu verzeichnen war. Vor der Substratzugabe wurde dem Fermenter das gleiche Volumen an Schlamm entnommen, welches auch das Substrat aufwies. Somit wurde ein annähernd konstantes Volumen während der Fermentation gewährleistet. Die Probenahme erfolgte unmittelbar vor der Substratzufuhr unter Berücksichtigung des Volumens des Zulaufs über ein Steigrohr aus Edelstahl, welches durch die Deckelplatte in den Schlamm führte und einen Innendurchmesser von 4 mm aufwies. Am oberen Ende des Steigrohres war ein ca. 5 cm langer Silikonschlauch

befestigt, welcher während des Betriebs mit einer Schlauchklemme verschlossen wurde und über welchem die Probenahme und die Substratzufuhr mittels einer 25 mL-Einwegspritze realisiert wurde.

5 Ergebnisse & Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Fragestellungen bearbeitet. In dem ersten Teil dieses Kapitels werden Daten bezüglich der Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen gezeigt, welche mittels des Produktionsorganismus *E. gracilis* Z bei unterschiedlichen Kultivierungsmodi gewonnen werden konnten, wobei der Fokus auf die Erhöhung der Produktivität gelegt wurde. Im zweiten Teil hingegen wurde *E. gracilis*-Biomasse als Substrat für die Biogasgewinnung qualitativ und quantitativ untersucht. Zur Veranschaulichung der erhobenen Daten werden teilweise Graphen gezeigt, deren Messpunkte mit geraden Linien verbunden sind. Diese dienen einer besseren Übersicht und stellen keine tatsächlichen Verläufe dar.

5.1 Gewinnung von *E. gracilis*-Biomasse sowie der Hochwertprodukte Paramylon und α -Tocopherol

Den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen bezüglich der Kultivierungen von *E. gracilis* sind etliche Versuche vorausgegangen, in denen verschiedene Medien und Supplemente sowie deren Konzentrationen getestet wurden. Obwohl unter der Verwendung bestimmter Medien bzw. Kohlenstoffquellen etwas höhere Biotrockenmassekonzentrationen und Produktselektivitäten erzielt werden konnten, wurde für alle Kultivierungen das Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) verwendet, welches im Fall einer heterotrophen oder photoheterotrophen Kultivierung mit 22 g L^{-1} D-(+)-Glucose-Monohydrat supplementiert wurde. Dieses Medium bietet einige Vorteile: Zum einen handelt es sich um ein vollsynthetisches Medium, bei dem im Gegensatz zu Komplexmedien die Zusammensetzung vollständig definiert ist. Dieses Medium besteht nur aus einer geringen Anzahl an Salzen, deren Gesamteinwaage nur ca. $3,4 \text{ g L}^{-1}$ beträgt, weshalb es sehr kostengünstig ist. Zum anderen wurde dieses Medium in Veröffentlichungen häufiger aufgeführt, so dass Vergleiche der erhobenen Daten mit denen aus der Literatur erleichtert werden. Um die erzielten Ergebnisse der Kultivierungsmodi heterotroph, photoheterotroph und photoautotroph besser untereinander vergleichen zu können, wurde jeweils das gleiche Medium und eine auf die gleiche Art und Weise gewonnene Vorkultur eingesetzt. Obwohl *E. gracilis* in der Lage ist eine ganze Bandbreite an Kohlenstoffquellen zu metabolisieren, wurde Glucose als or-

ganische Kohlenstoffquelle eingesetzt, weil Glucose als Massengut im Vergleich zu anderen Kohlenstoffquellen günstig ist und in vorangegangenen Experimenten zufriedenstellende und replizierbare Ergebnisse mit diesem Supplement erzielt werden konnten.

In diesem Ergebnisteil wurde untersucht, welche Biotrockenmassekonzentrationen unter den gewählten Kultivierungsbedingungen erzielt werden können und welche Produktkonzentrationen dabei zu erwarten sind. Zunächst wurden Satzkulturen im Schüttelkolbenmaßstab bei verschiedenen Kultivierungsmodi kultiviert und auf Produktkonzentrationen und -selektivitäten untersucht. Anschließend wurden satzweise und quasikontinuierliche Kultivierungen in Rührkessel- und in Blasensäulenphotobioreaktoren angewandt, um eine höhere Raum-Zeit-Ausbeute zu gewährleisten. Für die Steigerung der Produktivität und zur Gewinnung einer größeren Menge an photoautotroph gewonnener Biomasse wurde eine repetitive Satzkultivierung etabliert.

5.1.1 Untersuchungen bezüglich des Einflusses verschiedener Kultivierungsmodi auf Biotrockenmassekonzentration und Produktbildung im Schüttelkolbenmaßstab

Ziel & Hintergrund

Dieser Abschnitt zeigt den Einfluss des Kultivierungsmodus auf den Phänotyp und auf die Biotrockenmassekonzentration sowie auf die Produktbildung in Bezug auf die Hochwertprodukte Paramylon und α -Tocopherol. Wie aus der Literatur hinreichend bekannt war, sind die Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen je nach eingesetzten Kultivierungsmodus sehr unterschiedlich (Cramer & Myers, 1952; Ogbonna, 2009; Schwarzahns *et al.*, 2014). Zu erwarten war, dass bei einer Kultivierung mit einem organischen Kohlenstoffsupplement sowohl die Biotrockenmassekonzentration als auch Selektivität des Hochwertproduktes Paramylon weit höher ist, als wenn die Gewinnung ausschließlich unter Illumination und erhöhtem CO₂-Anteil in der Luft erfolgt (Calvayrac *et al.*, 1981; Šantek *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu wird eine höhere Selektivität des Hochwertproduktes α -Tocopherol bei photoautotropher Kultivierung erwartet, als wenn die Gewinnung unter Lichtausschluss und einer adäquaten Kohlenstoffquelle stattfindet (Kusmic *et al.*, 1998; Ogbonna, 2009). Da dieses Antioxidans ebenfalls unter Lichtausschluss gebildet wird und bei heterotropher Kultivierung weit höhere Biotrockenmassekonzentrationen generiert werden können, war zu erwarten, dass die α -Tocopherolkonzentration auch bei heterotropher Kultivierung relativ hoch ist, auch wenn die α -Tocopherolselektivität im Vergleich zur photoautotrophen Gewinnung deutlich geringer ist. Im Falle einer photoheterotrophen Betriebsweise kann davon ausgegangen werden, dass sowohl hohe Biotrockenmasse- als auch hohe Produktkonzentrationen erzielt werden können. Aufgrund der Tatsache, dass Paramylon hauptsächlich

bei Energieüberschuss gebildet wird (Cook, 1963; Barras & Stone, 1968; Buetow, 1989; Šantek *et al.*, 2009), war anzunehmen, dass die Paramylonselektivität im photoautotrophen Kultivierungsmodus erst im zunehmenden Alter der Kultur gesteigert wird.

Um die Effekte des Alters der Kultur und des Kultivierungsmodus auf die α -Tocopherol- und Paramylonkonzentration sowie den Biogasertrag bei der fermentativen Gewinnung von Biogas aus *E. gracilis*-Biomasse besser vergleichen zu können, wurde *E. gracilis* heterotroph, photoheterotroph und photoautotroph in Schüttelkolben mit Arbeitsvolumina von 100 mL in Parallelansätzen zu insgesamt jeweils 1 L, 2 L bzw. 4 L kultiviert. Nach vier, sieben und zehn Tagen wurde für jeden Kultivierungsmodus jeweils ein Teil der Parallelansätze geerntet. Dies entsprach in etwa der spätexponentiellen und stationären Phase sowie der beginnenden Absterbephase. Ebenfalls aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden sämtliche Kulturen mit der gleichen, heterotroph gewonnenen Vorkultur inokuliert, welche ein Alter von vier Tagen aufwies. Die weit auseinanderliegenden Erntezeitpunkte wurden so gewählt, dass erstens genügend Biomasse für die gesamte Analytik inklusive der Biogasversuche vorhanden war und zweitens davon ausgegangen werden konnte, dass sich die Biomasse in Bezug auf die Produktselektivitäten auch innerhalb der Modi unterscheidet. Aufgrund der großen Menge an benötigten Biomassen und der begrenzten Anzahl an Satzreaktoren wurden nur diese drei Zeitpunkte untersucht.

Für jeden Zeitpunkt und Modus wurde jeweils der gesamte Schüttelkolbeninhalt geerntet und vereint, die Biotrockenmasse-, Glucose-, Paramylon- und α -Tocopherolkonzentration bestimmt, die Selektivitäten berechnet und der Biogasertrag und die Gaszusammensetzung beim Einsatz der Biomasse als Substrat für die Biogasgewinnung ermittelt. Alle Untersuchungen erfolgten daher für jeden Zeitpunkt und Modus mit der selben Biomasse. Die Ergebnisse hinsichtlich der Biogasgewinnung mit *E. gracilis*-Biomasse als Substrat sind in Abschnitt 5.2.1 dargestellt.

5.1.1.1 Einfluss verschiedener Kultivierungsmodi auf den Phänotyp von *E. gracilis*

In Abhängigkeit von dem angewandten Kultivierungsmodus unterschied sich der Phänotyp von *E. gracilis* zum Teil extrem, was auch mithilfe eines Lichtmikroskops beobachtet werden konnte. Abbildung 5.1 zeigt phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von photoautotroph, photoheterotroph und heterotroph gewonnenen *E. gracilis*-Zellen nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen. Jene Zellen, welche in Abwesenheit einer organischen Kohlenstoffquelle unter Illumination und CO₂-angereicherter Luft kultiviert wurden, (Abb. 5.1 (a)) wiesen einen spindelförmigen Habitus auf, beinhalteten eine große Anzahl Chloroplasten und erheblich weniger Paramylongranula als Zellen, welche in Gegenwart einer organischen Kohlenstoffquelle kultiviert wurden (Abb. 5.1 (b) und (c)). Wurden die Zellen in Abwesenheit von Licht kultiviert, bildeten diese keine Chloroplasten aus

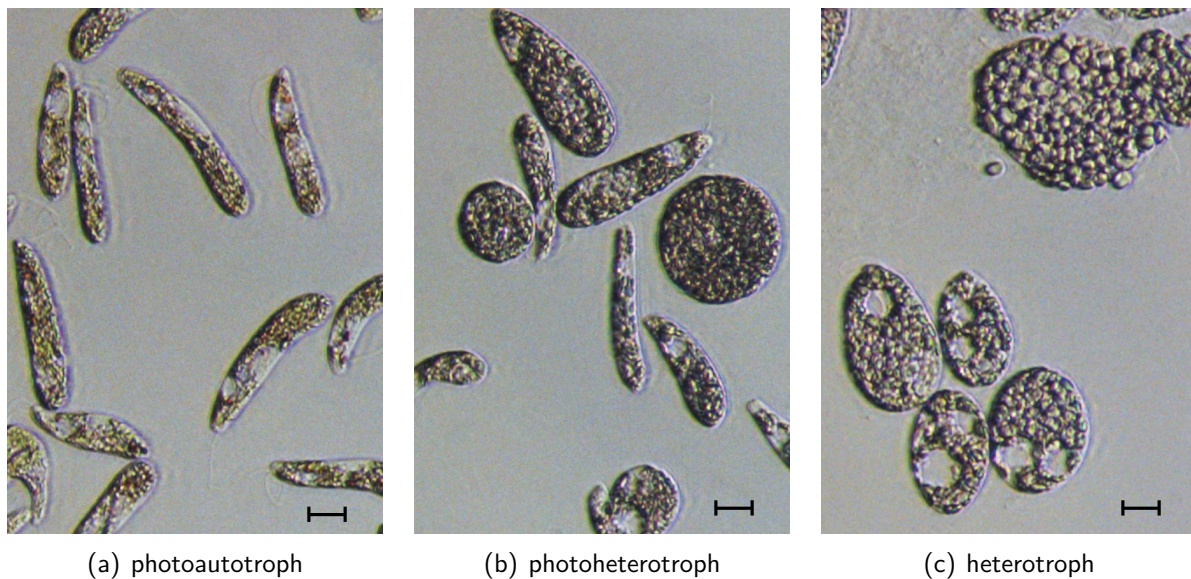


Abbildung 5.1: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von photoautotroph (a), photoheterotroph (b) und heterotroph (c) gewonnenen *E. gracilis*-Zellen nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen. Die Kultivierung erfolgte gemäß Abschnitt 4.1.3 im Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) mit bzw. ohne 20 g L^{-1} Glucose. Der Lichtfluss bei photoautotropher und photoheterotropher Kultivierung betrug ca. $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Vergrößerung ist 200-fach. Die Maßstabsbalken repräsentieren eine Länge von $10 \mu\text{m}$.

und erschienen gelblich (Abb. 5.1 (c)). Der auffälligste Unterschied lag jedoch in der erhöhten Akkumulation von Paramylon, was dazu führte, dass die Zellen bei diesen Kultivierungsmodi eine ovale bis rundliche Form aufwiesen. Auffällig war auch, dass in der photoheterotroph gewonnenen *E. gracilis*-Kultur beide Extremformen der Phänotypen auftraten (Abb. 5.1 (b)). Diese phänotypischen Unterschiede lagen nicht nur unterschiedliche Produktkonzentrationen, sondern auch unterschiedliche zu erwartenden Biogasenerträge und Biogaszusammensetzungen nahe, wenn die Biomasse als Substrat für die Biogasgewinnung eingesetzt wird. Eine vermehrte Einlagerung von Paramylon dürfte zum Beispiel zu unterschiedlichen C/N-Verhältnissen in der Biomassezusammensetzung führen, da Paramylon als Speicherpolysaccharid keinen Stickstoff enthält. Ergebnisse bezüglich der Unterschiede der elementaren Zusammensetzung der photoautotroph, photoheterotroph und heterotroph gewonnenen Biomasse sind in Abschnitt 5.2.3 gezeigt.

5.1.1.2 Einfluss verschiedener Kultivierungsmodi auf die Biotrockenmassekonzentration

Abbildung 5.2 zeigt den Verlauf der Biotrockenmasse- und der Glucosekonzentration über einen Kultivierungszeitraum von zehn Tagen. Die heterotroph gewonnenen Zellen zeigten die größte Zunahme an Biomasse. Trotz identischer initialer Glucosekonzentration von 20 g L^{-1} zeigten die photoheterotroph gewonnenen Zellen eine langsamere Wachstumsgeschwindigkeit und erreichten geringere Biotrockenmassekonzentrationen. Zudem

betrug die Glucosekonzentration in der photoheterotrophen Kultur nach einer zehntägigen Kultivierungsdauer noch $2,6 \text{ g L}^{-1}$. Das Substrat der heterotrophen Kultur war bereits nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen nahezu vollständig verbraucht und wies zu diesem Zeitpunkt eine Konzentration von $0,36 \text{ g L}^{-1}$ auf. Die höchsten Biotrockenmassekonzentrationen beider Kulturen wurden nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen mit Werten von $12,3 \text{ g L}^{-1}$ für die heterotroph bzw. $7,3 \text{ g L}^{-1}$ für die photoheterotroph gewonnene Kultur erreicht. Der höchste Ausbeutekoeffizient ($Y_{X/S}$) betrug $0,61$ für die heterotroph und $0,36$ für die photoheterotroph gewonnene Kultur. Nach diesem Zeitpunkt zeigten die Biotrockenmassekonzentrationen beider Kulturen einen Negativtrend. Dieser war als Resultat einer Zelllyse einerseits und des Erhaltungsstoffwechsels andererseits anzusehen.

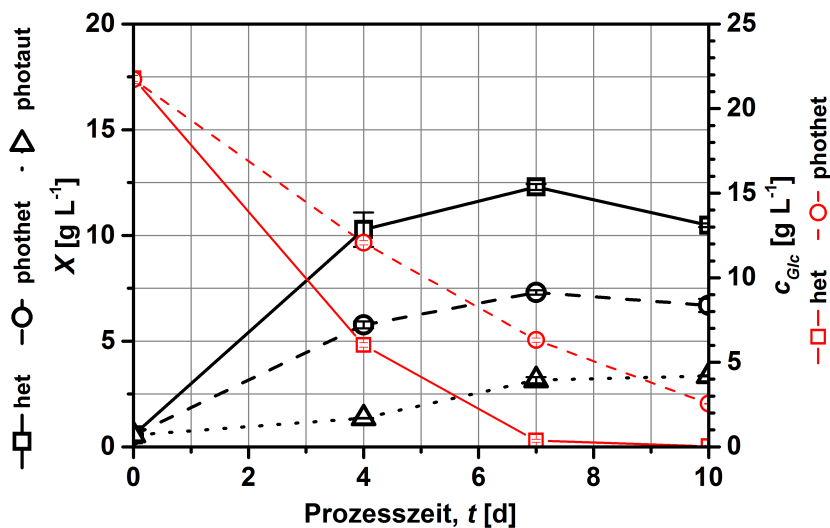


Abbildung 5.2: Verlauf der Biotrockenmassekonzentration und der Glucosekonzentration bei heterotropher (het), photoheterotropher (phohet) und photoautotropher (photaut) Kultivierung von *E. gracilis* nach einer Kultivierungsdauer von vier, sieben bzw. zehn Tagen im Schüttelkolben. Die Kultivierung erfolgte gemäß Abschnitt 4.1.3 im Basalmedium nach Cramer & Meyers (1952) mit bzw. ohne 20 g L^{-1} Glucose. Der Lichtfluss bei photoautotropher und photoheterotropher Kultivierung betrug $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar ($n=3$).

In vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass höhere initiale Glucosekonzentrationen bei heterotrophen Kulturen zu höheren Biotrockenmassekonzentrationen führte, wobei der Ausbeutekoeffizient ($Y_{X/S}$) bei initialen Glucosekonzentrationen von $> 20 \text{ g L}^{-1}$ deutlich abnahmen (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund scheinen höhere Glucosekonzentration als 20 g L^{-1} weniger ökonomisch zu sein. Bei vergleichbaren Experimenten, welche als Satzkultivierung in einem Rührkesselreaktor stattfanden, wurden vergleichbare Biotrockenmassekonzentrationen und Ausbeutekoeffizienten ($Y_{X/S}$) für heterotrophe Kulturen beschrieben (Šantek *et al.*, 2009).

Im Gegensatz dazu erreichten die photoheterotrophen Kulturen geringere Biotrockenmassekonzentrationen, als in der Literatur beschrieben. Nach Ogbonna *et al.* (2002b) können photoheterotrophe Kulturen sowohl CO₂ als auch organische Kohlenstoffquellen gleichzeitig nutzen, was in höheren Biotrockenmassekonzentrationen im Vergleich zu strikt heterotrophen Kulturen resultiert. Andere Autoren haben berichtet, dass Photosynthese und oxidative Phosphorylierung bei *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acutus* (Ogawa & Aiba, 1981) und *Arthrospira platensis* (Marquez *et al.*, 1993) unabhängig voneinander vonstatten gehen. Die Wachstumsgeschwindigkeit entspräche demnach der Summe der zu erwartenden Wachstumsgeschwindigkeiten strikt heterotropher und photoautotropher Kulturen (Ogawa & Aiba, 1981; Kobayashi *et al.*, 1992; Marquez *et al.*, 1993) oder können diese sogar übertreffen (Martínez & Orús, 1991). Dieses Verhalten konnte unter den gewählten Kultivierungsbedingungen für *E. gracilis* jedoch nicht beobachtet werden. Eventuell wurde das photoheterotrophe Wachstum durch zu hohe Lichtflüsse, wie von Ogbonna *et al.* (2002b) beschrieben wurde, inhibiert. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass die Assimilation von Glucose durch eine Photoinhibition vermindert wurde. Eine Inhibition der Assimilation organischer Kohlenstoffquellen bei hohen Lichtflüssen wurde bereits für andere Mikroalgen beschrieben (Follmann *et al.*, 1978; Ogawa & Aiba, 1981; Kamiya & Kowallik, 1987; Moya *et al.*, 1997).

Die photoautotroph kultivierten *E. gracilis*-Zellen erreichten nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen eine Biotrockenmassekonzentration von 3,2 g L⁻¹. In den ersten vier Tagen konnte nur ein geringes Wachstum beobachtet werden. Dies war darauf zurückzuführen, dass das Inokulum heterotroph gewonnen wurde und die Zellen einige Zeit zur Adaptation an photoautotrophes Wachstum benötigten, was in einer verlängerten *lag*-Phase resultierte. Nach Cramer & Myers (1952) benötigen Zellen ohne ausdifferenzierte Chloroplasten eine Induktionsperiode von mindestens 24 Stunden für die Chloroplastenentwicklung. Die Zunahme an Biotrockenmasse in den letzten drei Tagen der Kultivierung lag aufgrund der Selbstbeschattung der Zellen lediglich bei 10 %. Geringere Schichtdicken oder höhere Lichtflüsse hätten wahrscheinlich zu höheren Biotrockenmassekonzentrationen geführt, da die Bildung von Biomasse in direktem Zusammenhang mit dem applizierten Lichtfluss steht, wie z. B. von Chae *et al.* (2006) für *E. gracilis* beschrieben wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass höhere Produktivitäten bei höheren Lichtflüssen erreicht werden können. Bei einem direkten Vergleich sollte allerdings berücksichtigt werden, dass Chae *et al.* (2006) in ihren Versuchen Photobioreaktoren im Pilotmaßstab mit einer Schichtdicke von 10 cm verwendet haben, was einen direkten Vergleich zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten erschwert. Nach einer sechstägigen, diskontinuierlichen Kultivierung im Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) bei 940 μmol m⁻² s⁻¹ konnte dort eine Biotrockenmassekonzentration von lediglich 0,92 g L⁻¹ erreicht werden (Chae *et al.*,

2006). Es kann davon ausgegangen werden, dass Lichtflüsse jenseits der hier beschriebenen $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zu einer weiteren Steigerung in einer höheren Biotrockenmassekonzentration führen würde, bis ein kritischer Lichtfluss erreicht wird, bei welchem eine Photoinhibition auftritt. Diese hätte einen negativen Einfluss auf die Kultivierung. Kitaya *et al.* (2005) konnten zeigen, dass die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit bereits ab einem Lichtfluss oberhalb von $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ einbricht. Diese Versuche wurden jedoch in Photobioreaktoren im Wassertropfenmaßstab durchgeführt. Eine Photoinhibition bei solch geringen Schichtdicken scheint infolgedessen auch bei vergleichsweise niedrigen Lichtflüssen aufzutreten. Somit ist der Einfluss der Stärke des applizierten Lichtflusses auf den Eintritt in den photoinhibitorischen Bereich umgekehrt proportional zur Schichtdicke. Aufgrund der zum Teil extrem unterschiedlichen Schichtdicken sind Vergleiche der hier beschriebenen Ergebnisse mit jenen aus der Literatur sehr schwierig.

Tabelle 5.1 zeigt die biomassebezogenen, volumetrischen Produktivitäten ($L_{V,X}$) der Kultivierungen. Dieser ist zu entnehmen, dass die Produktivität bei den kohlenstoff-supplementierten Kulturen aufgrund der höheren Zunahme an Biomasse zu Beginn der Kultivierung nach vier Tagen am höchsten war. Für die heterotroph gewonnene Kultur wurde für die Biomasse eine volumetrische Produktivität von $2,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und für die photoheterotroph gewonnene Kultur $1,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ berechnet. Aufgrund der langen *lag*-Phase bei der photoautotroph gewonnenen Kultur, wurde die höchste Produktivität mit $0,45 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erst nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen erreicht. Eine geringe volumetrische Produktivität, welche hauptsächlich aus der *lag*-Phase und den zunächst niedrigen Biotrockenmassekonzentrationen nach der Inokulierung resultiert, stellt einen generellen Nachteil satzweiser Kultivierungen dar.

Tabelle 5.1: Tabellarische Darstellung der volumetrischen Produktivitäten nach vier, sieben und zehn Tagen in Bezug auf Biotrockenmasse bei heterotropher, photoheterotropher und photoautotropher satzweiser Kultivierung von *E. gracilis* im Schüttelkolben gemäß Abbildung 5.2. Die dargestellten Produktivitäten wurden in Bezug auf den Kultivierungsbeginn berechnet.

Prozesszeit, t [d]	$L_{V,X}$, heterotroph [g L ⁻¹ d ⁻¹]	$L_{V,X}$, photo- heterotroph [g L ⁻¹ d ⁻¹]	$L_{V,X}$, photo- autotroph [g L ⁻¹ d ⁻¹]
4	2,57	1,44	0,34
7	1,76	1,04	0,45
10	1,05	0,67	0,34

5.1.1.3 Einfluss verschiedener Kultivierungsmodi auf die Paramylonkonzentration und -selektivität

Der Kultivierungsmodus hatte einen großen Einfluss auf die Paramylontrockenmassekonzentration und die Paramylonselektivität, wobei die Produktbildung auch durch die Kultivierungsdauer beeinflusst wurde. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Eine maximale Paramylontrockenmassekonzentration von $9,3 \text{ g L}^{-1}$ (Abb. 5.3 (a)) und eine maximale Selektivität ($S_{PTM/X}$) von 0,83 (Abb. 5.3 (b)) konnte bei der strikt heterotroph gewonnenen Kultur am siebten bzw. zehnten Kultivierungstag gemessen werden. Obwohl den photoheterotrophen Kulturen die gleiche initiale Glucosekonzentration zu Beginn der Kultivierung bereitgestellt wurde, konnte nach einer zehntägigen Kultivierung nur eine maximale Paramylontrockenmassekonzentration von $4,8 \text{ g L}^{-1}$ und eine Selektivität von 0,72 erzielt werden. Die photoautotroph gewonnenen Zellen hingegen erreichten nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen eine maximale Paramylontrockenmassekonzentration von $0,73 \text{ g L}^{-1}$, was einer vergleichsweise geringen Selektivität von 0,23 entspricht. Der Ausbeutekoeffizient in Bezug auf das Produkt Paramylon ($Y_{PTM/S}$) war für die heterotroph gewonnene Kultur nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen mit 0,47 am höchsten. Für die photoheterotroph gewonnene Kultur konnte der höchste Ausbeutekoeffizient erst nach einer Kultivierungsdauer von zehn Tagen erzielt werden und betrug lediglich 0,24.

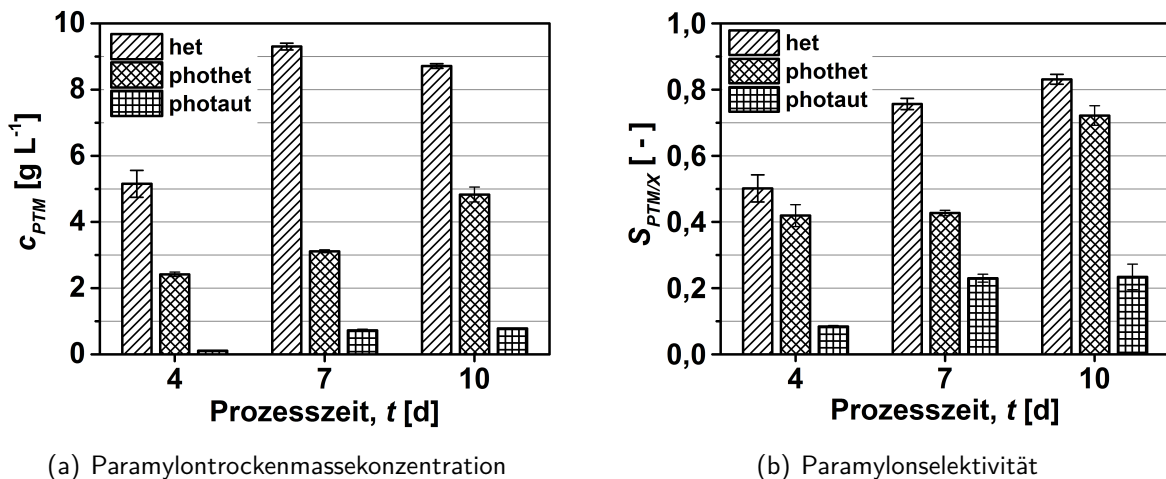


Abbildung 5.3: Entwicklung der Paramylontrockenmassekonzentration (a) und -selektivität (b) bei heterotropher (het), photoheterotropher (phohtet) und photoautotropher (photaut) Kultivierung von *E. gracilis* nach einer Kultivierungsdauer von vier, sieben bzw. zehn Tagen im Schüttelkolben. Die Kultivierung erfolgte gemäß Abschnitt 4.1.3 im Basalmedium nach Cramer & Meyers (1952) mit bzw. ohne 20 g L^{-1} Glucose. Der Lichtfluss bei photoautotropher und photoheterotropher Kultivierung betrug $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar ($n=3$).

Bei einem Überschuss einer adäquaten Kohlenstoffquelle im Kulturmedium, synthetisiert *E. gracilis* große Mengen des Speicherpolysaccharids Paramylon (Barras & Stone, 1968; Buetow, 1989). Dass die heterotrophe Betriebsweise für die Gewinnung von Paramylon am besten geeignet ist, wurde auch in der Literatur beschrieben (Šantek *et al.*, 2009; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010), wobei mit Glucose als Kohlenstoffquelle die höchste Paramylonselektivität erreicht werden kann (Barsanti *et al.*, 2001). Wie sich die Selektivitäten mit zunehmenden Fortschritt der Kultivierung verändern, wurde jedoch bisher kaum untersucht. Zu erwarten wäre, dass bei photoheterotropher Betriebsweise aufgrund der Nutzung von Glucose und Kohlenstoffdioxid gegenüber der Kultivierung mit nur einer Kohlenstoffquelle noch höhere Biotrockenmasse- und Paramylontrockenmassekonzentrationen erreicht würden oder zumindest deren Konzentrationen etwa gleich hoch sein sollten. Andere Autoren haben andere Beobachtungen beschrieben, welche sich zum Teil widersprechen: Briand & Calvayrac (1980) und Calvayrac *et al.* (1981) haben berichtet, dass die Selektivität unter heterotrophen und photoheterotrophen Bedingungen gleich sein sollte, wenn die Zellen im gleichen Medium kultiviert wurden. Dies konnte jedoch bei den hier dargestellten Ergebnissen nicht verifiziert werden. Es wurde vermutet, dass dies auf den von Koll *et al.* (1980) beschriebenen photosyntheseinhibierenden Effekt von Glucose zurückzuführen war. Aufgrund von lichtinduzierten Veränderungen in der Membranpermeabilität wurde die Glucoseaufnahme vermindert, was sich in einer verlangsamten Wachstumsgeschwindigkeit widerspiegelte (Nicolas *et al.*, 1980). Dieser Effekt hatte negative Auswirkungen sowohl auf die Biotrockenmassekonzentrationen, als auch auf die Paramylonselektivitäten bei photoheterotropher Betriebsweise. Nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen war der Unterschied zwischen den heterotrophen und photoheterotrophen Kultivierungsmodi noch ausgeprägter. Wenn die Kohlenstoffquelle erschöpft ist, beginnt *E. gracilis* Paramylon für weiteres Wachstum und für den Erhaltungsstoffwechsel zu metabolisieren (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010). Obwohl die Biotrockenmassekonzentration bei heterotropher und photoheterotropher Kultivierung nach einer Kultivierungszeit von mehr als sieben Tagen leicht abnimmt, zeigt die Selektivität einen entgegengesetzten Trend. Während der stationären Phase konnte vor allem bei der photoheterotroph gewonnenen Kultur eine deutliche Erhöhung der Paramylonselektivität beobachtet werden, was mitunter mit der restlichen, im Medium vorhandenen Glucose im Zusammenhang stand. Es sollte jedoch bedacht werden, dass lysierte Zellen die hochkristallinen Granula in die Kulturbrühe abgeben, welche dort aufgrund ihrer Unlöslichkeit verbleiben. Aus diesem Grund kann der Paramylongehalt in viablen Zellen geringer sein.

Die Synthese von Paramylon unterschied sich beachtlich, wenn die Zellen in Abwesenheit oder in Anwesenheit von Licht kultiviert wurden. Während im Zuge einer photoheterotropen bzw. heterotrophen Kultivierung ein Teil der organischen Kohlenstoffquelle als

Paramylongranula in die Zellen eingelagert wurde, wurde bei photoautotropher Kultivierung lediglich überschüssige Energie in Form dieses Polysaccharids gespeichert, wobei die Paramylonsyntheserate mit steigendem Lichtfluss steigt (Cook, 1963). Für *E. gracilis* wurde beschrieben, dass heterotroph gewonnene Zellen eine sechsfach höhere Paramylonselektivität aufweisen als photoautotroph gewonnene Zellen (Wolken, 1961). Ein Paramylonanteil von 23 % (*w/w*) für photoautotroph gewonnene Zellen, welcher in Abbildung 5.3 (b) dargestellt ist, ist einer der höchste Anteile, welche bisher beschrieben wurden. Im Vergleich zu den heterotroph gewonnenen Zellen wurde demnach ein 3,6-fach höherer Paramylonanteil für diese bestimmt. Dieser höhere Anteil bei den photoautotroph gewonnenen Zellen hängt vermutlich damit zusammen, dass bei dieser Versuchsreihe höhere Lichtflüsse und adäquatere Lichtemitter eingesetzt wurden, welche aufgrund der Emission von photosynthetisch aktiven Wellenlängen für phototrophe Kultivierungen besser geeignet sind. Das Emissionsspektrum der für diese Kultivierungen eingesetzten LEDs sowie das Absorptionsspektrum von Chlorophyll a und b sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Daraus ist zu entnehmen, dass ein Großteil der für die Photosynthese benötigten Wellenlängen von diesen Emittlern bereitgestellt wurde.

Die volumetrische Produktivität bezüglich des Produktes Paramylon ($L_{V,PTM}$) war, analog zur Biotrockenmasse, bei diesem Versuch aufgrund der satzweisen Kultivierung eher gering. Die höchste Produktivität mit $1,33 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ konnte bei heterotropher Betriebsweise nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen erzielt werden, wobei diese nur unwesentlich höher war als nach einer viertägigen Kultivierungsdauer. Beim photoheterotrophen Kultivierungsmodus war die Produktivität generell geringer und es konnte die höchste Produktivität mit $0,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nach vier Tagen erzielt werden. Im photoautotrophen Modus war die Produktivität generell sehr gering, wobei das Maximum mit $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nach einer viertägigen Kultivierungsdauer erzielt wurde.

Tabelle 5.2: Tabellarische Darstellung der volumetrischen Produktivitäten nach vier, sieben und zehn Tagen in Bezug auf Paramylontrockenmasse bei heterotropher, photoheterotropher und photoautotropher, satzweiser Kultivierung von *E. gracilis* im Schüttelkolben gemäß Abbildung 5.3. Die dargestellten Produktivitäten wurden in Bezug auf den Kultivierungsbeginn berechnet.

Prozesszeit, t [d]	$L_{V,PTM}$, heterotroph [g L ⁻¹ d ⁻¹]	$L_{V,PTM}$, photo- heterotroph [g L ⁻¹ d ⁻¹]	$L_{V,PTM}$, photo- autotroph [g L ⁻¹ d ⁻¹]
4	1,29	0,60	0,03
7	1,33	0,45	0,10
10	0,87	0,48	0,08

5.1.1.4 Einfluss verschiedener Kultivierungsmodi auf die α -Tocopherolkonzentration und -selektivität

Die α -Tocopherolkonzentration, welche bei dieser Kultivierung erzielt wurden, sind in Abbildung 5.4 (a) und die dazugehörigen Selektivitäten ($S_{\alpha\text{-Toc}/X}$) in Abbildung 5.4 (b) dargestellt. Bei den photoautotroph gewonnenen *E. gracilis*-Zellen konnte die höchste α -Tocopherolselektivität von $2,6 \text{ mg g}^{-1}$ nach einer zehntägigen Kultivierungsdauer erzielt werden. Im Gegensatz zur photoautotrophen Kultur wurden weit geringere Selektivitäten von $0,5 \text{ mg g}^{-1}$ für die heterotrophe und $0,9 \text{ mg g}^{-1}$ für die photoheterotrophe Kultur erzielt. Durch eine Illumination der heterotrophen Kultur konnte die Selektivität in etwa verdoppelt werden, was auch von Takeyama *et al.* (1997) beobachtet wurde. In deren Studie wurde jedoch der Verlauf der Produktbildung vernachlässigt. Trotz der weit höheren Biotrockenmassekonzentrationen der heterotrophen und photoheterotrophen Kulturen war die α -Tocopherolkonzentration der photoautotrophen Kultur dennoch höher, wie aus Abbildung 5.4 (a) ersichtlich wird. Nach einer Kultivierungsdauer von zehn Tagen konnten α -Tocopherolkonzentrationen von $8,6 \text{ mg L}^{-1}$ für die photoautotrophe, beziehungsweise 6 mg L^{-1} für die photoheterotrophe Kultur gemessen werden. Die Kultur, welche unter Lichtausschluss gewonnen wurde, erreichte aufgrund der hohen Biotrockenmassekonzentration trotz geringer Selektivität eine α -Tocopherolkonzentration von $5,3 \text{ mg L}^{-1}$.

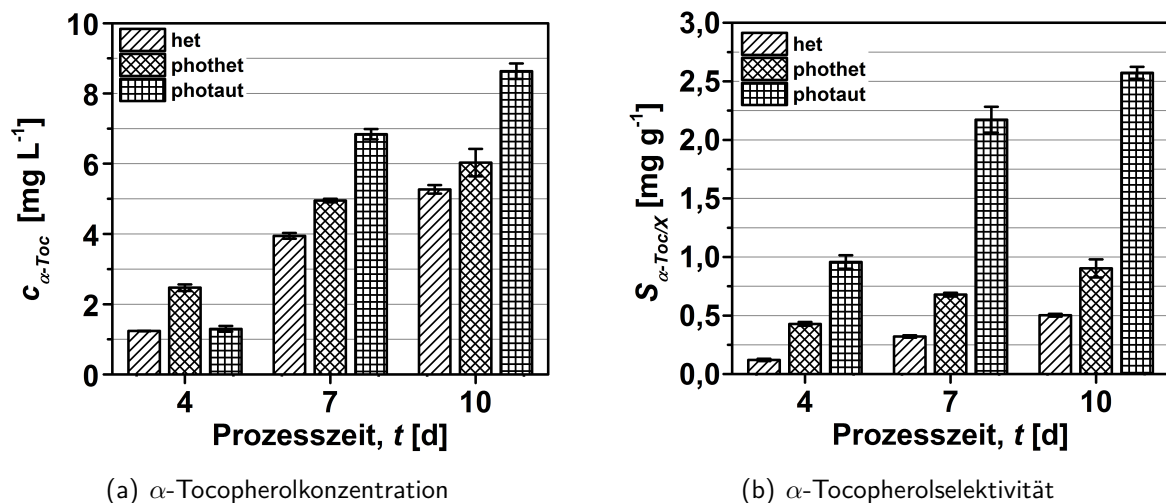


Abbildung 5.4: Entwicklung der α -Tocopherolkonzentration (a) und -selektivität (b) bei heterotropher (het), photoheterotropher (photohet) und photoautotropher (photaut) Kultivierung von *E. gracilis* nach einer Kultivierungsdauer von vier, sieben bzw. zehn Tagen im Schüttelkolben. Die Kultivierung erfolgte gemäß Abschnitt 4.1.3 im Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) mit bzw. ohne 20 g L^{-1} Glucose. Der Lichtfluss bei photoautotropher und photoheterotropher Kultivierung betrug $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar ($n=3$).

Ungeachtet der weit geringeren spezifischen Produktkonzentrationen bei photoheterotropher und heterotropher Kultivierung, scheinen diese Kultivierungsmodi aufgrund der weitaus höheren Biotrockenmassekonzentrationen eine effektive α -Tocopherolgewinnung zu ermöglichen. Dies wurde auch in anderen Studien beschrieben (Ogbonna *et al.*, 1998; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010). Ein großer Vorteil einer strikt heterotrophen Produktion stellt außerdem die Möglichkeit der Nutzung konventioneller Reaktorsysteme wie z. B. Rührkesselreaktoren dar. Dies scheint jedoch ökonomisch nur sinnvoll, wenn der Marktwert der Produkte den Einsatz einer organischen Kohlenstoffquelle finanziell rechtfertigt. Mit dem Einsatz anderer Kohlenstoffquellen wie z. B. Ethanol könnte die Ausbeute des α -Tocopherols noch gesteigert werden (Ogbonna *et al.*, 1998), was jedoch die Ausbeute des Paramylons verringern würde. Tani & Tsumura (1989) haben berichtet, dass sich die Selektivität bezüglich α -Tocopherol auch durch die Zugabe von Homogentisat, einer Vorstufe der Tocopherole, erheblich erhöhen ließe. Da der Marktpreis für diese Substanz jedoch sehr hoch ist, scheint der Einsatz von Homogentisat nicht gerechtfertigt.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die α -Tocopherolgewinnung bei photoautotropher Kultivierung am effektivsten erscheint, vor allem, weil dabei auf den Einsatz einer organischen Kohlenstoffquelle verzichtet werden kann. Außerdem könnte CO_2 aus Rauchgasen (Brown, 1996; Kadam, 1997; Doucha *et al.*, 2005; Chae *et al.*, 2006) und Sonnenlicht als Photonenquelle für die Kultivierung eingesetzt werden. Aufgrund der hohen Kosten für Photobioreaktoren, ist eine phototrophe Gewinnung von Mikroalgenbiomasse zum derzeitigen Stand der Technik jedoch noch unökonomisch (Demirbas & Demirbas, 2010; Morweiser *et al.*, 2010; Rosello Sastre & Posten, 2010). Neueren Studien zufolge sei jedoch eine ökonomische Gewinnung von Mikroalgenbiomasse in näherer Zukunft möglich (Acién *et al.*, 2012; Wijffels *et al.*, 2013).

Sowohl die volumetrischen als auch die spezifischen Konzentrationen zeigten bis zum Ende der Kultivierung einen stetigen Anstieg. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass die maximale α -Tocopherolkonzentration, welche unter diesen Bedingungen gewonnen werden könnte, nach dieser Kultivierungszeit noch nicht erreicht wurde. Im Hinblick auf die Produktivität dürfte diese durch eine längere Prozessdauer jedoch nicht erhöht werden können. Die höchsten volumetrischen Produktivitäten ($L_{V,\alpha\text{-Toc}}$), dargestellt in Tabelle 5.3, wurden bei allen Kulturen nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen erzielt, wobei bei der photoautotrophen Betriebsweise die Produktivität mit $0,98 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ am höchsten war. Die höchste Produktivität bei photoheterotropher und heterotropher Kultivierung betrug $0,71 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bzw. $0,52 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Da jedoch größere zeitliche Abstände bei der Probenahme gewählt wurden, könnte die tatsächliche maximale Produktivität nach einer anderen Kultivierungsdauer erzielt werden und etwas höher liegen.

Tabelle 5.3: Tabellarische Darstellung der volumetrischen Produktivitäten nach vier, sieben und zehn Tagen in Bezug auf α -Tocopherol bei heterotropher, photoheterotropher und photoautotropher satzweiser Kultivierung von *E. gracilis* im Schüttelkolben gemäß Abbildung 5.4. Die dargestellten Produktivitäten wurden in Bezug auf den Kultivierungsbeginn berechnet.

Prozesszeit, t [d]	$L_{V,\alpha-Toc}$, heterotroph [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	$L_{V,\alpha-Toc}$, photo- heterotroph [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	$L_{V,\alpha-Toc}$, photo- autotroph [mg L ⁻¹ d ⁻¹]
4	0,31	0,62	0,32
7	0,56	0,71	0,98
10	0,52	0,60	0,86

5.1.1.5 Kurzzusammenfassung & Fazit

Dieser Versuch konnte zeigen, dass im heterotrophen Kultivierungsmodus hohe Biotrockenmasse- und Paramylontrockenmassekonzentrationen von 12,3 g L⁻¹ bzw. 9,3 g L⁻¹ erreicht werden können. Die Selektivitäten bezüglich der Produkte Paramylon und α -Tocopherol betragen dabei 0,83 bzw. 0,5 mg g⁻¹. Wurden die Zellen photoheterotroph kultiviert, betrug die Biotrockenmassekonzentration trotz identischer, initialer Glucosekonzentration von 20 g L⁻¹ nur 7,3 g L⁻¹, wobei eine Paramylonselektivität von 0,72 und eine α -Tocopherolselektivität von 0,9 mg g⁻¹ erzielt wurde. Die photoautotroph gewonnene Biomasse hingegen wies eine weitaus geringere Biotrockenmassekonzentration von 3,2 g L⁻¹ auf. Während die α -Tocopherolselektivität bei dieser Kultur mit 2,6 mg g⁻¹ am höchsten war, betrug die Paramylonselektivität lediglich 0,23. Auch der Erntezeitpunkt zeigte einen Einfluss auf die Produktkonzentrationen und -selektivitäten. Da die Unterschiede in Bezug auf die Produktivitäten zum Teil sehr groß waren, sollte bei Untersuchungen möglicher Bioraffineriekonzepte mit Mikroalgen immer auch der Kultivierungsmodus und der Erntezeitpunkt berücksichtigt werden.

Für die alleinige Gewinnung von Paramylon scheint der heterotrophe Kultivierungsmodus am vielversprechendsten zu sein. Im Hinblick auf ein Bioraffineriekonzept sollte dabei zusätzlich α -Tocopherol extrahiert werden, dessen volumetrische Konzentration aufgrund hoher Biotrockenmassekonzentrationen trotz geringer Selektivität vergleichsweise hoch ist. Diese Fraktion beinhaltet zusätzlich einen Großteil aller lösemittellöslichen Substanzen wie Fettsäuren und Waxester, welche mannigfaltige Einsatzmöglichkeiten bieten (Chisti, 2007; Schwarzhans *et al.*, 2014; Krajčovič *et al.*, 2015). Die Gewinnung der Biomasse kann dabei in herkömmlichen Reaktoren erfolgen. Die α -Tocopherolkonzentration ließe sich durch eine zusätzliche Illumination der Kultur in etwa verdoppeln, was im Hinblick auf dieses Produkt eine höhere Produktivität liefern würde. Die Paramylonausbeute hingegen würde dadurch jedoch etwa halbiert. Durch eine nachträgliche Illumination einer heterotrophen Kultur könnte dieses Problem jedoch umgangen werden (Ogbonna *et al.*, 1999).

Der photoautotrophe Kultivierungsmodus eignete sich besonders für hohe α -Tocopherolkonzentrationen, wobei vergleichsweise geringe Paramylonkonzentrationen generiert werden konnten. Die auf diese Art und Weise gewonnene Biomasse wäre in ein anderes Bioraffineriekonzept integrierbar. Die photoautotroph gewonnene Biomasse könnte als Quelle für α -Tocopherol dienen, wobei der Großteil der Biomasse für die Gewinnung von Biogas zur Verfügung stünde. Trotz der vergleichsweise geringen Konzentration könnte die Gewinnung von Paramylon jedoch auch gänzlich ohne Kohlenstoffsupplementierung bei photoautotropher Betriebsweise in einem kostengünstigen Minimalmedium realisiert werden, wobei auch in diesem Fall kaum Restbiomasse für die Biogasgewinnung zur Verfügung stünde.

5.1.2 Heterotrophe Gewinnung von Paramylon und α -Tocopherol im Rührkesselreaktor mittels satzweiser Kultivierung

Ziel & Hintergrund

In den Abschnitten 5.1.1.2 und 5.1.1.3 konnte gezeigt werden, dass der heterotrophe Modus besonders gut für die Gewinnung von Biomasse und Paramylon geeignet ist. Dies entsprach auch den Beobachtungen anderer Autoren (Šantek *et al.*, 2009; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010). Zwar war die Selektivität in Bezug auf α -Tocopherol, wie in Abschnitt 5.1.1.4 beschrieben wurde, bei diesem Modus vergleichsweise gering. Aufgrund der hohen Biotrockenmassekonzentration war die volumetrische Konzentration jedoch relativ hoch. Auch dies wurde bereits in der Literatur beschrieben (Ogbonna *et al.*, 1998).

Um die simultane Gewinnung der Produkte Paramylon und α -Tocopherol im Labormaßstab zu realisieren, wurde *E. gracilis* heterotroph in einem Rührkesselreaktor im Satzverfahren kultiviert. Dabei sollte untersucht werden, ob sich die im Abschnitt 5.1.1 erzielten Ergebnisse für die heterotrophe Betriebsweise auch auf eine Rührkesselreaktor-kultivierung beziehen lassen. Zudem sollte durch häufigere Probenahme die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ermittelt werden. Mit dem Hintergrund einer quasi-kontinuierlichen Gewinnung sollten adäquate Parameter in Bezug auf Luftvolumenstrom, Rührerdehffrequenz, pH-Wert und -Statisierung etc. validiert werden.

Ergebnisse & Diskussion

Die Kultivierung erfolgte in einem 3,7 L-Rührkesselreaktor (KLF, Bioengineering, Schweiz) mit einem Arbeitsvolumen von 2 L bei 28 °C, einer Rührerdrehfrequenz von 200 min⁻¹ und einem Überdruck von 0,1 bar. Der Luftvolumenstrom betrug 0,2 vvm. Als Medium wurde das Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) mit einem initialen pH-Wert von 7 verwendet und es erfolgte keine pH-Statisierung. Als Substrat wurde Glucose-Monohydrat

mit einer Konzentration von 22 g L^{-1} eingesetzt. Als Inokulum dienten 10 % (*v/v*) einer vier Tage alten, heterotroph gewonnenen *E. gracilis*-Schüttelkolbenkultur, deren Gewinnung ebenfalls heterotroph erfolgte. Die Probenahme erfolgte in einem Zyklus von zwölf Stunden und die Kulturbrühe wurde auf Biotrockenmasse- und Substratkonzentration sowie auf die Konzentrationen und Selektivitäten der Produkte Paramylon und α -Tocopherol untersucht. Zudem wurde der Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks und des pH-Wertes aufgezeichnet.

Abbildung 5.5 zeigt den Verlauf der Biotrockenmasse- und der Substratkonzentration sowie das pH-Profil und den relativen Sauerstoffpartialdruck während einer fünftägigen Satzkultivierung. Der relative Sauerstoffpartialdruck zeigt einen typischen Verlauf. Nach einer Kultivierungsdauer von 43 Stunden zeigte das Profil ein Minimum von 20 %, stieg daraufhin wieder an und blieb bei Eintritt in die stationäre Phase der Kultur bei etwa 80 %, was letztlich auf den Erhaltungsstoffwechsel zurückzuführen war. Auch der pH-Wert zeigte den für die Kultivierung von *E. gracilis* in dem verwendeten Medium typischen Verlauf. Zu Beginn der Kultivierung lag der pH-Wert bei 7 und nahm bis zu einer Kultivierungsdauer von ca. 34 Stunden exponentiell ab. Ab diesem Zeitpunkt blieb der pH-Wert bis zum Ende der Kultivierung konstant bei einem Wert von 3,3. Bei einer großen Anzahl an Mikroorganismen kann bei deren Kultivierung eine Ansäuerung des Mediums beobachtet werden, da als Metabolite organische Säuren wie Acetat gebildet und sekretiert werden, auf welche diese Versauerungen häufig zurückzuführen sind. Dies scheint bei der Gewinnung von *E. gracilis* in dieser Form nicht der Fall zu sein, da dieser Organismus keine organischen Säuren in die Kulturbrühe sekretiert (Yamane *et al.*, 2001). Es wurde vermutet, dass sich der pH-Wert aufgrund des Verbrauchs von Ammonium verschoben hat, was eine Verringerung der Pufferwirkung zur Folge hatte.

Die Verläufe der Biotrockenmasse- und Substratkonzentration verliefen gemäß den entsprechenden Erwartungen, wobei die *lag*-Phase von zwölf Stunden vergleichsweise kurz erscheint, da bei vergleichbaren Kultivierungen zum Teil weitaus längere *lag*-Phasen beobachtet wurden. Der Eintritt in die Stationärphase war in diesem Fall nicht ganz eindeutig. Der Kurvenverlauf ließ zwar vermuten, dass die Biotrockenmassekonzentration schon nach einer Kultivierungsdauer von drei Tagen mit $8,1 \text{ g L}^{-1}$ stationär war. Da jedoch nach einer Kultivierungsdauer von vier Tagen ein weiterer Anstieg der Biotrockenmassekonzentration auf $8,8 \text{ g L}^{-1}$ verzeichnet werden konnte und die Substratkonzentration nach drei Tagen noch $2,9 \text{ g L}^{-1}$ betrug, wurde angenommen, dass die Biotrockenmassekonzentration nach einer Kultivierungsdauer von 84 Stunden in Wirklichkeit höher war, als die im Plot dargestellten 8 g L^{-1} . Es wurde angenommen, dass dies auf einen Messfehler oder einem Fehler bei der Probenahme zurückzuführen war.

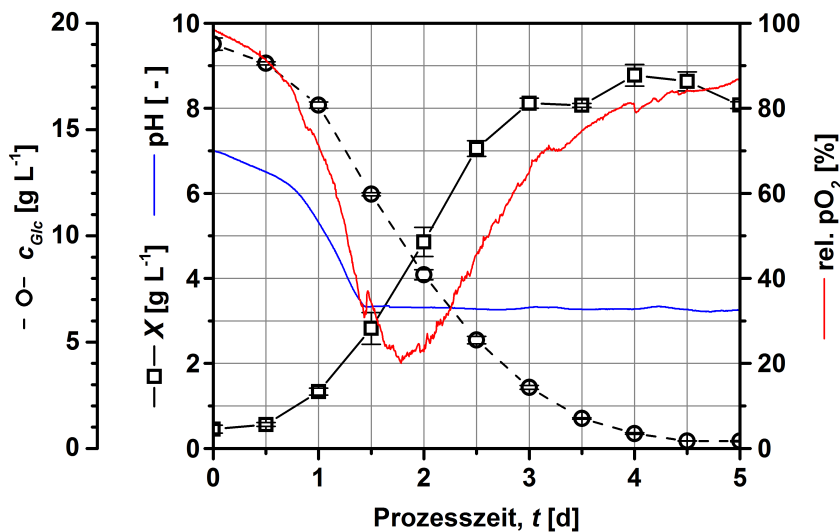


Abbildung 5.5: pH-Wert, relativer Sauerstoffpartialdruck sowie Biotrockenmasse- und Substratkonzentration bei heterotropher Satz Kultivierung von *E. gracilis* im 3,7 L-Rührkesselreaktor über einen Zeitraum von fünf Tagen im Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) mit 20 g L⁻¹ Glucose. Kultivierungsparameter: Temperatur: 28 °C, Überdruck: 0,1 bar, Luftvolumenstrom: 0,2 vvm, Arbeitsvolumen: 2 L, Rührerdrehfrequenz 200 min⁻¹. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen von X und c_{Glc} dar ($n=3$).

Die Konzentrationen und Selektivitäten der Produkte Paramylon und α -Tocopherol, welche bei dieser satzweisen Kultivierung gewonnen werden konnten, sind in Abbildung 5.6 gezeigt. Die Paramylonselektivität betrug bei Inokulierung 0,77, nahm in der exponentiellen Phase auf ein Minimum von 0,71 ab und erreichte ein Maximum von 0,81 nach einer Prozessdauer von vier Tagen. Da die Selektivität während dieser satzweisen Kultivierung nur relativ geringe Schwankungen aufwies, verlief die Paramylontrockenmassekonzentration annähernd parallel zur Biotrockenmassekonzentration. Dabei wurde nach vier Tagen eine maximale Paramylontrockenmassekonzentration von 7,1 g L⁻¹ erreicht.

Auch der Verlauf der α -Tocopherolselektivität war für eine heterotrophe Kultivierung von *E. gracilis* typisch. Bei der Inokulierung betrug diese 0,18 mg g⁻¹. Während des Wachstums der Kultur sank die spezifische Konzentration und erreichte nach einer Kultivierungsdauer von 60 Stunden ein Minimum von 0,04 mg g⁻¹. Dieser Zeitpunkt wurde in etwa durch den Eintritt in die stationäre Phase repräsentiert. Dass die Selektivität in der exponentiellen bzw. zu Beginn der linearen Wachstumsphase sehr gering ist, wurde bereits von Ogbonna *et al.* (1998) bei einer Zulaufkultivierung beschrieben. In der stationären Phase stieg die α -Tocopherolselektivität auf einen Wert von 0,15 mg g⁻¹ an. Der Wert, welcher nach Inokulierung gemessen wurde, wurde somit nicht ganz wieder erreicht.

Die volumetrische α -Tocopherolkonzentration war bis zu einer Kultivierungsdauer von 60 Stunden sehr gering und erreichte zu diesem Zeitpunkt einen Wert von 0,26 mg L⁻¹, obwohl die Biotrockenmassekonzentration zu diesem Zeitpunkt 7 g L⁻¹ betrug. Dies war darauf zurückzuführen, dass bis zu diesem Zeitpunkt die Selektivität stetig geringer wur-

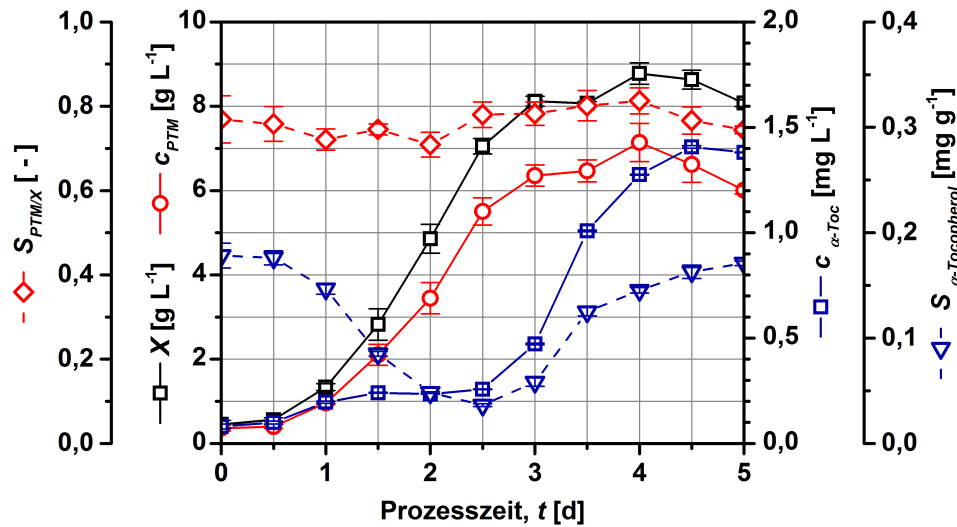


Abbildung 5.6: Verlauf der Biotrockenmasse- und Paramylontrockenmassekonzentration, Paramylonselektivität sowie α -Tocopherolkonzentration und -selektivität bei heterotropher Satzkultivierung von *E. gracilis* im 3,7 L-Rührkesselreaktor über einen Zeitraum von fünf Tagen im Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) mit 20 g L^{-1} Glucose. Kultivierungsparameter: Temperatur: $28 \text{ }^\circ\text{C}$, Überdruck: $0,1 \text{ bar}$, Luftvolumenstrom: $0,2 \text{ vvm}$, Arbeitsvolumen: 2 L , Rührerdrehfrequenz 200 min^{-1} . Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen von X und $c_{Glucose}$ dar ($n=3$).

de und zu diesem Zeitpunkt das bereits beschriebene Minimum aufwies. Während der stationären Phase wurde verstärkt α -Tocopherol gebildet, so dass zum Ende der Kultivierung eine maximale Konzentration von $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ erreicht werden konnte. Eine erhöhte α -Tocopherolbildung bei heterotrophen Kulturen in der stationären Phase wurde auch bei der Satzkultivierung im Schüttelkolben (vgl. Abschnitt 5.1.1.4) beobachtet.

Die Produktivitäten in Bezug auf Biotrockenmasse-, Paramylontrockenmasse- und α -Tocopherolkonzentration sowie die Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$ und $Y_{PTM/S}$ bei heterotropher, satzweiser Kultivierung sind in Tabelle 5.4 dargestellt. Bezüglich der Biotrocken- und Paramylontrockenmasse waren die Produktivitäten nach 60 Stunden mit $2,8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bzw. $2,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ am höchsten. Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch noch $5,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Glucose im Medium vorhanden, welches im Fall einer Zellernte zu diesem Zeitpunkt ungenutzt bliebe. Für α -Tocopherol war das Produktivitätsmaximum aufgrund der geringen Selektivität zu Beginn des Prozesses erst nach einer viertägigen Prozessdauer erreicht und betrug zu diesem Zeitpunkt $0,39 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Zu diesem Zeitpunkt war auch die Glucose fast vollständig verbraucht. Mittels semilogarithmischer Auftragung der Biotrockenmassekonzentration gegen die Fermentationsdauer und anschließender Bestimmung der Steigung der Regressionsgerade, wurde ein μ_{max} von $1,61 \text{ d}^{-1}$ bestimmt. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ war nach vier Tagen mit $0,44$ am höchsten.

In der Literatur wurden jedoch höhere Ausbeutekoeffizienten für die heterotrophe Gewinnung von *E. gracilis*-Biomasse mit Glucose als Substrat beschrieben. Ogbonna *et al.*

(2002a) und Šantek *et al.* (2009) berichteten von Ausbeutekoeffizienten ($Y_{X/S}$) von 0,66 bzw. 0,64. Auch bei der satzweisen Kultivierung im Schüttelkolben, welche in Abschnitt 5.1.1.2 beschrieben wurde, konnte ein höherer Ausbeutekoeffizient ($Y_{X/S}$) von 0,61 erzielt werden. Der höchste Ausbeutekoeffizient für das Produkt Paramylon ($Y_{PTM/S}$) betrug 0,36 und war somit weitaus höher, als jener, welcher im Schüttelkolben nach einer Kultivierungsdauer von vier Tagen erzielt wurde (vgl. Abschnitt 5.1.1.3). Weil die Bildung von α -Tocopherol nicht im direkten Zusammenhang mit dem Substratumsatz in Zusammenhang steht, wurde dieser für dieses Produkt nicht berechnet.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse mit denen der in Abschnitt 5.1.1 beschriebenen Satzkultivierung im Schüttelkolben wird deutlich, dass der verwendete Reaktor mitunter einen großen Einfluss auf die Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen aufweisen kann. Im Schüttelkolben wurde nach einer Kultivierungsdauer von vier Tagen eine weitaus höhere Biotrockenmassekonzentration von $10,3 \text{ g L}^{-1}$ erzielt. Dies entsprach einer volumetrischen Produktivität von $2,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, so dass diese für eine Kultivierungsdauer von vier Tagen um $0,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ höher war, als bei der Kultivierung im Rührkesselreaktor. Auch die Paramylonkonzentration und die -selektivität war unterschiedlich. Während im Schüttelkolben nach einer Kultivierungsdauer von vier Tagen eine Paramylontrockenmassekonzentration von $5,2 \text{ g L}^{-1}$ bzw. eine Paramylonselektivität von 50,1 erzielt wurden, konnte im Rührkesselreaktor nach dieser Kultivierungsdauer eine Paramylontrockenmassekonzentration von $7,1 \text{ g L}^{-1}$ bzw. eine Paramylonselektivität von 81,3 erzielt werden. Die volumetrische Produktivität bezüglich dieses Produktes konnte durch die Verwendung eines Rührkesselreaktors um $0,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erhöht werden. Hinsichtlich des α -Tocopherols wurden vergleichbare Konzentrationen erzielt. Im Schüttelkolben lag diese zu diesem Zeitpunkt bei $1,24 \text{ mg L}^{-1}$, wohingegen im Rührkesselreaktor eine Konzentration von $1,28 \text{ mg L}^{-1}$ gemessen wurde. Die Selektivität und die Produktivität bezüglich α -Tocopherol waren bei beiden Prozessen vergleichbar.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf die Biotrockenmassekonzentration könnten zum einen dadurch begründet werden, dass in der Abgasstrecke des Rührkesselreaktors ein Rückflusskühler vorhanden war, während im Schüttelkolben kein Evaporationsausgleich stattgefunden hatte. Zum anderen waren die Scherkräfte im Rührkesselreaktor viel höher, so dass dort eine vermehrte Zellyse stattgefunden hat, was letztendlich zu einer geringeren Biotrockenmassekonzentration geführt haben könnte. Die höheren Produktkonzentrationen, welche im Rührkesselreaktor für eine Kultivierungsdauer von vier Tagen erzielt wurden, könnten dadurch begründet werden, dass die *lag*-Phase im Schüttelkolbenversuch weitaus länger war, was aufgrund der ersten Probenahme nach vier Tagen unentdeckt blieb. Eine

Tabelle 5.4: Tabellarische Darstellung der volumetrischen Produktivitäten in Bezug auf Biotrockenmasse-, Paramylontrockenmasse- und α -Tocopherolkonzentration sowie der Ausbeutekoeffizienten bezüglich der Biotrockenmasse- und Paramylontrockenmassekonzentration bei heterotropher, satzweiser Kultivierung von *E. gracilis* im 3,7 L-Rührkesselreaktor bei einer Kultivierungsdauer von fünf Tagen. Die dargestellten Produktivitäten wurden in Bezug auf den Kultivierungsbeginn berechnet. Für weitere Informationen siehe Abbildungen 5.5 und 5.6.

Prozesszeit, t [d]	$L_{V,X}$ [g L ⁻¹ d ⁻¹]	$L_{V,PTM}$ [g L ⁻¹ d ⁻¹]	$L_{V,\alpha-Toc}$ [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	$Y_{X/S}$ [-]	$Y_{PTM/S}$ [-]
0,5	1,13	0,80	0,20	0,03	0,02
1	1,33	0,96	0,20	0,07	0,05
1,5	1,88	1,40	0,16	0,14	0,11
2	2,43	1,72	0,12	0,24	0,17
2,5	2,82	2,20	0,10	0,35	0,28
3	2,71	2,12	0,16	0,41	0,32
3,5	2,31	1,85	0,29	0,40	0,32
4	2,19	1,79	0,32	0,44	0,36
4,5	1,92	1,47	0,31	0,43	0,33
5	1,62	1,20	0,28	0,40	0,30

kürzere *lag*-Phase wiederum könnte das Resultat einer höheren Wachstumsgeschwindigkeit aufgrund einer höheren Sauerstoffsättigung im Rührkesselreaktor gewesen sein.

In vielen verschiedenen satzweisen Kultivierungen, welche im Zuge dieser Arbeit erfolgten, deren Daten hier jedoch nicht dargestellt sind, wurden unterschiedliche Medien, Rührerdrehfrequenzen, Luftvolumenströme und Substrate getestet. Dabei wurde beobachtet, dass eine pH-Statisierung keine Vorteile für die heterotrophe Kultivierung von *E. gracilis* aufweist. Dies stimmte auch mit Beobachtungen anderer Autoren überein (Šantek *et al.*, 2009). Ein konstanter pH-Wert hat sich hingegen als nachteilig erwiesen, da pH-statisierte *E. gracilis*-Kulturen unter Verwendung dieses Mediums zu einer erhöhten Schaumbildung neigen. Da die Schaumbildung bei unstatisierter Betriebsweise sehr gering war, konnte zudem auf die Zugabe eines Antischaummittels verzichtet werden. Cook (1968) hat beschrieben, dass ein Absinken des pH-Wertes auf die Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle zurückzuführen ist, da dabei ein hoher Verbrauch von Ammonium erfolgt, was aufgrund einer geringer werdenden Pufferwirkung zu sauren pH-Werten führt. Saure pH-Werte haben zusätzlich den Vorteil, dass viele potentielle Mikroorganismen, welche die Kultur kontaminieren könnten, einen geringeren pH-Toleranzbereich aufweisen, was das Kontaminationsrisiko bei diesem, im Vergleich zu den meisten Prokaryoten langsam wachsenden Organismus, vermindert. Obwohl in der Literatur häufiger beschrieben wurde, dass sich ein initialer pH-Wert im sauren Bereich bei der heterotrophen Kultivierung positiv auf die Biotrockenmassekonzentration (Hurlbert & Rittenberg, 1962) und die Gewinnung von Paramylon (Šantek *et al.*, 2009) auswirkt, konnte dies nicht beobachtet werden. Aufgrund

der Versauerung der Kulturbrühe stellte sich hier der als optimal beschriebene pH-Wert von ca. 3 selbsttätig ein. Von Cook (1971) wurde beschrieben, dass der pH-Wert bei der Kultivierung von *E. gracilis* in Abwesenheit von Licht keinen Einfluss zeigt.

Bei diesen Prozessen wurde zudem festgestellt, dass gängige Sechsblasscheibenrührer für die Kultivierung von *E. gracilis* ungeeignet sind. Aufgrund der sehr hohen Sedimentationseigenschaften von heterotroph kultivierten Zellen, wurden für eine homogene Verteilung der Zellen sehr hohe Rührerdrehfrequenzen benötigt. Weil die Zellen jedoch eine hohe Scherkraftsensitivität aufgrund der flexiblen Pellicula aufweisen, wurde eine erhöhte Zelllyse beobachtet. Durch die Verwendung eines axial rührenden Propellerrührers, welcher auch bei einer Frequenz von 200 min^{-1} für eine homogene Mischung sorgte, konnte dieses Problem minimiert werden.

Während der Zeit der Datenerfassung wurden verschiedene Ansätze untersucht, die Produktivität zu erhöhen. Eine Möglichkeit bestand darin, die Biomasse mittels Zulaufkultivierung zu gewinnen. Bei dieser Betriebsweise wird häufig der relative Sauerstoffpartialdruck als Parameter für die Regelung des Zulaufs verwendet. Bei *E. gracilis* hat sich dieser Parameter jedoch als ungeeignet erwiesen (Daten nicht gezeigt). Es wurde beobachtet, dass das Gelöstsauerstoffprofil bei jeder Kultivierung extrem unterschiedlich ausfiel, was aufgrund häufig auftretenden, verlängerten *lag*-Phasen und unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten auftrat. Aus diesem Grund war auch eine Steuerung des Zulaufs schwierig. Eine Möglichkeit der Regelung war die Nutzung der Tatsache, dass sich der Fortschritt der Kultivierung unter Verwendung des Basalmediums nach Cramer & Myers (1952) in der exponentiellen Phase mittels des pH-Wertes verfolgen ließ. Daher wurde der Zulauf mit der Basezufuhr bei pH-statisierter Kultivierung gekoppelt. Der Zulauf wies dabei eine Glucosekonzentration von 250 g L^{-1} auf, wobei durch die Erhöhung der Ammoniumkonzentration das C/N-Verhältnis beibehalten wurde. Zwar konnte dabei eine höhere Biotrockenmassekonzentration von $17,5 \text{ g L}^{-1}$ nach acht Tagen erzielt werden, jedoch war die Produktivität mit $2,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ letztendlich geringer als beim normalen Satzbetrieb (Daten nicht gezeigt).

5.1.2.1 Kurzzusammenfassung & Fazit

Obwohl in den Kultivierungen im Schüttelkolben, deren Ergebnisse in Abschnitt 5.1.1 dargestellt sind, etwas höhere Biotrockenmassekonzentrationen als im Rührkesselreaktor erzielt werden konnten, ist mit einer initialen Glucosekonzentration von 20 g L^{-1} im Letztgenannten eine Biotrockenmassekonzentration von $8,8 \text{ g L}^{-1}$ gewonnen worden. Die Paramylonselektivität ($S_{PTM/X}$) lag in der stationären Phase bei 0,81, so dass eine Paramylontrockenmassekonzentration von $7,1 \text{ g L}^{-1}$ vorlag. Die Selektivität des Produktes

α -Tocopherol war unter diesen Kultivierungsbedingungen mit $0,18 \text{ mg g}^{-1}$ verhältnismäßig gering. Aufgrund der vergleichsweise hohen Biotrockenmassekonzentration war jedoch auch die Konzentration des α -Tocopherols mit $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ relativ hoch. Die Produktivität war bei dieser satzweisen Kultivierung jedoch ziemlich gering und es konnten $2,8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Biotrockenmasse, $2,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Paramylon und $0,36 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ α -Tocopherol gewonnen werden. Dabei war die Biotrockenmasse- und Paramylontrockenmasse nach 2,5 Tagen und die α -Tocopherolproduktivität nach 4,5 Tagen am höchsten. Der Ausbeutekoeffizient bezüglich der Biotrockenmasse ($Y_{X/S}$) lag bei 0,43 und für Paramylon ($Y_{PTM/S}$) bei 0,33. Da die Bildung von α -Tocopherol nicht direkt mit der eingesetzten Substratkonzentration korreliert, wurde kein Ausbeutekoeffizient für dieses Produkt ermittelt.

Die heterotrophe, satzweise Gewinnung von Paramylon und α -Tocopherol im Rührkesselreaktor mit Glucose als Kohlenstoffquelle ermöglichte zwar hohe Paramylontrockenmassekonzentrationen, aber die α -Tocopherolkonzentration war nach einem Zeitraum von fünf Tagen eher gering. Höhere α -Tocopherolkonzentrationen wurden erst in der stationären Phase gebildet, was die Produktivitäten, welche bei satzweisen Prozessen generell gering sind, zusätzlich noch verringert. Die höchste Produktivität bezüglich Biotrockenmasse und Paramylon konnte während der exponentiellen Phase erzielt werden. Es sollte dabei jedoch bedacht werden, dass ein Teil des Substrates ungenutzt bliebe. Bei einem satzweisen Prozess sollte dieser daher erst nach vollständiger Nutzung des Substrates abgeschlossen werden, auch weil die Produktivität bezüglich α -Tocopherol zu einer späteren Wachstumsphase höher ist. Eine Möglichkeit, die Produktivität weiterhin zu steigern, stellt eine quasikontinuierliche Gewinnung dieser Produkte dar. Dies wurde untersucht und im nächsten Abschnitt beschrieben.

5.1.3 Quasikontinuierliche Kultivierung von *E. gracilis* im Rührkesselreaktor im heterotrophen Kultivierungsmodus

Ziel & Hintergrund

Das Ziel dieses Versuchs war die Erhöhung der volumetrischen Produktivität bezüglich der Produkte Paramylon und α -Tocopherol im heterotrophen Kultivierungsmodus. Um dies zu erreichen, erfolgte die Kultivierung von *E. gracilis* quasikontinuierlich in einem Rührkesselreaktor. Der Grund, weshalb die Gewinnung nicht komplett kontinuierlich erfolgte, war technisch bedingt und lag, wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, in der hohen Sedimentationsgeschwindigkeit heterotroph gewonnener *E. gracilis*-Zellen im Zusammenhang mit der geringen Wachstumsgeschwindigkeit. Um herauszufinden, welche Raumgeschwindigkeit hohe Produktivitäten gewährleistet, wurde der Organismus heterotroph in einem Rührkesselreaktor über einen Zeitraum von 85 Tagen kultiviert, wobei verschiedene Raum-

geschwindigkeiten von 0,4 bis 1,2 d⁻¹ eingesetzt wurden. Dabei sollte sich bei jeder Raumgeschwindigkeit ein stationärer Zustand einstellen, welcher über einen Zeitraum von mindestens fünf Verweilzeiten erhalten bleiben sollte, um sicherzustellen, dass mit hoher Sicherheit ein stationärer Zustand vorliegt. Dazu wurden mehrere quasikontinuierliche Fermentationen durchgeführt, wobei aufgrund der Schwierigkeit, einen solchen Prozess über einen solch langen Zeitraum axenisch zu halten, nur die in dem folgenden Abschnitt dargestellte Fermentation gezeigt und diskutiert wird.

Ergebnisse & Diskussion

Die Kultivierung erfolgte in einem 3,7 L-Rührkesselreaktor (KLF, Bioengineering, Schweiz) mit einem Arbeitsvolumen von 2 L bei 28 °C, einer Rührerdrehfrequenz von 200 bis 250 min⁻¹ und einem Überdruck von 0,1 bar. Der Luftvolumenstrom betrug je nach pO₂-Sättigung 0,2 bis 0,35 vvm und wurde bei Bedarf manuell gesteuert. Als Medium wurde das Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) mit einer Glucosemonohydratkonzentration von 22 g L⁻¹ verwendet. Es erfolgte keine pH-Statistierung. Als Inokulum wurde 10 % (v/v) einer vier Tage alten, heterotroph gewonnenen *E. gracilis*-Kultur, welche unter Verwendung des gleichen Mediums heterotroph gewonnen wurde, eingesetzt. Der quasikontinuierliche Betrieb wurde nach 86 Stunden satzweiser Kultivierung mit einer Raumgeschwindigkeit von $D=0,4$ gestartet.

In Abbildung 5.7 ist das relative pO₂- sowie das pH-Profil dargestellt. Außerdem ist in dieser Abbildung zur besseren Übersicht die Raumgeschwindigkeit, der Luftvolumenstrom und die Biotrockenmassekonzentration aufgetragen. Zu Beginn der Kultivierung wurde eine Rührerdrehfrequenz von 200 min⁻¹ verwendet, da diese Frequenz in vorherigen satzweisen Kultivierungen ausgereicht hat, um für eine homogene Durchmischung zu sorgen und um einen ausreichend hohen Sauerstoffeintrag zu gewährleisten. Aufgrund der bereits beschriebenen Scherstresssensitivität wurden auf hohe Rührerdrehfrequenzen verzichtet. Da jedoch das pO₂-Signal zu Beginn der Kultivierung unter 4 % lag, wurde der Luftvolumenstrom nach einer Prozesszeit von einem Tag von den anfänglichen 0,2 vvm auf 0,3 vvm erhöht, um nicht unter den von Kitaya *et al.* (2005) für *E. gracilis* als kritisch beschriebenen 10 % zu bleiben. Nach einer Kultivierungszeit von vier Tagen wurde der anfängliche Luftvolumenstrom von 0,2 vvm erneut eingestellt, wobei die Rührerdrehfrequenz auf 250 min⁻¹ erhöht wurde. Die Gelöstsauerstoffkonzentration fiel am zehnten Kultivierungstag erneut auf < 10 %, weshalb der Luftvolumenstrom wieder auf 0,3 vvm gesteuert wurde. Eine weitere Erhöhung des Luftvolumenstroms auf 0,35 vvm erfolgte aufgrund des geringen Sauerstoffpartialdrucks nach 30 Tagen. Bis auf ein paar kurzfristige Minima sowie Maxima wurde der Sauerstoffpartialdruck während der Zeit des quasikontinuierlichen Betriebs

jedoch zwischen etwa 20 bis 45 % gehalten, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Zellen keiner längeren Sauerstofflimitierung unterlagen.

Der pH-Wert zeigte direkt nach der Inokulierung wie erwartet einen drastischen Abfall von ca. 7 auf 3,1, stieg jedoch nach Zulaufstart aufgrund des neutralen pH-Wertes des Zulaufs auf einen Wert von etwa 3,5 an und blieb bis zum Ende der Kultivierung mit minimalen Schwankungen bei diesem Wert. Der pH-Wert wurde entgegen den Erwartungen durch die Höhe der Raumgeschwindigkeit nicht beeinflusst. Die in der Abbildung erkennbaren, kleinen periodischen Schwankungen des pH-Wertes waren auf einen circadianen Rhythmus zurückzuführen. Selbst in völliger Dunkelheit zeigt *E. gracilis* einen circadianen Rhythmus, was sich auch in den konvergenten periodischen Schwankungen im pO_2 -Profil widerspiegelt. Dass *E. gracilis* auch in Abwesenheit von Licht einem circadianen Rhythmus unterliegt, wurde bereits in der Literatur beschrieben. Zum Beispiel wurde von Kirschstein (1969) berichtet, dass auch chloroplastenfreie *E. gracilis*-Mutanten in völliger Dunkelheit bei konstanter Temperatur einen circadianen Rhythmus aufweisen. Edmunds (1988) hat sogar mehrere circadiane Rhythmen bei chloroplastenfreien *E. gracilis*-Stämmen beschrieben. Dieses interessante Phänomen wurde bei sämtlichen Kultivierungen von *E. gracilis* beobachtet. In dieser Arbeit wurde jedoch nicht weiter darauf eingegangen.

Der Plot in Abbildung 5.8 zeigt die Biotrockenmasse-, Substrat- und die Paramylon-trockenmassekonzentration sowie die Paramylonselektivität, welche bei dieser Kultivierung erzielt wurden. Bis der Zulauf am vierten Kultivierungstag gestartet wurde, glich der Prozess einer Satzkultivierung, bei der eine Biotrockenmassekonzentration von $6,1 \text{ g L}^{-1}$ erreicht wurde. Die Substratkonzentration, welche nach der Inokulation $18,5 \text{ g L}^{-1}$ betrug, hatte zu diesem Zeitpunkt eine Abnahme auf $7,4 \text{ g L}^{-1}$ zu verzeichnen. Der Zulauf wurde bewusst in der exponentiellen Phase der Satzkultivierung gestartet. Die Biotrockenmassekonzentration im Reaktor nahm in den ersten zwei Tagen nach Beginn des Zulaufs ab, da sich die Zellen zunächst auf den quasikontinuierlichen Betrieb adaptieren mussten. Dies spiegelte sich auch in einer Zunahme der Substratkonzentration wider. Somit kam es zu einer teilweisen Auswaschung der Zellen aus dem Fermenter, weil die relative Wachstumsgeschwindigkeit zu diesem Zeitpunkt geringer war als die Raumgeschwindigkeit, was in einem Minimum der Biotrockenmasse von $3,8 \text{ g L}^{-1}$ am sechsten Kultivierungstag resultierte. Weil die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit nach erfolgter Adaptation größer war als die Raumgeschwindigkeit, folgte erneut ein Anstieg der Biotrockenmassekonzentration bis zum dreizehnten Kultivierungstag. Ab diesem Zeitpunkt wurden bis zur Erhöhung der Raumgeschwindigkeit am 24. Kultivierungstag relativ konstante Werte für die Biotrockenmassekonzentration zwischen $8,9 \text{ g L}^{-1}$ und $9,7 \text{ g L}^{-1}$ gemessen. Als Mittelwert

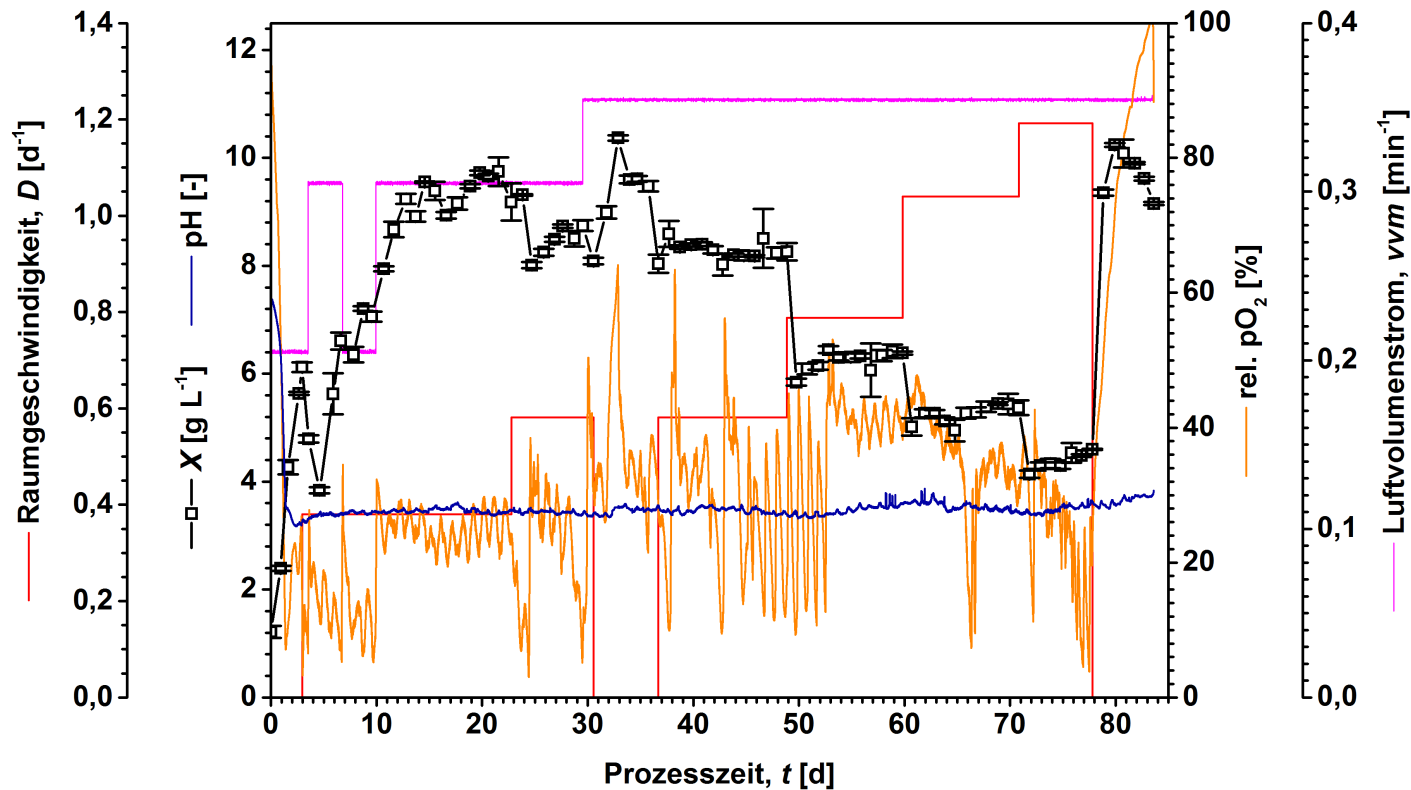


Abbildung 5.7: pH-Wert und relativer Sauerstoffpartialdruck bei heterotropher, quasikontinuierlicher Kultivierung von *E. gracilis* im 3,7 L-Rührkesselreaktor über einen Zeitraum von 85 Tagen bei verschiedenen Raumgeschwindigkeiten im Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) mit 20 g L^{-1} Glucose. Zum Vergleich ist zudem die Biotrockenmassekonzentration sowie die Raumgeschwindigkeit und der Luftvolumenstrom dargestellt. Kultivierungsparameter: Temperatur: $28 \text{ }^\circ\text{C}$, Überdruck: $0,1 \text{ bar}$, Luftvolumenstrom: $0,2 - 3,5 \text{ vvm}$, Arbeitsvolumen: 2 L , Rührerdrehfrequenz $200 \text{ bis } 250 \text{ min}^{-1}$. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen von X dar ($n=3$).

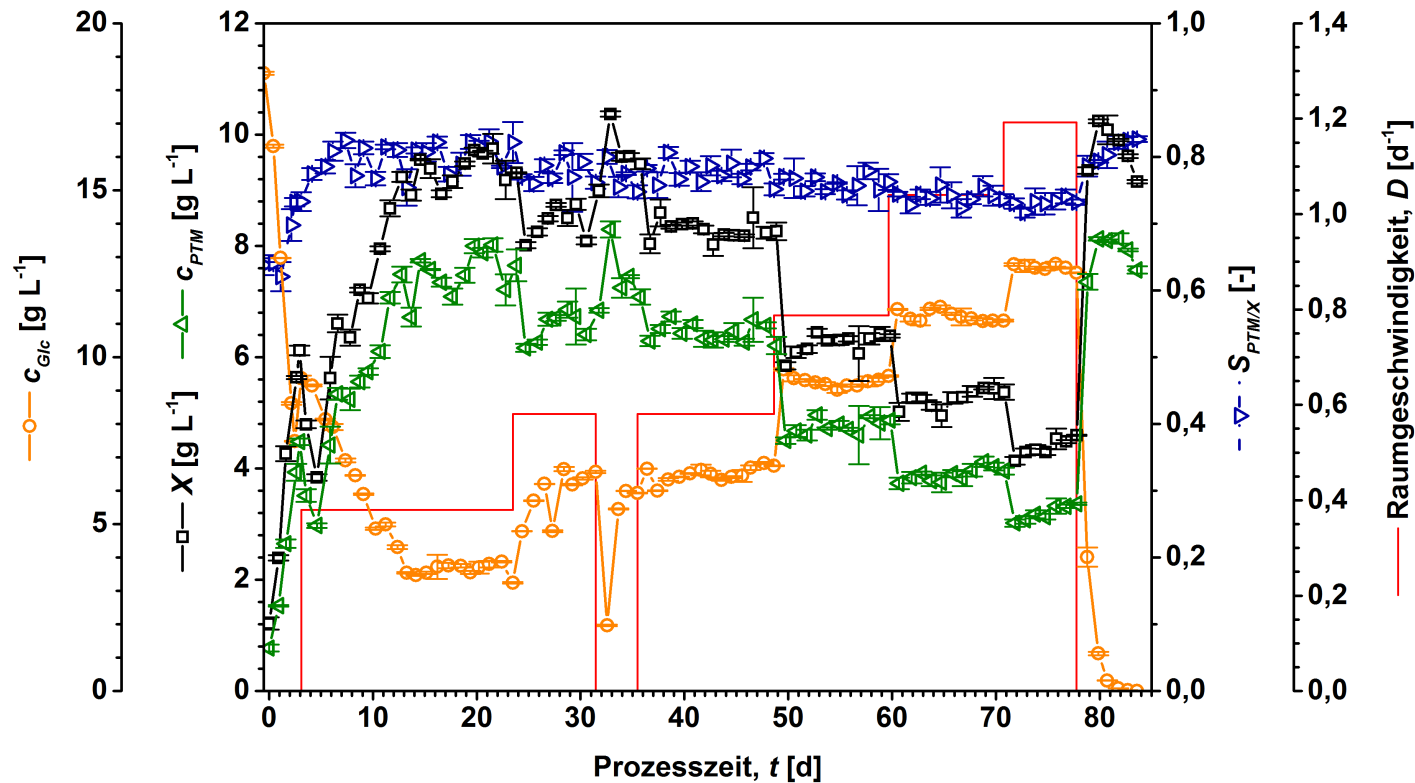


Abbildung 5.8: Verlauf der Biotrockenmassekonzentration, Paramylontrockenmassekonzentration, Paramylonselektivität und Glucosekonzentration bei heterotropher, quasikontinuierlicher Kultivierung von *E. gracilis* im 3,7 L-Rührkesselreaktor über einen Zeitraum von 85 Tagen bei verschiedenen Raumgeschwindigkeiten im Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) mit 20 g L⁻¹ Glucose. Zur besseren Übersicht ist zudem die Raumgeschwindigkeit dargestellt. Kultivierungsparameter: Temperatur: 28 °C, Überdruck: 0,1 bar, Luftvolumenstrom: 0,2 – 3,5 vvm, Arbeitsvolumen: 2 L, Rührerdrehfrequenz 200 bis 250 min⁻¹. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar (n=3).

der letzten fünf Tage bei dieser Raumgeschwindigkeit wurde $9,6 \text{ g L}^{-1}$ berechnet. Die Substratkonzentration betrug in diesem Zeitraum durchschnittlich $3,3 \text{ g L}^{-1}$.

Direkt nach Erhöhung der Raumgeschwindigkeit auf $0,58 \text{ d}^{-1}$ fiel die Biotrockenmassekonzentration auf 8 g L^{-1} . Nach einer kurzen Adaptationszeit stieg der Wert leicht an und lag daraufhin bei etwa $8,5 \text{ g L}^{-1}$, war jedoch leichten Schwankungen unterworfen. Während dieser Raumgeschwindigkeit war das Medium im Vorlagetank des Zulaufs aufgebraucht und musste ausgetauscht werden. Nach dem Austausch wurde festgestellt, dass im Vorlagetank eine Kontamination aufgetreten war, was durch Trübung des Mediums in der 2 L-Borosilikatflasche auffiel. Die Kontamination wurde zwar nicht in den Fermenter eingebracht, es mussten jedoch zunächst 50 L frisches Medium angesetzt, sterilisiert und abkühlen gelassen werden. Aus diesem Grund konnte kein Zulauf zwischen dem 32. und 35. Kultivierungstag erfolgen, was in einer Zunahme der Biotrockenmassekonzentration auf $10,3 \text{ g L}^{-1}$ resultierte. Das Substrat war zu diesem Zeitpunkt fast aufgebraucht, so dass eine Konzentration von 2 g L^{-1} vorlag. Nach erneutem Zulaufstart bei der zuvor eingestellten Raumgeschwindigkeit fiel die Biotrockenmassekonzentration erneut auf 8 g L^{-1} und stieg daraufhin auf durchschnittlich $8,3 \text{ g L}^{-1}$ an, bis die Raumgeschwindigkeit am 48. Kultivierungstag auf $0,79 \text{ d}^{-1}$ erhöht wurde. Die Substratkonzentration im Fermenter betrug zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich $6,6 \text{ g L}^{-1}$. Diese Änderung in der Raumgeschwindigkeit führte zu einer Verringerung der Biotrockenmassekonzentration um 29 % auf $5,8 \text{ g L}^{-1}$. In den darauffolgenden Tagen nahm dieser Wert jedoch leicht zu und es wurde eine durchschnittliche Biotrockenmassekonzentration von $6,3 \text{ g L}^{-1}$ sowie eine mittlere Substratkonzentration von $9,3 \text{ g L}^{-1}$ an den letzten Tagen dieser Raumgeschwindigkeit gemessen. Eine weitere Erhöhung der Raumgeschwindigkeit auf $1,04 \text{ d}^{-1}$ erfolgte am 60. Kultivierungstag. Die Biotrockenmassekonzentration sank auf 5 g L^{-1} ab und stieg daraufhin auf einen durchschnittlichen Wert von $5,4 \text{ g L}^{-1}$ an. Die Substratkonzentration lag zu diesem Zeitpunkt der Kultivierung bei durchschnittlich $11,1 \text{ g L}^{-1}$. Auch bei einer weiteren Erhöhung der Raumgeschwindigkeit auf $1,19 \text{ d}^{-1}$ war der Punkt der Zellauswaschung noch nicht erreicht und es konnten im Mittel Biotrockenmassekonzentrationen von $4,5 \text{ g L}^{-1}$ verzeichnet werden, wobei das nicht umgesetzte Substrat eine Konzentration von $12,7 \text{ g L}^{-1}$ annahm. Direkt nach Erhöhung der Raumgeschwindigkeit war ebenfalls eine geringere Biotrockenmassekonzentration gemessen worden, als nach einer kurzen Adaptationszeit. Nachdem der Zulauf gestoppt wurde, was wie zu Beginn dieser Kultivierung einer Satzkultivierung entsprach, wurde eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $10,2 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Das Substrat wies zu diesem Zeitpunkt eine Konzentration von $1,3 \text{ g L}^{-1}$ auf, wurde jedoch in den letzten vier Tagen dieser Satzphase trotz abnehmender Biotrockenmassekonzentration vollständig aufgebraucht, was auf den Erhaltungsstoffwechsel von *E. gracilis* zurückzuführen war. Der höchste Wert der Biotrockenmassekonzentration am

Ende der Satzphase war vergleichbar mit jenem Wert, welcher in der Zulaufpause am 33. Kultivierungstag verzeichnet worden war.

In Abbildung 5.9 sind die Biotrockenmasse- und die Substratkonzentration gegen die Raumgeschwindigkeit aufgetragen. Die Punkte ergaben sich aus den Mittelwerten der letzten fünf Messungen vor Änderung der Raumgeschwindigkeit. In beiden Fällen scheint eine lineare Korrelation gegeben zu sein, was aus dem hohen Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,98$ für die Biotrockenmassekonzentration bzw. $R^2=0,99$ für die Substratkonzentration hervorgeht. Die Erhöhung der Raumgeschwindigkeit um $0,1 \text{ d}^{-1}$ resultierte demnach in einer Abnahme der Biotrockenmassekonzentration um $0,61 \text{ g L}^{-1}$, wobei jedoch die Substratkonzentration bei gleicher Erhöhung der Raumgeschwindigkeit eine Zunahme von etwa $1,1 \text{ g L}^{-1}$ zeigte. Die hohen Glucosekonzentrationen im Ablauf, auch bei niedrigen Raumgeschwindigkeiten, zeugen von einer geringen Substratspezifität von *E. gracilis* gegenüber Glucose. Die lineare Abnahme mit Erhöhung der Raumgeschwindigkeit zeugt davon, dass es sich hierbei um eine Reaktion 1. Ordnung handelt.

Die Regressionsgerade in Abbildung 5.9 (a) schneidet die Ordinate bei $11,69 \text{ g L}^{-1}$, was bei einer exakten Linearität bedeuten würde, dass bei einer Raumgeschwindigkeit von $D=0$ eine Biotrockenmassekonzentration von $11,69 \text{ g L}^{-1}$ vorliegen müsste, was in etwa der Konzentration zu Beginn der stationären Phase einer Satzkultivierung im Schüttelkolbenmaßstab entsprach. Nach dem Zulaufstopp am Ende der Kultivierung wurde jedoch eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $10,2 \text{ g L}^{-1}$ erzielt. Dieser Wert ist etwas geringer als jener, welcher unter Satzbedingungen im Schüttelkolben (vgl. Abschnitt 5.1.1.2) verzeichnet werden konnte.

Im Vergleich zu Schüttelkolbenkultivierungen wurden in Rührkesselreaktoren, wie in Abschnitt 5.1.2 bereits beschrieben, jedes Mal etwas geringere Biotrockenmassekonzentrationen erzielt. In diesem Fall wäre eine weitere Erklärung dafür, dass die beobachtete Linearität bezüglich D und X bei sehr niedrigen Verweilzeiten nicht mehr gegeben war. Wäre eine Linearität jedoch bei hohen Raumgeschwindigkeiten gegeben, würde dies bedeuten, dass sich die Raumgeschwindigkeit bis etwa $D=1,9$ erhöhen ließe, da die Regressionsgerade in Bezug auf die Biotrockenmassekonzentration an dieser Stelle die Abszisse schneidet. Dies entspricht auch etwa dem Punkt der Regressionsgeraden bezüglich der Substratkonzentration (Abb. 5.9 (b)), welche bei einer Raumgeschwindigkeit von $1,87$ der initialen Glucosekonzentration von 20 g L^{-1} entspricht. Aufgrund der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit von $1,61 \text{ d}^{-1}$, welche in Abschnitt 5.1.2 beschrieben wurde, kann davon ausgegangen werden, dass eine Raumgeschwindigkeit von $> 1,6$ vermutlich eine Zellausspülung bewirken würde. Die Raumgeschwindigkeit wurde jedoch nicht bis zum Punkt der Zellausspülung erhöht, so dass diesbezüglich nur spekuliert werden konnte.

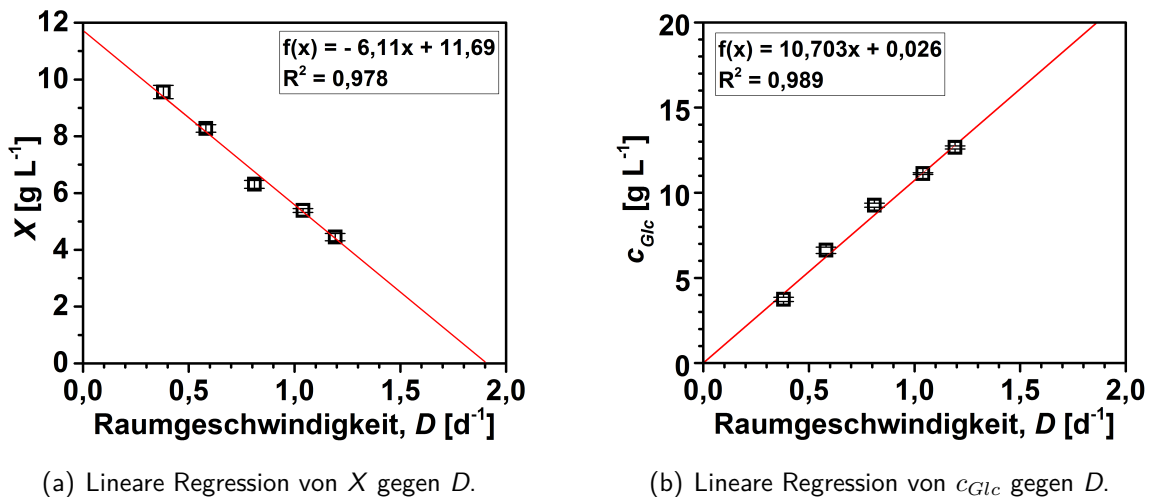
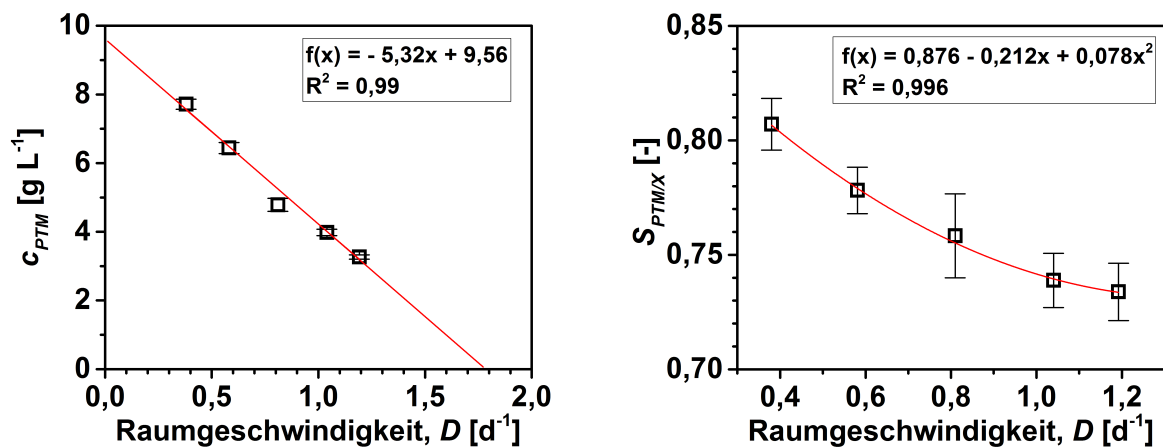


Abbildung 5.9: Zusammenhang zwischen Biotrockenmassekonzentration und Raumgeschwindigkeit (a) bzw. Substratkonzentration und Raumgeschwindigkeit (b). Mittelwerte der letzten fünf Messung vor Änderung der Raumgeschwindigkeit. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar ($n=5$). Siehe Abbildung 5.8 für weitere Informationen.

5.1.3.1 Quasikontinuierliche Gewinnung von Paramylon

Der Verlauf der Paramylontrockenmassekonzentration, welcher ebenfalls in Abbildung 5.8 dargestellt ist, verlief in etwa parallel zur Biotrockenmassekonzentration, da die Paramylonselektivität nur geringe Schwankungen aufwies und somit von der Raumgeschwindigkeit nur geringfügig beeinflusst wurde. Während des gesamten quasikontinuierlichen Betriebs lag die Selektivität zwischen 0,72 und 0,82. In der Satzphase zu Beginn der Kultivierung betrug diese zwischen 0,64 und 0,73. Zu jedem stationären Zustand der eingesetzten Raumgeschwindigkeiten wurde jeweils der Mittelwert der Paramylontrockenmassekonzentration sowie der Selektivität der letzten fünf Messungen bestimmt, gegen die Raumgeschwindigkeit aufgetragen und die Regression berechnet. Diese Zusammenhänge sind in den Abbildungen 5.10 (a) und (b) dargestellt.

In Bezug auf die Paramylontrockenmassekonzentration war dieser Zusammenhang linear, was das Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,99$ belegte. Mit einer Erhöhung der Raumgeschwindigkeit um $0,1 \text{ d}^{-1}$ sank die Paramylontrockenmassekonzentration um $0,53 \text{ g L}^{-1}$. Im Gegensatz dazu schien die Anpassung in Bezug auf die Selektivität für den Bereich der angewandten Raumgeschwindigkeiten exponentiell, was durch das ebenfalls hohe Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,996$ bestätigt wurde. Dies ließe sich dadurch erklären, dass selbst bei sehr hohen Raumgeschwindigkeiten ein gewisser Teil der Glucose in Form von Paramylon gespeichert würde. Mit steigender Raumbelastung nahm die Selektivität von 0,81 bei $D=0,4 \text{ d}^{-1}$ auf 0,73 bei $D=1,2 \text{ d}^{-1}$ ab.



(a) Lineare Regression der Paramylontrockenmassekonzentration gegen D .

(b) Nichtlineare Regression der Paramylonselektivität gegen D .

Abbildung 5.10: Zusammenhang zwischen Paramylontrockenmassekonzentration und Raumgeschwindigkeit (a) bzw. Paramylonselektivität und Raumgeschwindigkeit (b). Mittelwerte der letzten fünf Messung vor Änderung der Raumgeschwindigkeit. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar ($n=5$). Siehe Abbildung 5.8 für weitere Informationen.

5.1.3.2 Quasikontinuierliche Gewinnung von α -Tocopherol

Abbildung 5.11 zeigt den Verlauf der α -Tocopherolkonzentration und -selektivität. Zu Beginn der initialen Satzphase sank die Selektivität nach 72 Stunden auf ein Minimum von $0,02 \text{ mg g}^{-1}$. Auch hier konnte die von Ogbonna *et al.* (1998) beschriebene Abnahme der α -Tocopherolselektivität während der exponentiellen Phase beobachtet werden. Nach Start der quasikontinuierlichen Kultivierung nahm die Selektivität stetig zu, bis eine mittlere Selektivität von $0,2 \text{ mg g}^{-1}$ bei einer Raumgeschwindigkeit von $D=0,39 \text{ d}^{-1}$ erreicht wurde. Nach jeder Erhöhung der Raumgeschwindigkeit war eine Abnahme der Selektivität zu beobachten, so dass bei einer Raumgeschwindigkeit von $D=1,19 \text{ d}^{-1}$ nur noch eine mittlere Selektivität von $0,1 \text{ mg g}^{-1}$ erreicht werden konnte. Aufgrund der geringeren Biotrockenmassekonzentration bei höheren Raumgeschwindigkeiten nahm auch die α -Tocopherolkonzentration mit zunehmender Raumgeschwindigkeit ab. Wegen der hohen Biotrockenmassekonzentration und α -Tocopherolselektivität war die α -Tocopherolkonzentration bei einer Raumgeschwindigkeit von $D=0,39 \text{ d}^{-1}$ mit $1,9 \text{ mg L}^{-1}$ während des quasikontinuierlichen Betriebs am höchsten.

Die Relationen zwischen α -Tocopherolkonzentration und Raumgeschwindigkeit bzw. α -Tocopherolselektivität und Raumgeschwindigkeit sind in den Abbildungen 5.12 (a) und (b) gezeigt. Zu jedem stationären Zustand bei entsprechender Raumgeschwindigkeit wurde jeweils der Mittelwert der α -Tocopherolkonzentration bzw. -selektivität der letzten fünf Messungen bestimmt, gegen die Raumgeschwindigkeit aufgetragen und die Regression

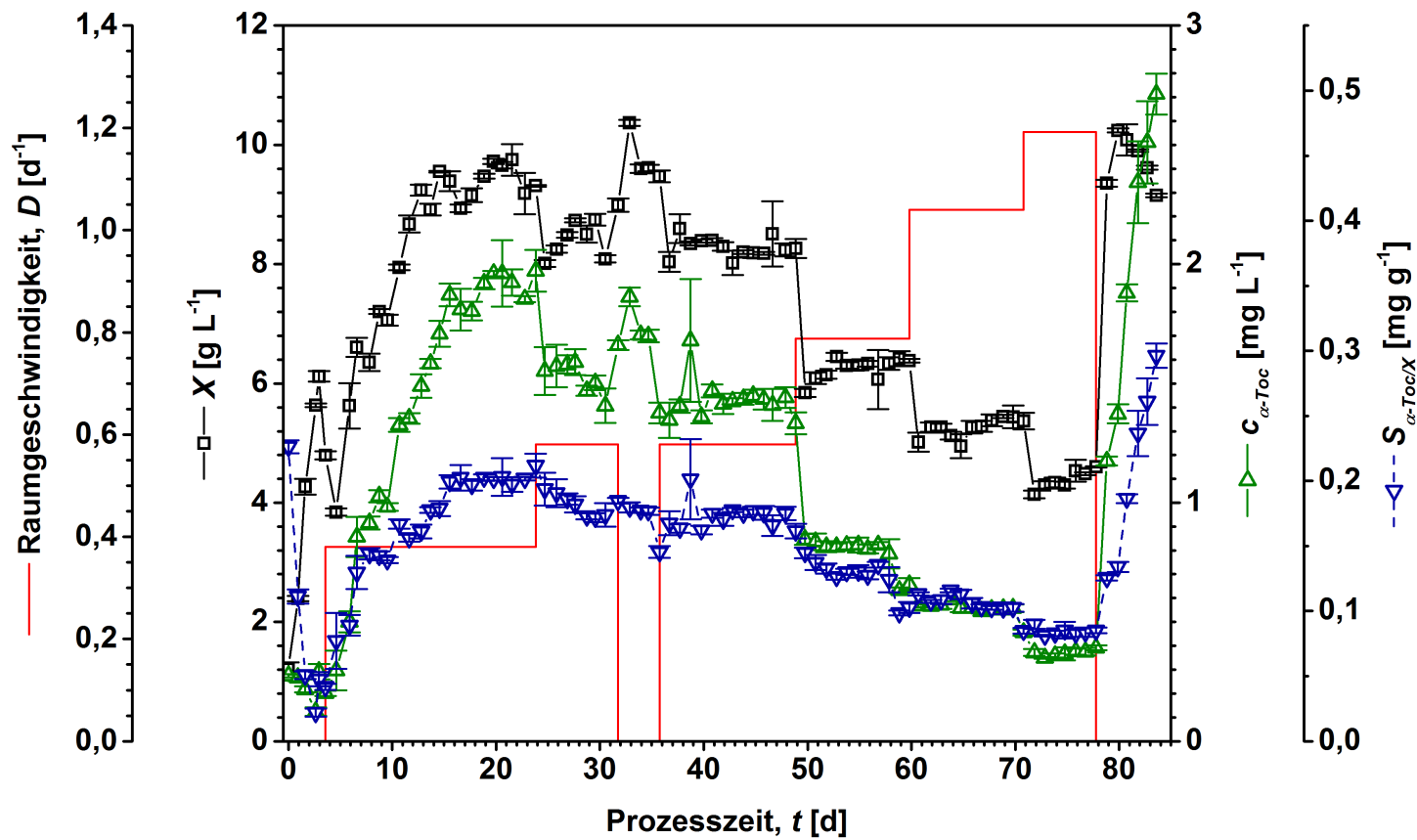
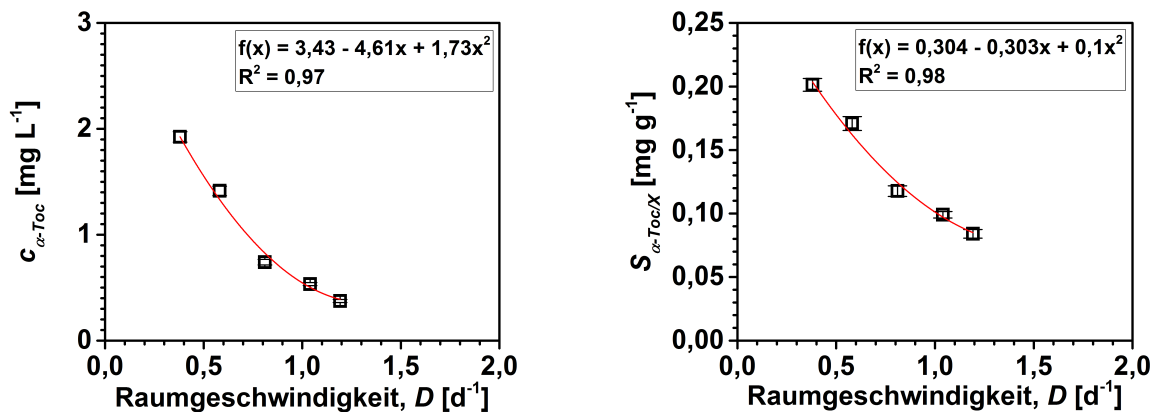


Abbildung 5.11: Verlauf der α -Tocopherolkonzentration und -selektivität bei heterotropher, quasikontinuierlicher Kultivierung von *E. gracilis* im 3,7 L-Rührkesselreaktor über einen Zeitraum von 85 Tagen bei verschiedenen Raumgeschwindigkeiten im BasalmEDIUM nach Cramer & Myers (1952) mit 20 g L^{-1} Glucose. Zur besseren Übersicht ist zudem die Biotrockenmassekonzentration dargestellt. Kultivierungsparameter: Temperatur: $28 \text{ }^\circ\text{C}$, Überdruck: $0,1 \text{ bar}$, Luftvolumenstrom: $0,2$ bis $3,5 \text{ vvm}$, Arbeitsvolumen: 2 L , Rührerdrehfrequenz 200 bis 250 min^{-1} . Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar ($n=3$).

berechnet. Sowohl für die Konzentration, als auch für die Selektivität scheint der Zusammenhang exponentiell zu sein, was durch das hohe Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,97$ bezüglich der Konzentration (Abb. 5.12 (a)) bzw. $R^2=0,98$ im Fall der Selektivität (Abb. 5.12 (b)) unterlegt wird. Auch in diesem Fall scheint ein exponentieller Zusammenhang bezüglich Konzentration und Selektivität nur für die eingesetzten Raumgeschwindigkeit möglich zu sein. Im Fall der einer linearen Anpassung läge das Bestimmtheitsmaß bei $R^2=0,88$.



(a) Nichtlineare Regression der α -Tocopherolkonzentration bei verschiedenen Raumgeschwindigkeiten.

(b) Nichtlineare Regression der α -Tocopherolselektivität bei verschiedenen Raumgeschwindigkeiten.

Abbildung 5.12: Zusammenhang zwischen α -Tocopherolkonzentration und Raumgeschwindigkeit (a) bzw. α -Tocopherolselektivität und Raumgeschwindigkeit (b). Mittelwerte der letzten fünf Messung vor Änderung der Raumgeschwindigkeit. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar ($n=5$). Siehe Abbildung 5.11 für weitere Informationen.

5.1.3.3 Produktivitäten und Ausbeutekoeffizienten bei quasikontinuierlicher Gewinnung von *E. gracilis*

Zur Bewertung dieser Kultivierung wurde die volumetrische Produktivität in Bezug auf die Biotrockenmasse sowie auf die Produkte Paramylon und α -Tocopherol berechnet. Dieser Zusammenhang ist in Tabelle 5.5 dargestellt. Obwohl die jeweiligen Konzentrationen mit steigender Raumgeschwindigkeit stetig geringer wurden, zeigten die Produktivitäten einen anderen Verlauf und wiesen Maxima auf. Während bei einer Raumgeschwindigkeit von $0,39 d^{-1}$ nur $3,7 g L^{-1} d^{-1}$ Biotrockenmasse gewonnen werden konnte, wurde bei einer Raumgeschwindigkeit von $1,04 d^{-1}$ eine maximale Produktivität von $5,6 g L^{-1} d^{-1}$ erzielt. Bei weiterer Erhöhung der Raumgeschwindigkeit nahm die Produktivität auf $5,3 g L^{-1} d^{-1}$ ab. Die Produktivität in Bezug auf Paramylon zeigte einen analogen Verlauf und wies ein Produktivitätsmaximum von $4,1 g L^{-1} d^{-1}$ bei der selben Raumgeschwindigkeit des Maximums der Biotrockenmasseproduktivität auf. Die höchste Produktivität in Bezug auf α -Tocopherol, welche $0,82 mg L^{-1} d^{-1}$ betrug, wurde bei einer Raumgeschwindigkeit

Tabelle 5.5: Tabellarische Darstellung der Mittelwerte sowie der Standardabweichungen ($n=5$) für die letzten fünf Tage für verschiedene Raumgeschwindigkeiten. Gezeigt sind die Biotrockenmassekonzentration und -produktivität, die Glucosekonzentration sowie die Konzentrationen und Produktivitäten in Bezug auf die Produkte Paramylon und α -Tocopherol. Die dargestellten Produktivitäten wurden in Bezug auf den Kultivierungsbeginn berechnet. Siehe Abbildungen 5.8 und 5.11 für weitere Informationen.

D [d ⁻¹]	X [g L ⁻¹]	$L_{V,X}$ [g L ⁻¹ d ⁻¹]	c_{Glc} [g L ⁻¹]	c_{PTM} [g L ⁻¹]	$L_{V,PTM}$ [g L ⁻¹ d ⁻¹]	$c_{\alpha-Toc}$ [mg L ⁻¹]	$L_{V,\alpha-Toc}$ [mg L ⁻¹ d ⁻¹]
0,39	9,6±0,23	3,7±0,09	3,4±0,12	7,7±0,15	3,0±0,14	1,92±0,05	0,75±0,02
0,58	8,3±0,13	4,8±0,08	6,6±0,19	6,4±0,16	3,7±0,11	1,41±0,05	0,82±0,03
0,79	6,3±0,14	5,0±0,11	9,3±0,12	4,8±0,19	3,8±0,10	0,74±0,03	0,58±0,07
1,04	5,4±0,07	5,6±0,07	11,1±0,05	4,0±0,09	4,1±0,11	0,53±0,01	0,55±0,05
1,19	4,5±0,13	5,3±0,15	12,7±0,09	3,3±0,06	3,9±0,12	0,37±0,01	0,45±0,01

von 0,58 d⁻¹ erzielt. Bei einer weiteren Erhöhung der Raumgeschwindigkeit nahm die Raum-Zeit-Ausbeute für das Produkt α -Tocopherol stetig ab.

Im Vergleich zu der in Abschnitt 5.1.2 beschriebenen Satzkultivierung im Rührkesselreaktor konnte die Produktivität deutlich gesteigert werden. Die Produktivität bezüglich der Biotrockenmassekonzentration betrug nach viertägiger Satzkultivierung 2,2 g L⁻¹ d⁻¹. Bei einer Raumgeschwindigkeit von 1 d⁻¹ betrug diese 5,6 g L⁻¹ d⁻¹, was einer Steigerung von 250 % entspricht. Bezüglich der Produkte konnte eine Steigerung von 230 % Paramylon bzw. 210 % α -Tocopherol durch den quasikontinuierlichen Betrieb erzielt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Bewertung dieser quasikontinuierlichen Kultivierung war die Berechnung der Ausbeutekoeffizienten. Aufgrund der Tatsache, dass die Gewinnung von α -Tocopherol im Gegensatz zu Paramylon nicht unmittelbar mit der Konzentration an supplementierter Kohlenstoffquelle im Zusammenhang steht, eignete sich der Ausbeutekoeffizient nicht für die Bewertung der α -Tocopherolgewinnung. Wie der Tabelle 5.5 zu entnehmen ist, nahm die Produktivität in Bezug auf die Bio- und Paramylontrockenmasse zwar bis zu einer Erhöhung der Raumgeschwindigkeit auf 1,04 d⁻¹ stetig zu, aber auch die Konzentration an ungenutzter Glucose stieg mit jeder Erhöhung der Raumgeschwindigkeit. Aus diesem Grund war der Anteil an nicht metabolisierter Glucose bei höheren Raumgeschwindigkeiten höher, was in Bezug auf die Ökonomie beachtet werden sollte.

Abbildung 5.13 zeigt den Zusammenhang zwischen Raumgeschwindigkeit und Ausbeutekoeffizienten in Bezug auf Biotrockenmasse und Paramylontrockenmasse. Bei Betrachtung der Ausbeutekoeffizienten wird deutlich, dass bei höheren Raumgeschwindigkeiten die Ausbeute in Bezug auf das eingesetzte Substrat aufgrund des ungenutzten Substrats im Ablauf deutlich abnimmt. Bei einer Raumgeschwindigkeit von ca. 0,4 d⁻¹ wurde 48 % des Substrats in Biotrockenmasse bzw. 39 % in Paramylontrockenmasse konvertiert. Diese

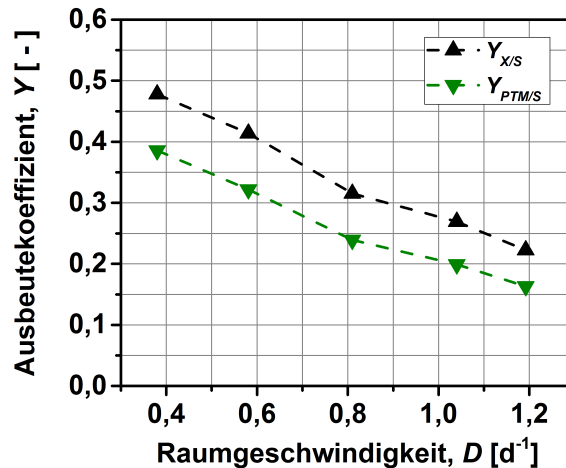


Abbildung 5.13: Ausbeutekoeffizienten in Bezug auf Biotrockenmasse ($Y_{X/S}$) und Paramylontrockenmasse ($Y_{PTM/S}$) bei heterotropher, quasikontinuierlicher Kultivierung von *E. gracilis* im 3,7 L-Rührkesselreaktor bei verschiedenen Raumgeschwindigkeiten im Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) mit 20 g L^{-1} Glucose. Kultivierungsparameter: Temperatur: $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, Überdruck: $0,1 \text{ bar}$, Luftvolumenstrom: $0,2$ bis $3,5 \text{ vvm}$, Arbeitsvolumen: 2 L , Rührerdrehfrequenz 200 bis 250 min^{-1} .

Werte sind in etwa analog zu denen, welche während der Satzphase zum Ende der Kultivierung erreicht wurden. Daraus konnte abgeleitet werden, dass der Ausbeutekoeffizient bei allen Raumgeschwindigkeiten $\leq 0,4 \text{ d}^{-1}$ in etwa konstant zu sein schien. Bei einer Raumgeschwindigkeit von ca. $1,2 \text{ d}^{-1}$ konnte nur noch 22% Biotrockenmasse bzw. 16% Paramylontrockenmasse pro eingesetzte Substratmasse erzielt werden. Ein Ausbeutekoeffizient von $0,61$, welcher in der satzweisen Kultivierung im Schüttelkolben (vgl. Abschnitt 5.1.1.2) erzielt wurde, wurde auch bei dieser Kultivierung nicht erreicht. Aus der Abbildung 5.13 wird ebenfalls ersichtlich, dass die Abnahme in etwa linear verlief. Dies war ebenfalls als Nachweis anzusehen, dass die Substrataffinität von *E. gracilis* zu Glucose ziemlich gering ist.

In der Literatur wurde bisher sehr wenig über die kontinuierliche Betriebsweise mit *E. gracilis* im heterotrophen Kultivierungsmodus beschrieben, was eine vergleichende Diskussion erschwert. In einer Studie von Ogbonna *et al.* (1999) wurde jedoch ein Prozess beschrieben, in dem eine kontinuierliche Gewinnung von *E. gracilis* zunächst heterotroph und im Anschluss, in einer zweiten Stufe, photoheterotroph kultiviert wurde. Zwar erfolgte die Gewinnung in der heterotrophen Stufe ebenfalls in einem Rührkesselreaktor mit gleichem Arbeitsvolumen im selben Medium, aber es wurde Ethanol mit einer Konzentration von 8 g L^{-1} als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Ein weiterer, wesentlicher Unterschied lag in der Dauer der Kultivierung und in der Raumgeschwindigkeit. In dem Fall von Ogbonna *et al.* (1999) wurde nur eine einzige Raumgeschwindigkeit von $0,34 \text{ d}^{-1}$ appliziert. Die Kultivierungsdauer insgesamt betrug $17,5$ Tage, wobei der Zu- und Ablauf bereits nach zwei Tagen gestartet wurde. In der heterotrophen Stufe wurde eine Biotrockenmassekonzentration von $1,5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht.

zentration von 7 g L^{-1} erreicht, was einen Ausbeutekoeffizienten ($Y_{X/S}$) von 0,88 ergibt. Solch hohe Ausbeutekoeffizienten konnten während des hier dargestellten Versuchs nicht erreicht werden, wobei jedoch eine andere Kohlenstoffquelle eingesetzt wurde. Im Hinblick auf Ausbeutekoeffizienten bei anderen Mikroorganismen, welche mit Werten zwischen 0,38 und 0,68 für Glucose und Ethanol angegeben werden (Nagai, 1979), erscheint die von Ogbonna *et al.* (1999) beschriebene Substratausbeute von 88 % viel zu hoch, wohingegen die bei diesem Versuch erzielten Ausbeutekoeffizienten zwar verhältnismäßig geringe, jedoch nachvollziehbare Werte darstellen.

5.1.3.4 Kurzzusammenfassung & Fazit

In Abschnitt 5.1.2 wurde gezeigt, dass die Produktivität in Bezug auf die Produkte α -Tocopherol und Paramylon bei einer satzweisen, heterotrophen Gewinnung im Rührkesselreaktor mit $2,8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Biotrockenmasse, $2,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Paramylon und $0,36 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ α -Tocopherol relativ gering war. Die höchste Produktivität in Bezug auf die Biotrockenmasse und Paramylontrockenmasse war dabei nach 2,5 Tagen und die für α -Tocopherol nach 4,5 Tagen am höchsten.

Die Produktivität ließ sich dadurch steigern, indem die Gewinnung der Biomasse quasikontinuierlich in einem Rührkesselreaktor erfolgte. Während eines 85-tägigen, heterotrophen Prozesses, welcher über diesen langen Zeitraum axenisch gehalten werden konnte, wurden unterschiedliche Raumgeschwindigkeiten eingesetzt und die Produktivitäten zu jeder Raumgeschwindigkeit ermittelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Produktivität bezüglich der Biotrockenmasse und der Produkte erheblich gesteigert werden konnte und bei einer Raumgeschwindigkeit von 1 d^{-1} mit $5,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Biotrockenmasse und $4,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Paramylon am höchsten war. Die höchste Produktivität bezüglich des Produktes α -Tocopherol konnte bei einer Raumgeschwindigkeit von $0,6 \text{ d}^{-1}$ mit $0,82 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erzielt werden. Bei diesem Prozess wurde jedoch beobachtet, dass mit steigender Raumgeschwindigkeit auch die Ausbeutekoeffizienten in Bezug auf das Substrat sank, was bei einer wirtschaftlichen Betrachtung bilanziert werden sollte. Die Ausbeutekoeffizienten bei $D=1 \text{ d}^{-1}$ für die Biotrockenmasse ($Y_{X/S}$) betrug 0,27 und für Paramylon ($Y_{PTM/S}$) 0,2.

Die quasikontinuierliche Gewinnung von *E. gracilis*-Biomasse und der Produkte α -Tocopherol und Paramylon bei heterotropher Betriebsweise verspricht hohe Produktivitäten. Dabei sollte allerdings beachtet werden, dass im photoautotrophen und photoheterotrophen Modus höhere α -Tocopherolkonzentrationen aufgrund höherer Selektivitäten erreicht werden können. Es konnte vor allem gezeigt werden, dass eine quasikontinuierliche, heterotrophe Betriebsweise mit Glucose als Kohlenstoffquelle möglich ist, da ein solcher Prozess bisher noch nicht beschrieben wurde. Auch eine heterotrophe, quasikontinuierliche

Fermentation mit unterschiedlichen Raumgeschwindigkeiten, ist in der Literatur nicht zu finden.

Es konnte gezeigt werden, dass selbst bei einer hohen Raumgeschwindigkeit von $1,2 \text{ d}^{-1}$ stationäre Zustände möglich sind. Ob sich die Raumgeschwindigkeit noch viel weiter steigern ließe, wurde nicht untersucht. Aufgrund dieser extrem lang andauernden Kultivierung von 85 Tagen, wobei sichergestellt werden sollte, dass sich für jede Raumgeschwindigkeit ein stationärer Zustand eingestellt hat und über einen Zeitraum von fünf Verweilzeiten aufrecht erhalten wurde, konnten keine sehr geringen und keine höhere Raumgeschwindigkeit mehr getestet werden. Die Daten konnten jedoch zeigen, dass die Produktivität und die Substratausbeute schon bei einer Raumgeschwindigkeit von $1,2 \text{ d}^{-1}$ geringer war, als bei niedrigeren Raumgeschwindigkeiten. Dies lässt den Schluss zu, dass höhere Raumgeschwindigkeiten noch geringere Produktivitäten und Substratausbeuten gewährleisten würden. Dass auch bei niedrigen Raumgeschwindigkeiten eine nicht unerhebliche Restkonzentration an Glucose im Ablauf gemessen wurde, zeugt von einer geringen Substratspezifität von *E. gracilis* gegenüber Glucose. Somit sollte die quasikontinuierliche Betriebsweise aus ökonomischen Gründen zur effizienteren Nutzung des Substrats besser als Rührkesselkaskade betrieben werden.

Da die Selektivität bezüglich Paramylon während des gesamten quasikontinuierlichen Prozesses mit 0,72 und 0,82 relativ konstant war, zeigten auch die Ausbeutekoeffizienten und Produktivitäten einen konvergenten Verlauf zur Biotrockenmasse. Für eine hohe Biomasse- und Paramylonproduktivität würde sich eine Raumgeschwindigkeit von 1 d^{-1} anbieten, wobei $5,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Biomasse generiert werden kann, welche zu ca. 75 % aus dem Produkt Paramylon besteht. Dies entspricht einer Paramylonproduktivität von $4,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Im Hinblick auf die Ökonomie müssen allerdings die Kosten für das Substrat betrachtet werden, welches bei einer Raumgeschwindigkeit von 1 d^{-1} nur zu $< 50 \%$ von den Zellen assimiliert wurde und ein größerer Teil ungenutzt das System verließ. Bei einer Raumgeschwindigkeit von 1 d^{-1} betrug der Ausbeutekoeffizient für die Biomasse ($Y_{X/S}$) nur noch 0,27 und für Paramylon ($Y_{PTM/S}$) 0,2. Je nach Marktpreis für β -1,3-Glucane sollte dieser Faktor mit eingerechnet werden, wobei davon ausgegangen wird, dass die Kosten für das Substrat, auch im Fall einer geringeren Ausbeute, gerechtfertigt sind.

Für die Gewinnung von α -Tocopherol schienen höhere Raumgeschwindigkeiten einen negativen Einfluss auf die Produktivität zu haben. Aufgrund der gezeigten Daten würde ein Prozess mit einer Raumgeschwindigkeit von $0,6 \text{ d}^{-1}$ die höchste Produktivität bereitstellen. In einem Prozess, in dem beide Produkte generiert werden sollen und eine möglichst hohe Substratausbeute ermöglicht wird, sollte eine eher geringe Raumgeschwindigkeit von ca. $0,6 \text{ d}^{-1}$ gewählt werden.

5.1.4 Quasikontinuierliche, sequenziell heterotrophe und photoheterotrophe Gewinnung von Paramylon und α -Tocopherol

Ziel & Hintergrund

Aufgrund der Tatsache, dass bei heterotropher Betriebsweise gegenüber der photoautotrophen viel Biomasse gewonnen werden kann, die Konzentration und die Selektivität in Bezug auf das Hochwertprodukt α -Tocopherol jedoch geringer ist, besteht die Möglichkeit, *E. gracilis* zuerst heterotroph zu hohen Zelldichten zu kultivieren und die Biomasse im Anschluss zu illuminieren, um eine verstärkte α -Tocopherolsynthese zu induzieren. Um eine hohe Produktivität zu gewährleisten, kann eine solche sequenziell heterotrophe und photoheterotrophe Betriebsweise auch quasikontinuierlich erfolgen.

Wie in Kapitel 5.1.1 bereits beschrieben wurde, weist die simultan photoheterotrophe Betriebsweise einige Nachteile auf. Als größter Nachteil sei hier auf die geringere Substrat- ausbeute hingewiesen, was bei gleicher Substratkonzentration im Vergleich zum heterotrophen Kultivierungsmodus zu geringeren Biotrockenmassekonzentrationen und Paramylonselektivitäten führt. In der Literatur ist eine solche sequenziell heterotrophe und photoheterotrophe Betriebsweise bereits beschrieben worden (Ogbonna *et al.*, 1999). Der Unterschied zu den hier dargestellten Ergebnissen ist jedoch, dass die von Ogbonna *et al.* (1999) beschriebene kontinuierliche Kultivierung nur über einen Zeitraum von 17,5 Tagen stattgefunden hat, Ethanol als Kohlenstoffquelle eingesetzt wurde und diese zudem eine weitaus geringere Konzentration aufwies. Des Weiteren erfolgte bei diesem Versuch die Illumination in einer Blasensäulenkaskade, so dass zum einen die Produktbildung mit der Zeit verfolgt werden konnte und zum anderen eine längere Verweilzeit unter Illumination gewährleistet wurde.

Ergebnisse & Diskussion

Die heterotrophe Kultivierungsstufe erfolgte in einem Rührkesselreaktor (KLF, Bioengineering, Schweiz) mit einem Arbeitsvolumen von 2 L bei 28 °C, einer Rührerdrehfrequenz von 200 min⁻¹ und einem Überdruck von 0,1 bar. Der Luftvolumenstrom betrug 0,2 vvm und als Medium wurde das Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) mit einer Glucosekonzentration von 20 g L⁻¹ verwendet. Auf eine pH-Statisierung wurde aufgrund der bereits beschriebenen Nachteile verzichtet. Als Inokulum wurden 10 % (*v/v*) einer vier Tage alten, heterotroph gewonnenen *E. gracilis*-Kultur eingesetzt, welche im gleichen Medium kultiviert wurde. Die quasikontinuierliche Kultivierung wurde nach einer sechstägigen Satzkultivierung mit einer Raumgeschwindigkeit von 0,5 d⁻¹ gestartet und während des gesamten quasikontinuierlichen Betriebs von 36 Tagen beibehalten. Bei diesem Versuch

galt es nicht, eine optimale Raumeschwindigkeit für hohe Produktselektivitäten zu finden, sondern eher um zu zeigen, dass ein solcher Prozess unter den gegebenen Bedingungen möglich ist und dass die α -Tocopherolselektivität mit der Dauer der Illumination zunimmt. Ab dem Zeitpunkt der quasikontinuierlichen Kultivierung wurde der Ablauf in die zweite, photoheterotrophe Stufe überführt, welche aus vier identischen, in Reihe geschalteten Blasensäulen bestand. Da jede Säule ein Arbeitsvolumen von 2 L aufwies, ergibt sich daraus eine hydraulische Verweilzeit von acht Tagen unter Illumination. Aufgrund fehlender Ausrüstung der Peripherie der Blasensäulen wurden der pH-Wert, der Sauerstoffpartialdruck und die Temperatur weder aufgezeichnet noch geregelt. Es standen zudem nicht genügend Peristaltikpumpen zur Verfügung, weshalb die Überführung der Biomasse von der einen Säule in die nächste nur einmal täglich manuell stattfand. Die Probenahme aus den Blasensäulen erfolgte ebenfalls manuell im 48-Stunden-Rhythmus.

5.1.4.1 Verlauf der Produktkonzentrationen und -selektivitäten in der heterotrophen Stufe der quasikontinuierlichen, sequenziell heterotrophen und photoheterotrophen Gewinnung

In Abbildung 5.14 ist der Verlauf des pH-Wertes und des relativen Sauerstoffpartialdrucks in der heterotrophen Stufe dargestellt. Der pH-Wert sank innerhalb der ersten 36 Stunden von einem initialen Wert von 7 auf ca. 3,7 und schwankte während des gesamten Kultivierungszeitraums zwischen 3,5 und 3,8. Der relative Sauerstoffpartialdruck nahm in den ersten 60 Stunden bis zu einer Sauerstoffsättigung von etwa 50 % ab und anschließend bis zum Start des Zulaufs auf 100 % wieder zu. Nach Beginn des Zulaufs nahm der relative Sauerstoffpartialdruck erneut bis etwa zum zehnten Kultivierungstag ab und zeigte Schwankungen zwischen 40 und 50 %. Zwischen dem 16. und 17. Kultivierungstag stieg das pO_2 -Signal auf etwa 95 % und fiel daraufhin wieder auf den vorherigen Wert. Daraufhin folgte eine stetige Steigung auf ca. 60 % bis zum 35. Kultivierungstag. Nach diesem Zeitpunkt stieg die Sauerstoffsättigung auf 120 % an und verblieb bei diesem Wert bis zum Ende der Kultivierung. Aufgrund des Maximums zwischen dem 16. und 17. Kultivierungstag und der beschriebenen Steigerung auf 120 % am Ende der Kultivierung, wo jedoch noch Wachstum zu verzeichnen war, kann davon ausgegangen werden, dass die pO_2 -Sonde während der Kultivierung nicht einwandfrei funktionierte. Es war jedoch davon auszugehen, dass die Kultur zu keinem Zeitpunkt einer Sauerstofflimitierung unterlag. Auch während dieser Kultivierung konnte der in Abschnitt 5.1.3 beschriebene circadiane Rhythmus aufgrund der täglichen Schwankungen des Sauerstoffpartialdrucks und des pH-Wertes beobachtet werden.

Der Verlauf der Biotrockenmasse- und Glucosekonzentration sowie die Konzentrationen der Produkte Paramylon und α -Tocopherol sind ebenfalls in Abbildung 5.14 dargestellt. Die Biotrockenmassekonzentration nahm bis zum Start des Zulaufs einen für Satzkultivierungen von *E. gracilis* typischen Verlauf. Es wurde eine Biotrockenmassekonzentration von $8,7 \text{ g L}^{-1}$ am fünften Kultivierungstag erreicht. Weil die Zellen zu Beginn der quasikontinuierlichen Betriebsweise noch nicht an diesen Modus adaptiert waren, fiel die Biotrockenmassekonzentration zunächst ab, stieg dann ab dem achten Kultivierungstag stetig an, bis sich ein stationärer Zustand ab dem elften Kultivierungstag eingestellt hatte. Dieser konnte über einen Zeitraum von mehr als fünf Verweilzeiten bis zum 24. Kultivierungstag beibehalten werden, wobei eine mittlere Biotrockenmassekonzentration von $9,8 \text{ g L}^{-1}$ erreicht wurde. Zwischen dem 24. und 28. Kultivierungstag nahm die Biotrockenmassekonzentration ab und zeigte an Tag 26 ein Minimum. Bei Betrachtung der Glucosekonzentration wurde zu diesem Zeitpunkt jedoch kein Maximum gemessen, obwohl dies aufgrund des Minimums in der Biotrockenmassekonzentration hätte auftreten müssen. Aufgrund dieser Beobachtung kann angenommen werden, dass der stationäre Zustand auch über den Zeitraum des gemessenen Biomasseminimums gegeben war. Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahm die Biotrockenmassekonzentration bis zum Ende der Zulaufs am 36. Kultivierungstag stetig leicht ab, was in einer Zunahme der Substratkonzentration resultierte. Nach diesem Zeitpunkt verlief die Kultivierung wieder analog zu einer Satzkultivierung ($D=0 \text{ d}^{-1}$), in der eine maximale Biotrockenmassekonzentration von $10,4 \text{ g L}^{-1}$ erreicht wurde. Dabei wurde das Substrat nahezu vollständig verbraucht und wies eine Konzentration von $0,4 \text{ g L}^{-1}$ auf.

Für den quasikontinuierlichen Betrieb wurde die Biotrockenmasseproduktivität berechnet. Bei einer mittleren Biotrockenmassekonzentration von $9,2 \text{ g L}^{-1}$ entspricht dies einer Produktivität von $4,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, was gut mit den Werten aus Abschnitt 5.1.3 übereinstimmt. Für den Zeitraum vom elften bis zum 24. Kultivierungstag konnte sogar eine maximale Produktivität von $4,9 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ berechnet werden. Während des quasikontinuierlichen Betriebs wurden im Mittel $15,5 \text{ g L}^{-1}$ Glucose metabolisiert. Die im Ablauf vorhandene Glucosekonzentration von $4,5 \text{ g L}^{-1}$ wurde in die zweite Stufe überführt und stand den Zellen dort weiterhin zur Verfügung, weshalb die zweite Stufe auch nicht als photoautotroph bezeichnet werden konnte. Der höchste Ausbeutekoeffizient ($Y_{X/S}$) während des quasikontinuierlichen Betriebs betrug 0,51.

In dieser ersten, heterotrophen Stufe verlief die Paramylontrockenmassekonzentration nach Start des Zulaufs aufgrund geringer Schwankungen in der Selektivität analog zu der Biotrockenmassekonzentration. Während des quasikontinuierlichen Betriebs konnte eine durchschnittliche Paramylontrockenmassekonzentration von $7,4 \text{ g L}^{-1}$ erzielt werden, wobei

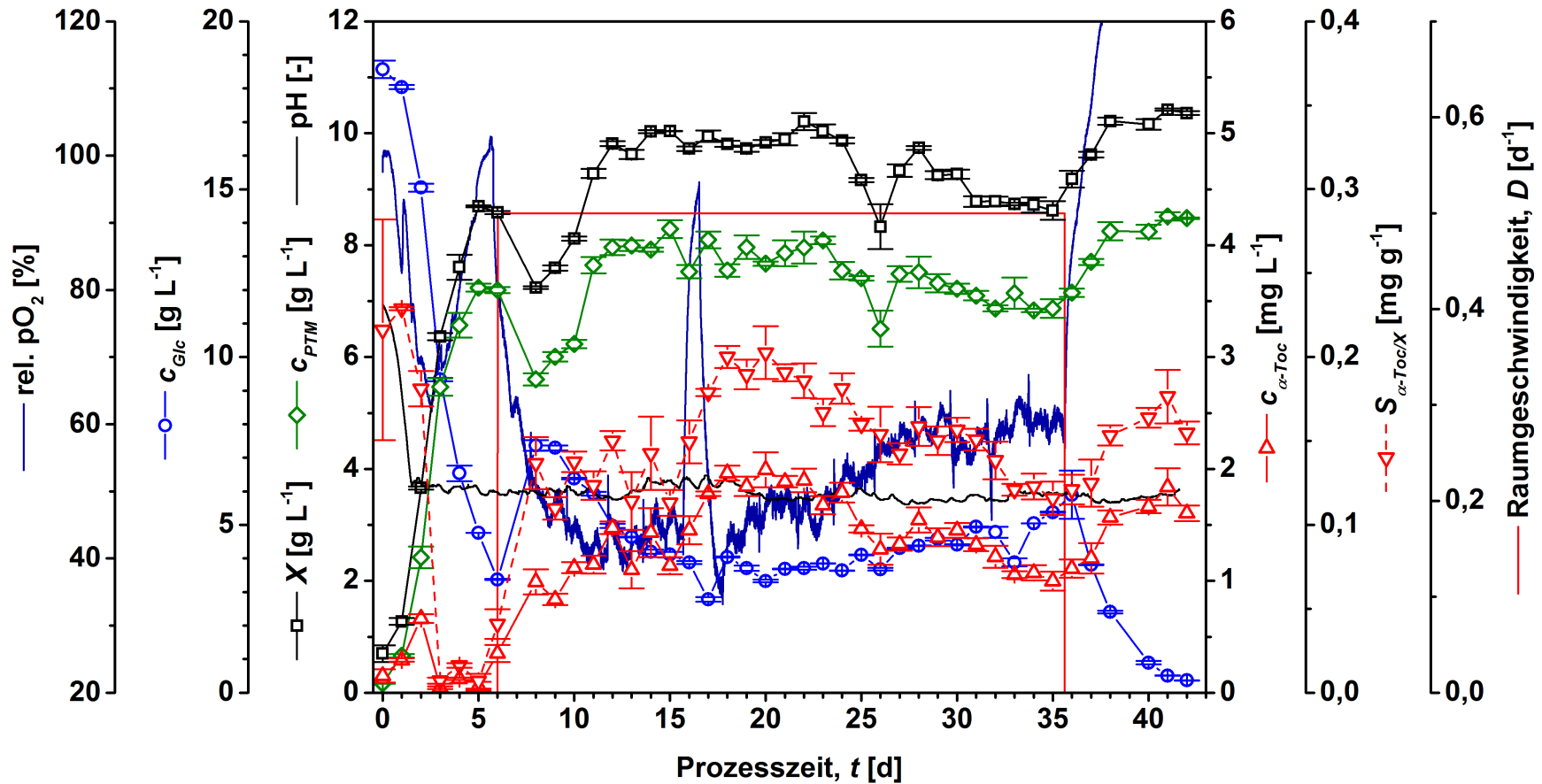


Abbildung 5.14: Verlauf der Raumgeschwindigkeit, des pH-Wertes, des relativen Sauerstoffpartialdrucks, der Glucose-, Biotrockenmasse- und Paramylon-trockenmassekonzentration sowie der α -Tocopherolkonzentration und -selektivität bei quasikontinuierlicher, heterotropher Kultivierung von *E. gracilis*-Zellen im 3,7 L-Rührkesselreaktor über einen Zeitraum von 43 Tagen bei konstanter Raumgeschwindigkeit im Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) mit 20 g L^{-1} Glucose. Kultivierungsparameter: Temperatur: $28 \text{ }^\circ\text{C}$, Überdruck: $0,1 \text{ bar}$, Luftvolumenstrom: $0,2 \text{ vvm}$, Arbeitsvolumen: 2 L , Rührerdrehfrequenz 200 min^{-1} . Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar ($n=3$).

die durchschnittliche Paramylonselektivität 0,79 betrug. Bei Betrachtung der in Abbildung 5.10 (b) dargestellten nichtlinearen Regression des in Abschnitt 5.1.3 dargestellten Versuchs wird deutlich, dass sich dieser Wert bei einer Raumgeschwindigkeit von $0,5 \text{ d}^{-1}$ exakt auf der Kurve wiederfinden ließe. In Bezug auf die Raumgeschwindigkeit entsprach dies einer Produktivität von $3,7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ für das Produkt Paramylon innerhalb der ersten Stufe, wobei ein Ausbeutekoeffizient ($Y_{PTM/S}$) von 0,37 erreicht werden konnte.

Die Selektivität und dadurch bedingt auch die Konzentration des Produktes α -Tocopherol, war, wie ebenfalls der Abbildung 5.14 zu entnehmen ist, während der anfänglichen Satzphase bis auf einen sehr niedrigen Wert von $0,007 \text{ mg g}^{-1}$ bzw. $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ gesunken, war jedoch nach Beginn des quasikontinuierlichen Betriebs deutlich gestiegen und erreichte maximale Werte von $0,2 \text{ mg g}^{-1}$ bzw. 2 mg L^{-1} . Diese Selektivitätsminima während der exponentiellen Phase wurden auch bei den heterotrophen Kultivierung in den Abschnitten 4.3.1 und 5.1.3 beschrieben. Durchschnittlich konnten während dieser heterotrophen Stufe $0,15 \text{ mg g}^{-1}$ bzw. $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ α -Tocopherol gewonnen werden. Bei einer konstanten Raumgeschwindigkeit von $0,5 \text{ d}^{-1}$ entsprach dies einer volumetrischen Produktivität von durchschnittlich $0,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Im Vergleich zu den Daten, welche in Abschnitt 5.1.3 bezüglich α -Tocopherol erzielt wurden, wurden bei dieser Fermentation für diese Raumgeschwindigkeit etwas geringere Konzentrationen und Selektivitäten erreicht.

5.1.4.2 Verlauf der Produktkonzentrationen und -selektivitäten in der photoheterotrophen Stufe der quasikontinuierlichen, sequenziell heterotrophen und photoheterotrophen Gewinnung

Ziel dieser Kultivierung war eine erhöhte Induktion der α -Tocopherolbildung mittels einer zweiten Stufe, in der die Zellen vier in Reihe geschaltete illuminierte Blasensäulenreaktoren durchliefen. Die Zellen hatten je Säule eine mittlere Verweilzeit von zwei Tagen, so dass die gesamte Induktionsperiode acht Tage betrug. Alle 48 Stunden, also nach jeweils einer mittleren Verweilzeit pro Säule, wurde eine Probe von 20 mL entnommen und die Biotrockenmasse- und die Substratkonzentration sowie die Konzentrationen der Produkte Paramylon und α -Tocopherol für jede Säule bestimmt und deren Selektivität berechnet. Es wurde erwartet, dass die restliche Glucose, welche noch im Ablauf mit einer Konzentration von $4,5 \text{ g L}^{-1}$ vorlag, innerhalb der Verweilzeit von acht Tagen gänzlich verbraucht wurde. Ebenso wurde erwartet, dass die Biotrockenmassekonzentration während dieser Stufe konstant blieb oder aufgrund einer auftretenden Zellyse etwas abnahm. Ebenfalls zu erwarten war, dass die spezifische Paramylonkonzentration im Laufe der Illuminationsstufe etwa gleich bleiben sollte, da eine Illumination bei zuvor heterotroph gewonnenen *E. gracilis*-Zellen den Abbau von Paramylon inhibiert (Ogbonna *et al.*, 2002b). Die α -Tocopherolkonzentration hingegen sollte aufgrund der Illumination zunehmen.

Die photoheterotrophe Stufe erfolgte in einem illuminierten Vierfach-Blasensäulen-photobioreaktor (Eigenbau des Lehrstuhls für Fermentationstechnik), welcher als Kaskade betrieben wurde. Jeweils 1 L der Kulturbrühe wurde diskontinuierlich im 24-Stunden-Rhythmus aus der heterotrophen Stufe in den ersten Blasensäulenreaktor überführt, wo diese illuminiert wurde. Die Durchmischung erfolgte mittels Luftbegasung mit einem Volumenstrom von ca. 0,2 vvm und einem Magnetrührstäbchen mit einer Frequenz von etwa 100 min^{-1} , damit sich unterhalb der Begasung keine Zellen absetzen konnten. Die Lichtfluss betrug dabei etwa $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bei einer Schichtdicke von maximal 3,25 cm. Abbildung 5.15 zeigt eine fotografische Aufnahme des Vierfach-Blasensäulenphotobioreaktors mit einer *E. gracilis*-Kultur während des Betriebs. Es wird deutlich, dass eine zunehmende Grünfärbung, welche aufgrund der Chloroplastenausdifferenzierung auftrat, mit jedem Durchlauf durch die Blasensäulen zunahm.

Zur Bilanzierung der Veränderung der Biotrockenmasse-, Substrat- sowie der Produktkonzentrationen und -selektivitäten wurde von der heterotrophen Stufe über den Zeitraum der quasikontinuierlichen Kultivierung ($n=27$) sowie für jede einzelne Blasensäule ($n=15$) für alle Parameter jeweils der Mittelwert gebildet. Diese sind in den folgenden Abbildungen gegen die mittlere Verweilzeit dargestellt, wobei die erste Verweilzeit den Mittelwert der Konzentrationen und Selektivitäten aus der ersten, heterotrophen Stufe entspricht.

In Abbildung 5.16 (a) ist der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration in der zweiten, photoheterotrophen Stufe dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die lineare Regression einen leichten Negativtrend zeigt. Laut der Regressionsgeradengleichung war eine Abnahme der Produktivität von $0,12 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ zu verzeichnen. Aufgrund der hohen Standardabweichungen und der geringen negativen Steigung wurde dies jedoch als nicht aussagekräftig erachtet. Außerdem ist in der Abbildung 5.15 zu erkennen, dass sich ein Teil der Biomasse am Rand der Blasensäulen oberhalb des Füllstands abgelagert hat, so dass dieser Teil bei der Biotrockenmassebestimmung nicht berücksichtigt wurde. Eine Abnahme der Biotrockenmassekonzentration während des Durchlaufs durch die zweite Stufe, wurde auch von Ogbonna *et al.* (1999) sowohl in einem ähnlichen Prozess, als auch in einer Satzkultivierung beobachtet. Die Regression, welche in Abbildung 5.16 (b) die Abnahme der Substratkonzentration zeigt, macht deutlich, dass das restliche Substrat während des Durchlaufs der zweiten Stufe nahezu vollständig verbraucht wurde. Der Glucoseverbrauch zeigte dabei ein exponentielles Verhalten.

Die Selektivität in Bezug auf Paramylon nahm im Verlauf der zweiten Stufe deutlich ab, wie der Abbildung 5.17 (a) zu entnehmen ist. Während für die heterotrophe Stufe eine durchschnittliche Paramylonselektivität von 0,79 berechnet wurde, betrug diese am Ende der vierten Illuminationsstufe lediglich 0,66. Die Paramylonkonzentration, deren

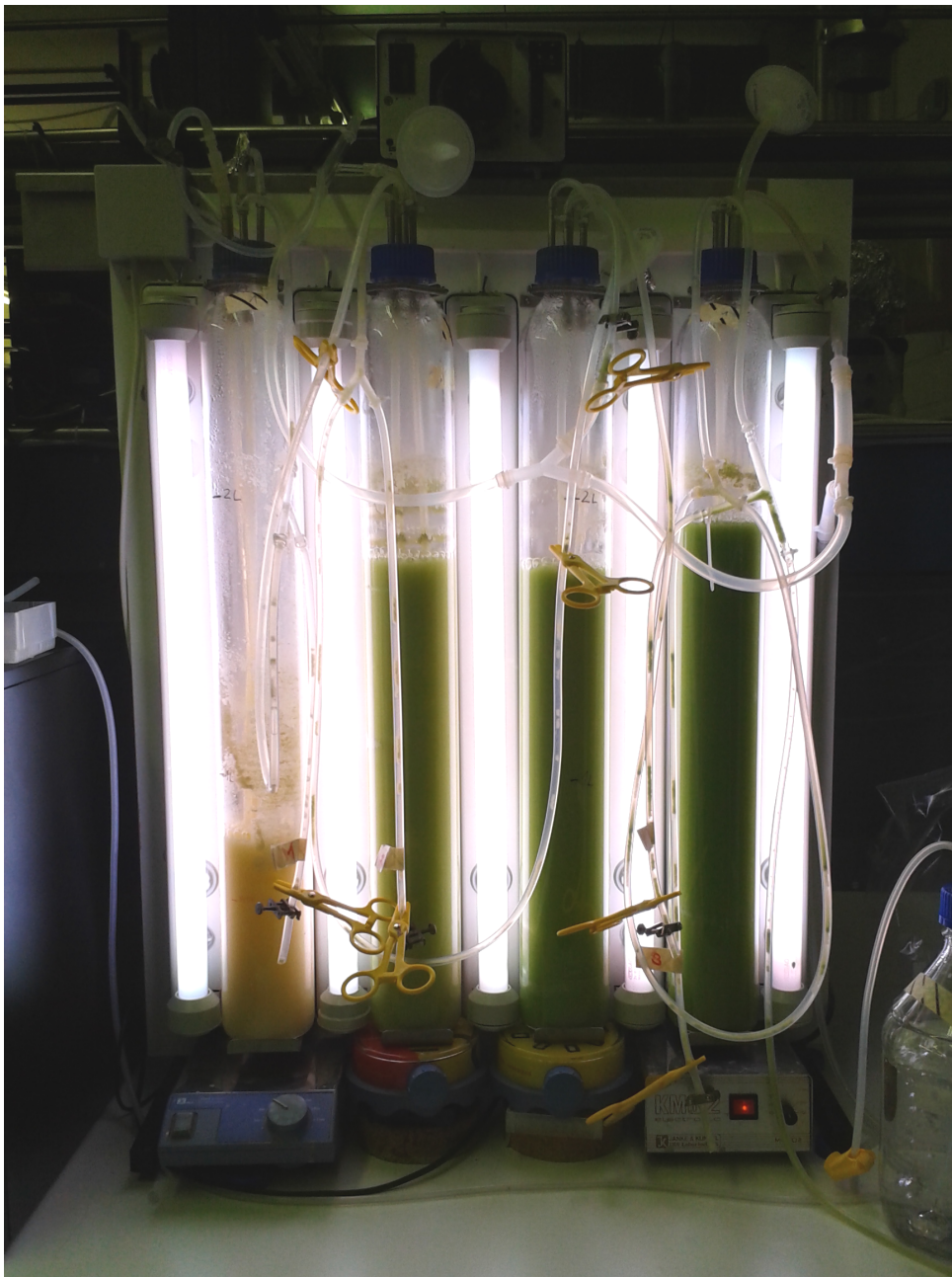


Abbildung 5.15: Fotografische Aufnahme des Vierfach-Blasensäulenphotobioreaktors im Betrieb. Die photoheterotrophe Stufe diente einer erhöhten α -Tocopherolinduktion bei quasikontinuierlicher, sequenziell heterotropher und photoheterotropher Kultivierung von *E. gracilis*. Der Zulauf der zuvor heterotroph im Rührkesselreaktor gewonnenen Kultur erfolgte von links nach rechts als Kaskade. Kultivierungsparameter: Temperatur: ca. 26 bis 29 °C, drucklos, Luftvolumenstrom: ca. 0,2 vvm, Arbeitsvolumen: 2 L, Rührerdrehfrequenz des Magnetrührers: 100 min^{-1} , Lichtfluss: 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

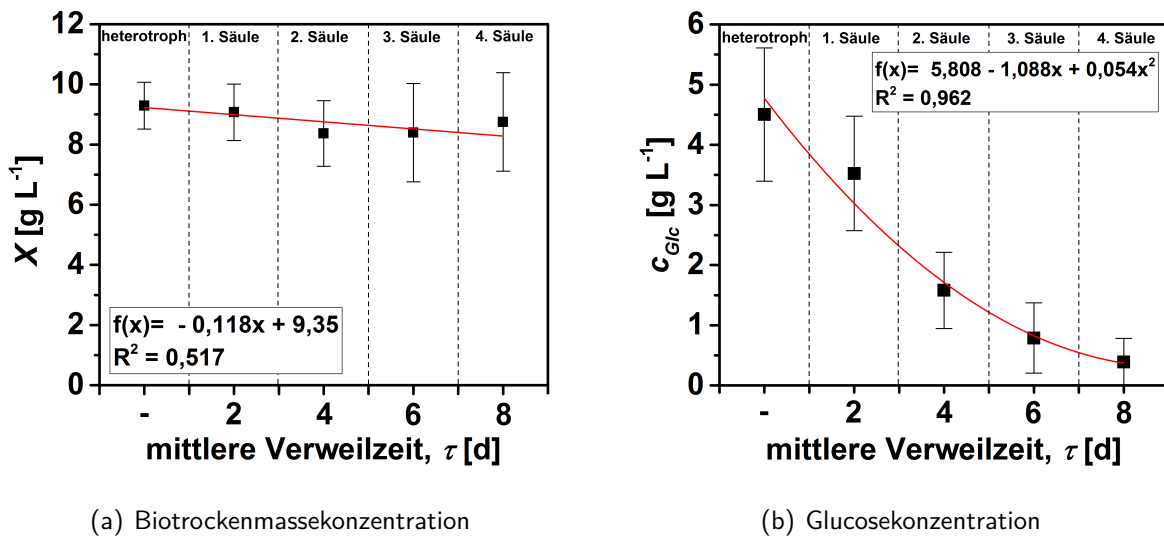


Abbildung 5.16: Zusammenhang zwischen Biotrockenmassekonzentration und mittlerer Verweilzeit (a) bzw. Substratkonzentration und mittlerer Verweilzeit (b) bei der sequenziell heterotrophen und photoheterotrophen Kultivierung von *E. gracilis* im Rührkesselreaktor und im Vierfach-Blasensäulenphotobioreaktor während des Durchlaufs durch die Blasensäulenkaskade. Die Verweilzeit – stellt den Mittelwert des gemessenen Parameters der heterotrophen Stufe ($n=27$) und die Verweilzeiten 2, 4, 6 und 8 jeweils der Mittelwert des gemessenen Parameters der einzelnen Blasensäulenreaktoren der photoheterotrophen Stufe ($n=15$) dar. Die Fehlerbalken zeigen die jeweiligen Standardabweichungen.

Verlauf in Abbildung 5.17 (b) dargestellt ist, nahm pro Tag um $0,24 \text{ g L}^{-1}$ ab. Ob es sich bei der Paramylonkonzentration tatsächlich um die intrazelluläre Paramylonkonzentration handelte, ließ sich nicht mit Gewissheit sagen, da lysierte Zellen ihre wasserunlöslichen Paramylongranula in die Kulturbrühe abgeben. Es konnte lediglich die Gesamtparamylonkonzentration ermittelt werden, wobei davon ausgegangen werden kann, dass der Großteil der Granula intrazellulär vorlag, da die meisten Zellen viabel waren. Dies wurde mikroskopisch stichprobenartig untersucht. Eine Inhibition des Abbaus von Paramylon bei photoheterotropher Kultivierung, wie von Ogbonna *et al.* (2002b) beschrieben wurde, konnte bei dieser Kultivierung nicht beobachtet werden.

Während des Durchlaufs der Zellen durch die zweite Stufe konnte mittels Illumination die α -Tocopherolselektivität und somit auch die α -Tocopherolkonzentration deutlich erhöht werden. Dieser Zusammenhang ist in den Abbildungen 5.18 (a) und (b) dargestellt. In der ersten, heterotrophen Stufe wurde eine durchschnittliche α -Tocopherolselektivität von $0,15 \text{ mg g}^{-1}$ gemessen. Nachdem die Zellen die vierte Blasensäule durchlaufen hatten, betrug die mittlere Selektivität $0,42 \text{ mg g}^{-1}$, was eine Steigerung von 280 % ergibt. Bei Betrachtung der Steigung der Regressionsgeraden in Abbildung 5.18 (a) wird deutlich, dass die Zunahme der α -Tocopherolselektivität durch Illumination täglich $0,035 \text{ mg g}^{-1}$ betrug. Das Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,97$ zeugt von einer guten Approximation. Die Konzentration dieses Produktes zeigt bedingt durch die Zunahme der Selektivität ebenfalls

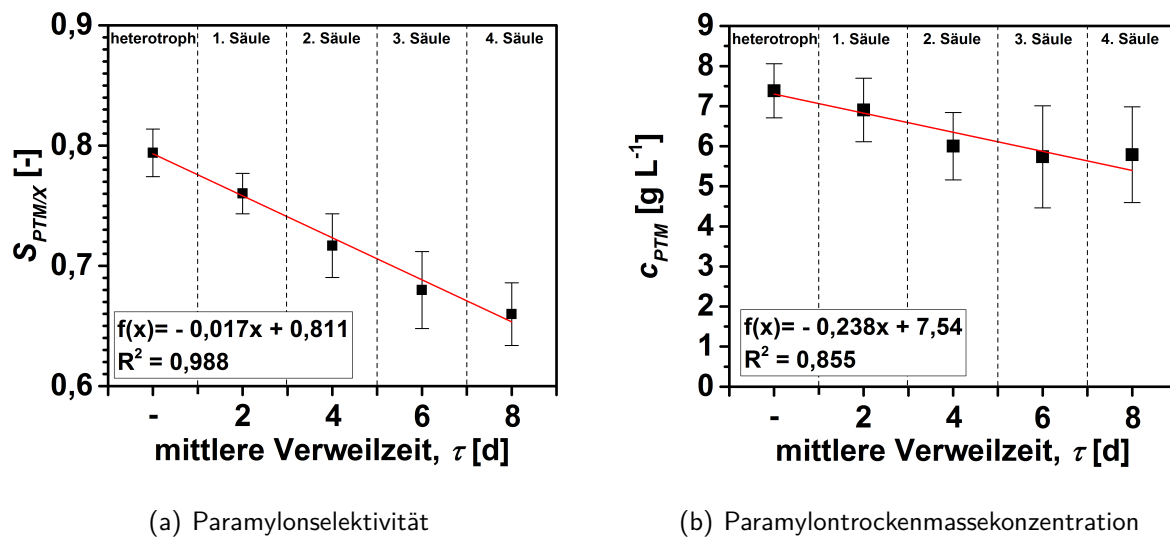


Abbildung 5.17: Zusammenhang zwischen Paramylonselektivität und mittlerer Verweilzeit (a) bzw. Paramylontrockenmassekonzentration und mittlerer Verweilzeit (b) bei der sequenziell heterotrophen und photoheterotrophen Kultivierung von *E. gracilis* im Rührkesselreaktor und im Vierfach-Blasensäulenphotobioreaktor während des Durchlaufs durch die Blasensäulenkaskade. Die Verweilzeit – stellt den Mittelwert des gemessenen Parameters der heterotrophen Stufe (n=27) und die Verweilzeiten 2, 4, 6 und 8 jeweils den Mittelwert des gemessenen Parameters der einzelnen Blasensäulenreaktoren der heterotrophen Stufe (n=15) dar. Die Fehlerbalken zeigen die jeweiligen Standardabweichungen.

eine Erhöhung. Wurde für die heterotrophe Kultivierungsstufe eine mittlere Konzentration von $1,43 \text{ mg L}^{-1}$ erzielt, so betrug diese im Anschluss an die photoheterotrophe Stufe final $3,64 \text{ mg L}^{-1}$. Dies bedeutet eine Steigerung von 255 %. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden in Abbildung 5.18 (b) von $R^2=0,98$ zeugt ebenfalls von einer guten Anpassung. Die Zunahme der Konzentration betrug demnach $0,29 \text{ mg L}^{-1}$ pro Tag.

In der Tabelle 5.6 sind die Konzentrationen und Produktivitäten, welche bei den verschiedenen Verweilzeiten erzielt wurden, dargestellt. Dieser Tabelle ist zu entnehmen, dass die Produktivität in Bezug auf die Biotrockenmassekonzentration und Paramylontrockenmassekonzentration etwas geringer wird, wenn die Zellen über einen Zeitraum von acht Tagen nachträglich illuminiert wurden. Während in der heterotrophen Stufe im Durchschnitt eine Produktivität von $4,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Biotrockenmasse erzielt wurde, konnte am Ende des Durchlaufs der vierten Blasensäule noch eine Produktivität von $4,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ verzeichnet werden. Bei Betrachtung der Standardabweichung wird jedoch deutlich, dass diese Abweichung im Bereich des Fehlers liegt und keine nennenswerte Verringerung zu verzeichnen war. Etwas ausgeprägter war die Abnahme der Paramylonproduktivität. In der heterotrophen Stufe konnte eine mittlere Produktivität von $3,7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erzielt werden, welche am Ende der Illumination $2,9 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ betrug. Dies entspricht einer Abnahme um 21 %. Im Hinblick auf die α -Tocopherolselektivität stieg die Produktivität mit jedem

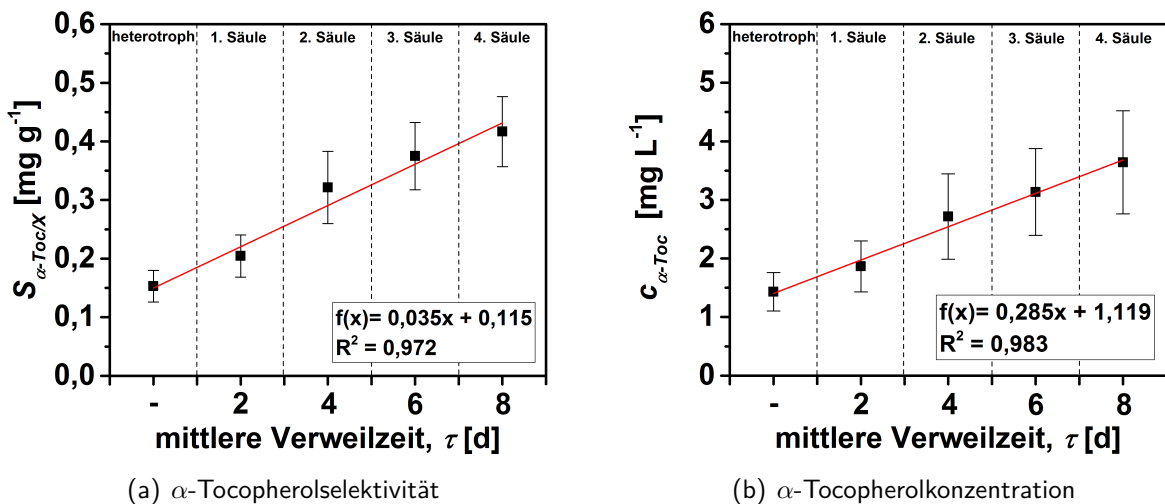


Abbildung 5.18: Zusammenhang zwischen α -Tocopherolselektivität und mittlerer Verweilzeit (a) bzw. α -Tocopherolkonzentration und mittlerer Verweilzeit (b) bei der sequenziell heterotrophen und photoheterotrophen Kultivierung von *E. gracilis* im Rührkesselreaktor und im Vierfach-Blasensäulenphotobioreaktor während des Durchlaufs durch die Blasensäulenkaskade. Die Verweilzeit – stellt den Mittelwert des gemessenen Parameters der heterotrophen Stufe inklusive der Standardabweichungen ($n=27$) und die Verweilzeiten 2, 4, 6 und 8 jeweils den Mittelwert des gemessenen Parameters der einzelnen Blasensäulenreaktoren der photoheterotrophen Stufe ($n=15$) dar.

Durchlauf durch die Blasensäulen an und konnte nach einer achttägigen Illumination von $0,72 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ auf $1,82 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gesteigert werden, was einer Steigerung von 250 % bedeutet.

Im Vergleich zu den Produktivitäten, welche in den Abschnitten 5.1.1 und 5.1.2 in satzweisen Kultivierung erzielt wurden, konnten diese deutlich gesteigert werden, was vor allem aufgrund des quasikontinuierlichen Betriebs ermöglicht wurde. In Abhängigkeit von der Raumgeschwindigkeit, konnten bei der in Abschnitt 5.1.3 beschriebenen, heterotrophen, quasikontinuierlichen Kultivierung zum Teil höhere Produktivitäten in Bezug auf die Biotrockenmasse und Paramylontrockenmasse erzielt werden (vgl. Tabelle 5.5). Dabei wurde eine maximale Produktivität von $5,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Biotrockenmasse und $4,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Paramylon bei einer Raumgeschwindigkeit von 1 d^{-1} erreicht. Für die in dieser Kultivierung eingesetzte Raumgeschwindigkeit von $0,5 \text{ d}^{-1}$ waren die Produktivitäten hingegen vergleichbar. In Bezug auf α -Tocopherol wurde in Abschnitt 5.1.3 gezeigt, dass höhere Raumgeschwindigkeiten zu geringeren Produktivitäten führen. Die höchste Produktivität mit $0,82 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ wurde bei einer Raumgeschwindigkeit von $0,6 \text{ d}^{-1}$ erzielt und war somit in etwa vergleichbar mit der Produktivität von $0,72 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, welche bei einer Raumgeschwindigkeit von $0,5 \text{ d}^{-1}$ in der heterotrophen Stufe dieses Prozesses erzielt wurde.

Obwohl das Substrat, dessen Konzentration am Ende der heterotrophen Stufe noch $4,5 \text{ g L}^{-1}$ betrug, im Durchlauf durch die zweite Stufe fast komplett verbraucht wurde, blieb der Ausbeutekoeffizient ($Y_{X/S}$) aufgrund der sich nur geringfügig veränderten Bio-

Tabelle 5.6: Tabellarische Gegenüberstellung der Mittelwerte der Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen sowie Produktivitäten in Bezug auf die Biotrockenmasse und die Produkte α -Tocopherol und Paramylon für die erste, heterotrophe Stufe ($\tau=-$; $n=27$) und die einzelnen Verweilzeiten in der photoheterotrophen Stufe ($\tau=2$ bis 8 ; $n=15$). Die dargestellten Produktivitäten wurden in Bezug auf den Kultivierungsbeginn berechnet. Siehe Abbildungen 5.16 (a), 5.17 (b) und 5.18 (b) für weitere Informationen.

τ	X	$L_{V,X}$	c_{PTM}	$L_{V,PTM}$	$c_{\alpha-Toc}$	$L_{V,\alpha-Toc}$
[d ⁻¹]	[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹ d ⁻¹]	[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹ d ⁻¹]	[mg L ⁻¹]	[mg L ⁻¹ d ⁻¹]
–	9,3±0,78	4,6±0,39	7,4±0,68	3,7±0,34	1,4±0,33	0,72±0,16
2	9,1±0,94	4,5±0,47	6,9±0,79	3,5±0,40	1,9±0,44	0,93±0,22
4	8,4±1,09	4,2±0,55	6,0±0,84	3,0±0,42	2,7±0,73	1,36±0,36
6	8,4±1,63	4,2±0,82	5,7±1,27	2,9±0,64	3,1±0,74	1,57±0,37
8	8,7±1,64	4,4±0,82	5,8±1,19	2,9±0,60	3,6±0,88	1,82±0,44

trockenmassekonzentration nahezu konstant. Dieser Zusammenhang ist in Tabelle 5.7 dargestellt. In der heterotrophen Stufe betrug dieser durchschnittlich 0,46, wobei nach der photoheterotrophen Stufe ein Wert von 0,43 berechnet wurde. Bezüglich des Paramylons konnte aufgrund der Abnahme der Konzentration und der Selektivität eine Verringerung des Ausbeutekoeffizienten ($Y_{PTM/S}$) von 0,37 auf 0,29 beobachtet werden. Da die Bildung von α -Tocopherol nicht in direktem Zusammenhang mit dem Substrat Glucose steht, wurde für dieses Produkt kein Ausbeutekoeffizient berechnet.

In dem von Ogbonna *et al.* (1999) beschriebenen, sequentiell heterotrophen und photoheterotrophen Prozess mit 8 g L⁻¹ Ethanol als Kohlenstoffquelle wurden höhere α -Tocopherol-selektivitäten und -produktivitäten erzielt. Nach der heterotrophen Stufe wurde dabei eine α -Tocopherolselektivität von 0,3 mg g⁻¹ erreicht, welche durch die photoheterotrophe Stufe auf 1,2 mg g⁻¹ erhöht werden konnte. Die Verweilzeit für beide Stufen betrug dabei ca. drei Tage. Die Biotrockenmassekonzentration betrug 7 g L⁻¹ nach der ersten und 6 g L⁻¹ nach der zweiten Stufe. Bei einer Raumgeschwindigkeit von 0,34 d⁻¹ entspricht dies einer α -Tocopherolproduktivität von etwa 0,7 mg L⁻¹ d⁻¹ für die heterotrophe und 2,4 mg L⁻¹ d⁻¹ für die photoheterotrophe Stufe.

Bei dem in diesem Abschnitt dargestellten Prozess wurden etwas geringere Produktivitäten erreicht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Steigerung der Produktivität von 0,72 mg L⁻¹ d⁻¹ auf 1,82 mg L⁻¹ d⁻¹ durch die nachträgliche Illumination erzielt werden konnte. Somit konnte gezeigt werden, dass ein sequentiell heterotropher und photoheterotropher Prozess auch mit Glucose als Kohlenstoffquelle hohe Produktivitäten bezüglich α -Tocopherol ermöglicht, obwohl beschrieben wurde, dass die α -Tocopherolselektivität unter Verwendung von Ethanol höher ist als beim Einsatz von Glucose (Afiukwa & Ogbonna, 2007; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010). Dies wurde durch die längere Verweilzeit von acht Tagen unter Illumination ermöglicht. Auch bei dem von Ogbonna *et al.* (1999) beschriebenen Prozess wurde beobachtet, dass das Substrat erst in der photoheterotrophen

Tabelle 5.7: Mittelwerte der Biotrockenmasse-, Substrat-, und Paramylonkonzentration sowie Ausbeutekoeffizienten in Bezug auf die Biotrockenmasse und das Produkt Paramylon für die erste, heterotrophe Stufe ($\tau=-$; $n=27$) und die einzelnen Verweilzeiten in der photoheterotrophen Stufe ($\tau=2$ bis 8 ; $n=15$). Siehe Abbildung 5.16 und 5.17 (b) für weitere Informationen.

τ [d ⁻¹]	X [g L ⁻¹]	c_{Glc} [g L ⁻¹]	c_{PTM} [g L ⁻¹]	$Y_{X/S}$ [-]	$Y_{PTM/S}$ [-]
–	9,3±0,78	7,38±0,68	4,50±1,11	0,46	0,37
2	9,1±0,94	6,90±0,79	3,52±0,95	0,45	0,35
4	8,4±1,09	6,00±0,84	1,58±0,63	0,42	0,30
6	8,4±1,63	5,74±1,27	0,79±0,58	0,42	0,29
8	8,7±1,64	5,79±1,19	0,39±0,39	0,44	0,29

Stufe verbraucht wurde und dass die Biotrockenmassekonzentration beim Durchlauf durch die zweite Stufe verringert wurde.

In Versuchen im Schüttelkolbenmaßstab wurde untersucht, ob eine Begasung mit CO₂-angereicherter Luft zu höheren Produktivitäten führt. Da dies nicht beobachtet werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass eine Begasung mit CO₂-angereicherter Luft bei photoheterotrophen *E. gracilis*-Kulturen keinen Vorteil bietet. Die Verwendung verfahrenstechnisch optimierter Reaktoren für die zweite Stufe hätte eventuell eine weitere Erhöhung der α -Tocopherolkonzentrationen bewirkt. Aufgrund technischer Gegebenheiten wurde dieser Versuch nur mit Leuchtstoffröhren als Photonenquelle und eine vergleichsweise große Schichtdicke von 3,25 cm eingesetzt. Das Emissionsspektrum einer Leuchtstoffröhre ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Aus dieser wird deutlich, dass das Emissionsspektrum dieser Emitter nur teilweise mit dem Absorptionsspektrum von Chlorophyll a und b übereinstimmt. Die Verwendung von Emittern, welche das benötigte Wellenlängenspektrum besser abdecken, hätte die Produktivität bezüglich α -Tocopherol vermutlich weiter erhöht. Auch die Applikation höherer Lichtflüsse würde wahrscheinlich positive Auswirkungen auf die Produktinduktion zeigen.

5.1.4.3 Kurzzusammenfassung & Fazit

Die in Abschnitt 5.1.4 dargestellten Ergebnisse konnten zeigen, dass durch die heterotrophe, quasikontinuierliche Betriebsweise hohe Produktivitäten von 5,6 g L⁻¹ d⁻¹ Biotrockenmasse und 4,1 g L⁻¹ d⁻¹ Paramylon erzielt werden konnten. Die höchste α -Tocopherolproduktivität hingegen war dabei relativ gering und betrug lediglich 0,82 mg L⁻¹ d⁻¹.

Um die Selektivität und die Produktivität von α -Tocopherol bei einer vergleichbaren Produktivität von Paramylon zu erhöhen, wurde ein quasikontinuierlicher, sequentiell heterotropher und photoheterotropher Prozess mit 20 g L⁻¹ Glucose als Kohlenstoffsupplement etabliert. Dabei erfolgte die Biomassegewinnung zunächst heterotroph im Rührkesselreak-

tor, wobei der Ablauf in eine zweite Stufe geleitet wurde, in der die Zellen nacheinander vier illuminierte Blasensäulen als Kaskade durchliefen. In dieser Stufe sollte eine erhöhte α -Tocopherolbildung durch die Illumination induziert werden. Durch die Entnahme einer Probe aus jeder Blasensäule konnte zudem die Erhöhung der α -Tocopherolkonzentration für jede Verweilzeit verfolgt werden. Um eine Verweilzeit von zwei Tagen in jeder Blasensäule zu gewährleisten, wurde bei diesem Prozess eine Raumgeschwindigkeit von $0,5 \text{ d}^{-1}$ angewendet. Bei diesem Prozess wurde in der heterotrophen Stufe eine durchschnittliche Biotrockenmassekonzentration von $9,3 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $7,4 \text{ g L}^{-1}$ Paramylon erzielt, was einer Produktivität von $4,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Biotrockenmasse bzw. $3,7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Paramylon entsprach. Die durchschnittliche Paramylonselektivität betrug $0,8$, wobei ein leichter Rückgang der Biotrockenmasse- und Paramylontrockenmassekonzentration um maximal $0,6 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $0,4 \text{ g L}^{-1}$ während des Durchlaufs durch die illuminierte Stufe verzeichnet werden konnte. Die α -Tocopherolproduktivität hingegen, welche in der heterotrophen Stufe $0,72 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ betrug, konnte nach einer Illuminationsperiode von acht Tagen auf $1,82 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erhöht werden, was einer Produktivitätssteigerung von etwa 250% entspricht. Dabei wurde deutlich, dass die Produktivität bei jedem Durchlauf sukzessive gesteigert werden konnte.

Da während einer Verweilzeit von acht Tagen unter Illumination stetig höhere α -Tocopherolkonzentrationen und -selektivitäten verzeichnet werden konnten, sollte die Verweilzeit nicht verkürzt werden. Laut Abbildung 5.18 und Tabelle 5.6 kann davon ausgegangen werden, dass sich die Produktivität durch eine längere Verweilzeit noch weiter erhöhen ließe. Eine Möglichkeit der Verweilzeitverlängerung wäre, das Volumen der photoheterotrophen Stufe zu erhöhen bzw. das Volumen der heterotrophen Stufe zu verringern. Eine andere Möglichkeit wäre die Verringerung der Raumgeschwindigkeit. Im Hinblick auf die in Abschnitt 5.1.3 erzielten Ergebnisse wäre jedoch mit einer geringeren Produktivität zu rechnen. Eine Erhöhung der Raumgeschwindigkeit hingegen könnte einfach über eine Erhöhung des Volumens der photoheterotrophen oder eine Verringerung des Volumens der heterotrophen Stufe realisiert werden.

Für die simultane Gewinnung von Paramylon und α -Tocopherol bietet die sequenziell heterotrophe und photoheterotrophe Betriebsweise einige Vorteile gegenüber dem strikt heterotrophen Modus. In der heterotrophen Stufe konnten hohe Biotrockenmasse- und Paramylontrockenmassekonzentrationen erzielt und in der photoheterotrophen Stufe eine 2,5-fach erhöhte α -Tocopherolkonzentration induziert werden. Das Problem geringerer Produktivitäten bei simultan photoheterotropher Kultivierung konnte dadurch umgangen werden. Aufgrund der quasikontinuierlichen Betriebsweise war die Produktivität bezüglich beider Produkte relativ hoch. Auch wenn die restliche Glucose in der photoheterotrophen Stufe nahezu vollständig metabolisiert wurde, konnte aufgrund der geringer werdenden

Biotrockenmasse- und Paramylon-trockenmassekonzentration die Substratausbeute nicht erhöht werden.

Im Hinblick auf eine alleinige Gewinnung von Paramylon scheint die strikt heterotrophe, quasikontinuierliche Betriebsweise jedoch höhere Produktivitäten zu ermöglichen. Für die Gewinnung beider Produkte kann diese Betriebsweise bei der Integration von *E. gracilis* in ein Bioraffineriekonzept jedoch als zukunftssträchtig angesehen werden, obwohl diese Betriebsweise einen erhöhten apparativen Aufwand benötigt.

5.1.5 Photoautotrophe Gewinnung von *E. gracilis*-Biomasse und α -Tocopherol mittels repetitiver Satzkultivierung

Ziel & Hintergrund

Während mittels heterotropher und photoheterotropher Kultivierung besonders hohe Paramylonkonzentrationen erzielt werden können, ermöglicht die photoautotrophe Betriebsweise hohe α -Tocopherolselektivitäten, wobei die Biotrockenmassekonzentration und die Paramylonselektivität im Vergleich zur heterotrophen Betriebsweise gering ist. Ein entscheidender Vorteil der photoautotrophen Kultivierung ist, dass dabei keine organische Kohlenstoffquelle supplementiert werden muss, was im Hinblick auf ein Bioraffineriekonzept, bei dem eines der Produkte Biogas darstellt, ökologisch und ökonomisch sinnvoller erscheint. Als große Nachteile der photoautotrophen Kultivierung mit Sonnenlicht als Photonenquelle sind die jahreszeitlichen und wetterbedingten Schwankungen anzusehen. Auch die Kosten für die Photobioreaktoren zur Massenkultivierung von Mikroalgen und die energieineffiziente Ernte der Biomasse stellen derzeit Probleme dar, die es zu überwinden gilt (Rosello Sastre & Posten, 2010; Morweiser *et al.*, 2010).

Biogasversuche, vor allem wenn sie kontinuierlich erfolgen, benötigen eine nicht unwesentliche Menge an Substrat. Um für einen solchen Prozess ausreichend Biomasse bereitzustellen, wurde *E. gracilis*-Biomasse photoautotroph in einem 20 L-Maßstab gewonnen. Dabei wurde bewusst auf die Sterilisation des Reaktors und des Mediums verzichtet, da ein axenisches Substrat keine besonderen Vorteile für die Gewinnung von Biogas bietet und eine Sterilisation des Reaktors und des Mediums erhebliche Kosten in der Dimension eines Produktionsmaßstabs verursachen würde. Des Weiteren stand kein Heißdampf für die Sterilisation des Reaktors zur Verfügung.

Dieser Versuch galt zum einen der Bereitstellung von ausreichend strikt photoautotropher gewonnener Biomasse für eine kontinuierliche Biogasgewinnung. Zum anderen sollte untersucht werden, ob die Produktivität bezüglich der Biomasse und des Produktes α -Tocopherol mittels repetitiver Satzkultivierung im Gegensatz zur einfachen, satzweisen Kultivierung gesteigert werden kann.

Ergebnisse & Diskussion

Die Kultivierung erfolgte in einem illuminierten 25 L-Blasensäulenreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 20 L bei 28 °C. Der Gasvolumenstrom betrug in etwa 0,2 vvm mit 5 % CO₂-Sättigung (*v/v*) in der Luft, wobei kein Überdruck vorherrschte. Als Medium diente das Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) und es erfolgte keine pH-Statisierung. Als Inokulum dienten 10 % (*v/v*) einer vier Tage alten *E. gracilis*-Kultur, welche unter Verwendung des gleichen Mediums heterotroph gewonnen wurde. Die erste Repetition erfolgte nach fünf Tagen und jede weitere nach jeweils drei bzw. vier Tagen, wobei 10 bis 37 % (*v/v*) der Kultur als neues Inokulum diente. Die α -Tocopherolkonzentration wurde zu jedem Zeitpunkt der Repetition gemessen, wohingegen die Ermittlung der Biotrockenmassekonzentration täglich erfolgte. Für die Bestimmung der Produktivitäten wurde das Inokulumsvolumen des vorangegangenen Zyklus berücksichtigt.

Abbildung 5.19 zeigt den Verlauf der Biotrockenmassekonzentrationen einer repetitiven Satzkultivierung, bei der je nach Zyklusdauer, Inokulumsvolumen und Adaptation der Zellen an diese Kultivierungsbedingungen unterschiedliche Biotrockenmasse- und α -Tocopherolkonzentrationen erzielt werden konnten. Die erzielten α -Tocopherolkonzentrationen sind in Tabelle 5.8 aufgeführt. Nach einer kurzen *lag*-Phase zu Beginn des Prozesses konnte ein exponentielles Wachstum beobachtet werden, wobei nach einer Kultivierungsdauer von fünf Tagen nur eine geringe Biotrockenmassekonzentration von 0,53 g L⁻¹ erzielt werden konnte. Dies war darauf zurückzuführen, dass das Inokulum heterotroph gewonnen wurde und die Zellen daher noch nicht an einen phototrophen Metabolismus adaptiert waren und erst Chloroplasten ausdifferenzieren mussten. Für diesen Vorgang benötigen *E. gracilis*-Zellen eine Induktionsdauer von mindestens 24 Stunden (Cramer & Myers, 1952), wobei davon ausgegangen wurde, dass der Zeitraum, bis ein Großteil der Zellen adaptiert waren, länger war. Nach der ersten Repetition war das Wachstum linear, wobei die nächste Ernte nach einer dreitägigen Periode erfolgte, bei welcher eine Biotrockenmassekonzentration von 0,68 g L⁻¹ gewonnen wurde. Bei einer längeren Periodendauer wäre die Biotrockenmassekonzentration sicherlich weiterhin gestiegen. Ab der dritten Repetition wurden für jeden weiteren Zyklus, je nach Dauer und Volumen des Inokulums, Biotrockenmassekonzentrationen zwischen 1,22 g L⁻¹ und 1,54 g L⁻¹ erzielt.

Die Produktivitäten, welche für jeden Zyklus bezüglich Biotrockenmasse und α -Tocopherol errechnet wurden, sind ebenfalls in Tabelle 5.8 gezeigt. Zusätzlich sind die α -Tocopherolkonzentrationen und -selektivitäten sowie die Volumina des Inokula aufgeführt. Die Selektivität schwankte zwischen 0,96 und 1,45 mg g⁻¹, wobei eine mittlere Selektivität von 1,24 mg g⁻¹ erzielt wurde. Weil die Biotrockenmassekonzentrationen nach dem vierten, siebten und achten Zyklus mit durchschnittlich 1,52 g L⁻¹ am höchsten war und die höchste Selektivität bezüglich α -Tocopherol am Ende des vierten Zyklus 1,45 mg g⁻¹ betrug, war

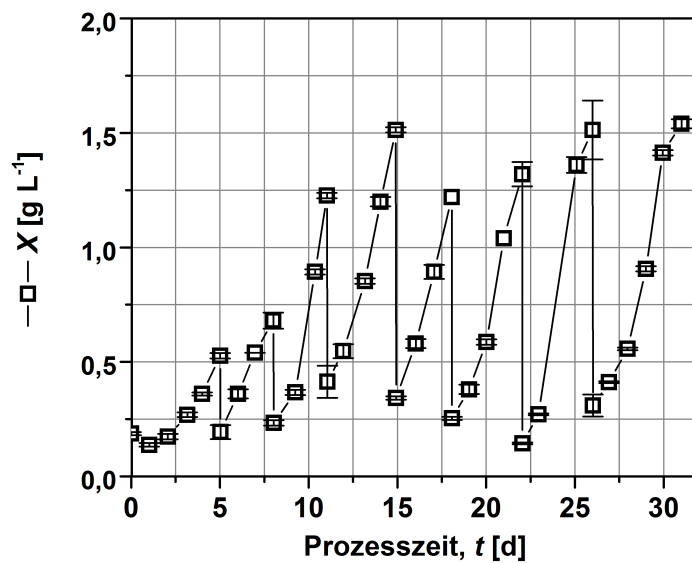


Abbildung 5.19: Verlauf der Biotrockenmassekonzentration bei photoautotropher, repetitiver Satzkultivierung von *E. gracilis* im 25 L-Blasensäulenphotobioreaktor über einen Zeitraum von 31 Tagen im Basalmedium nach Cramer & Myers (1952). Kultivierungsparameter: Temperatur: 28 °C, drucklos, Luftvolumenstrom: ca. 0,2 vvm, Arbeitsvolumen: 20 L. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar (n=3).

zu diesem Zeitpunkt auch die α -Tocopherolkonzentration mit $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ am höchsten. Während die Produktivität bezüglich der Biotrockenmasse zu Beginn der Kultivierung vergleichsweise gering war, was damit zusammenhing, dass während der ersten beiden Zyklen ein nur geringe Biotrockenmassekonzentrationen erzielt wurden, waren die Produktivitäten während der übrigen Zyklen, unabhängig des Inokulumsvolumens, vergleichbar. Ab dem vierten Zyklus lag die durchschnittliche Biotrockenmasseproduktivität bei $0,3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Ähnlich verhielt es sich auch mit der Produktivität bezüglich α -Tocopherol, welche aus den bereits genannten Gründen nach den ersten beiden Zyklen ziemlich gering war. Für die übrigen Zyklen wurde eine mittlere Produktivität von $0,38 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erzielt, wobei auch hier die Produktivität mit $0,44 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nach dem vierten Zyklus am höchsten war.

Im Vergleich zu der maximalen α -Tocopherolproduktivität von $0,82 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, welche mittels der kontinuierlichen, heterotrophen Kultivierung bei einer Raumgeschwindigkeit von $0,6 \text{ d}^{-1}$ (Abschnitt 5.1.3) erzielt wurden, war die maximale α -Tocopherolproduktivität von $0,44 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bei dieser Kultivierung trotz der weitaus höheren α -Tocopherolselektivitäten geringer. Da in Abschnitt 5.1.1.4 gezeigt werden konnte, dass die α -Tocopherolselektivität erst mit höherem Alter der Kultur zunimmt, sollten die Abstände zwischen den Repetitionen auf ca. sieben Tage erhöht werden, was jedoch mit einer geringeren Biotrockenmasseproduktivität einherginge. Die höchste Produktivität mit $1,82 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ konnte bei der sequentiell heterotrophen und photoheterotrophen, kontinuierlichen Betriebsweise, welche in Abschnitt 5.1.4 beschrieben wurde, erzielt werden. Die lange Verweilzeit von

Tabelle 5.8: Tabellarische Gegenüberstellung der Biotrockenmasseproduktivität sowie α -Tocopherolkonzentration, -selektivität und -produktivität für jeden Zyklus bei photoautotropher repetitiver Satzkultivierung von *E. gracilis*-Zellen über einen Zeitraum von 31 Tagen. Zusätzlich ist das Volumen des Inokulums des jeweiligen Zyklus dargestellt. Die dargestellten Produktivitäten wurden in Bezug auf den Kultivierungsbeginn berechnet. Siehe Abbildung 5.19 für weitere Informationen.

Zyklus	Inokulum [%(v/v)]	X [g L ⁻¹]	$L_{V,X}$ [g L ⁻¹ d ⁻¹]	$c_{\alpha-Toc}$ [mg L ⁻¹]	$S_{\alpha-Toc/X}$ [mg g ⁻¹]	$L_{V,\alpha-Toc}$ [mg L ⁻¹ d ⁻¹]
1	10	0,53±0,01	0,07	0,50±0,02	0,96±0,03	0,06
2	37	0,68±0,03	0,15	0,86±0,02	1,26±0,02	0,19
3	34	1,23±0,01	0,27	1,60±0,04	1,30±0,03	0,35
4	34	1,51±0,01	0,30	2,19±0,09	1,45±0,06	0,44
5	23	1,22±0,01	0,31	1,50±0,03	1,23±0,02	0,38
6	21	1,32±0,05	0,30	1,68±0,09	1,27±0,06	0,38
7	11	1,51±0,13	0,30	1,70±0,09	1,12±0,01	0,34
8	20	1,54±0,02	0,31	1,98±0,03	1,29±0,02	0,40

acht Tagen unter Illumination ermöglichte dabei eine Erhöhung der Selektivität und somit auch die Produktivität. Ein direkter Vergleich ist nicht möglich, weil die heterotrophe und photoheterotrophe Gewinnung kontinuierlich erfolgte und die photoautotrophe Gewinnung aufgrund eines weitaus geringeren apparativen Aufwands mittels repetitiver Satzkultivierung durchgeführt wurde. Insgesamt konnte bei dieser photoautotrophen, repetitiven Satzkultivierung 86,8 g Biotrockenmasse und 193 mg Tocopherol gewonnen werden.

Da diese Kultivierung nicht unter sterilen Bedingungen erfolgte, wies die Kultur bakterielle Kontaminationen auf, deren Konzentration aufgrund der Abwesenheit einer organischen Kohlenstoffquelle und des sauren pH-Wertes der Kulturbrühe von ca. 3,5 jedoch gering war. Andere Mikroalgen wie Grünalgen oder Cyanobakterien wurden unter dem Lichtmikroskop nicht detektiert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Biomasse hauptsächlich aus *E. gracilis*-Zellen bestand, was auch aufgrund der hohen α -Tocopherolselektivität anzunehmen war. Der Bakterientiter wurde nicht ermittelt.

5.1.5.1 Kurzzusammenfassung & Fazit

Nach einer siebentägigen Satzkultivierung im Schüttelkolben (vgl. 5.1.1.2) konnten im photoautotrophen Modus 3,2 g L⁻¹ Biotrockenmasse generiert werden, wobei die α -Tocopherolselektivität 2,2 mg g⁻¹ und die -konzentration 6,8 mg L⁻¹ betrug. Dies entsprach einer Biotrockenmasseproduktivität von 0,45 g L⁻¹ d⁻¹ und einer α -Tocopherolproduktivität von 0,98 mg L⁻¹ d⁻¹. Nach zehntägiger, satzweiser Kultivierung konnten die Konzentrationen sogar noch etwas erhöht werden, was jedoch in geringeren Produktivitäten resultierte. Die Produktivität war jedoch nach einer Kultivierungsdauer von vier Tagen mit 0,32 mg L⁻¹ d⁻¹ α -Tocopherol vergleichsweise gering.

Dieser Versuch konnte zeigen, dass auch ohne die Supplementierung einer organischen Kohlenstoffquelle relativ hohe volumetrische Produktivitäten von maximal $1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Biotrockenmasse bzw. $0,44 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ α -Tocopherol erzielt werden konnten. Aufgrund einer viel höheren Schichtdicke und der Verwendung anderer Leuchtmittel konnten trotz repetitiver Betriebsweise dabei jedoch keine höheren Produktivitäten erzielt werden, da vor allem die Biotrockenmassekonzentration vergleichsweise gering war.

Bei den eingesetzten Emittlern handelte es sich um reguläre Halogenstrahler, welche kein für die Photosynthese optimales Spektrum emittieren. Das Emissionsspektrum dieser Emitter und das Absorptionsspektrum von Chlorophyll a und b ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Aus dieser wird deutlich, dass das Emissionsspektrum vor allem im Bereich kurzer Wellenlängen geringe Intensitäten aufweist, und somit für die phototrophe Kultivierung weniger geeignet zu sein scheint. Die Verwendung anderer Emitter wäre eine Möglichkeit, durch eine apparative Optimierung höhere Produktivitäten bezüglich Biomasse und α -Tocopherol zu erreichen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die photoautotrophe Gewinnung von *E. gracilis*-Biomasse nicht zwangsläufig unter axenischen Bedingungen erfolgen muss, wenn α -Tocopherol und die restliche Biomasse für die Biogasproduktion die Produkte der Wertschöpfungskette darstellen. Für die Bereitstellung einer größeren Masse an Substrat für die kontinuierliche Gewinnung von Biogas im Labormaßstab, konnten bei dieser Betriebsweise und dem verwendeten Photobioreaktor gute Ergebnisse erzielt werden.

5.2 Biogasgewinnung mit *E. gracilis*-Biomasse

Da Bioraffinerien auf der mehrfachen stofflichen Nutzung biogener Rohstoffe basieren, bei denen häufig auch eine energetische Nutzung im Vordergrund steht, wurde in diesem Ergebnisteil untersucht, welche Biogaserträge und welcher Methangehalte zu erwarten sind, wenn *E. gracilis*-Biomasse anaerob zu Biogas konvertiert wird. In der Literatur ist zwar nur sehr wenig über den Einsatz der Biomasse dieses Einzellers für die Biomethangewinnung zu finden, jedoch wurde häufig beschrieben, dass Mikroalgen ideale Kandidaten für die Biogasproduktion als finale Stufe einer Wertschöpfungskette seien (Sialve *et al.*, 2009; Mussnug *et al.*, 2010; Ramos-Suárez & Carreras, 2014; Grimm *et al.*, 2015; Klassen *et al.*, 2015). Nach Verifikation der These, dass unter Verwendung von *E. gracilis*-Biomasse als Substrat sehr hohe Biogaserträge und Methangehalte erzielt werden können, stellte sich die Frage, inwieweit sich die Biogasquantität und -qualität unterscheidet, wenn das Substrat heterotroph, photoheterotroph oder photoautotroph gewonnen wurde und ob sich der Biogasertrag und die -zusammensetzung ändert, wenn die Biomasse aus verschiedenen Wachstumsphasen satzweiser Kultivierungen geerntet wird. Im Hinblick auf

Bioraffineriekonzepte wurde untersucht, ob die Biomasse nach Produktextraktion noch immer ein ergiebiges Substrat für die Biomethangewinnung darstellt.

Zunächst wurde die selbe Biomasse in einem diskontinuierlichen Prozess auf Gasquantität und -qualität untersucht, welche bereits in Abschnitt 5.1.1 in Bezug auf die Konzentrationen und Selektivitäten bezüglich der Produkte Paramylon und α -Tocopherol untersucht wurden. Der Biogasertrag und die -zusammensetzung beim Einsatz von *E. gracilis*-Biomasse vor und nach der α -Tocopherolextraktion von heterotroph und photoheterotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse wurde ebenfalls im Satzprozessen untersucht. Des Weiteren wurde die Biogasquantität und -qualität auf Basis der elementaren Zusammensetzung theoretisch ermittelt und mit den experimentell ermittelten Werte verglichen. Zum Schluss wurde *E. gracilis*-Biomasse als Monosubstrat über einen längeren Zeitraum kontinuierlich in einem Rührkesselreaktor mesophil vergärt, um einen Prozess im Labormaßstab zu realisieren. Dabei sollte herausgefunden werden, welche Raumbelastungen stabile Prozesse erlauben. Die restliche *E. gracilis*-Biomasse nach der Extraktion des Produktes α -Tocopherol wurde ebenfalls kontinuierlich vergoren. Die Untersuchung von *E. gracilis*-Biomasse als Cosubstrat von z. B. Maissilage war nicht Gegenstand dieser Arbeit.

5.2.1 Einfluss des Kultivierungsmodus und des Erntezeitpunkts der *E. gracilis*-Biomasse auf den Biogasertrag

Ziel & Hintergrund

In Abschnitt 5.1.1 wurde beschrieben, dass sich die Selektivität bezüglich der Produkte Paramylon ($S_{PTM/X}$) und α -Tocopherol ($S_{\alpha-Toc/X}$) je nach appliziertem Kultivierungsmodus zum Teil extrem unterscheidet. Auch der Erntezeitpunkt zeigte einen gewissen Einfluss auf die Konzentrationen und Selektivitäten. Bei einer Kultivierung mit einem organischen Kohlenstoffsupplement wurden z. B. weitaus höhere Paramylonselektivitäten erzielt, als bei photoautotropher Kultivierung. Da Paramylon ausschließlich aus β -1,3-verknüpften Glucosemolekülen besteht und heterotroph gewonnene *E. gracilis*-Biomasse, wie in den Abschnitten 5.1.1.3, 5.1.2 und 5.1.3 beschrieben, teilweise zu $> 80\%$ (w/w) aus Paramylon besteht, wurde erwartet, dass sich dies in höheren C/N-Verhältnissen zugunsten der mit Glucose kultivierten Biomasse auswirkt. Die photoautotroph gewonnene Biomasse dürfte aufgrund höherer Proteinanteile zwar weitaus geringere C/N-Verhältnisse aufweisen, der Methananteil im Biogas dürfte beim Einsatz der Biomasse als Substrat jedoch höher sein.

In satzweisen Fermentationen nach DIN EN ISO 11734 (VDI, 2004) wurde zunächst das Biogaspotential und die Biogaszusammensetzung von heterotroph, photoheterotroph und photoautotroph gewonnenen *E. gracilis*-Biomassen ermittelt, welche jeweils nach vier, sieben und zehn Tagen geerntet wurden. Dies diente der Überprüfung, ob das Alter

der Kultur einen Einfluss auf das Biogaspotential aufweist. Dieser Versuch war Teil des Versuches, welcher in Abschnitt 5.1.1 beschrieben wurde. In dem dort beschriebenen Versuch wurde untersucht, welchen Einfluss der Kultivierungsmodus und der Erntezeitpunkt auf die Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen bzw. die Produktselektivitäten aufweist. Die hier dargestellten Ergebnisse zur satzweisen Biogasgewinnung aus *E. gracilis*-Biomasse als Substrat wurden mit jener Biomasse erzielt, welche im Zuge dieses Versuchs gewonnen wurde.

Die Biomassen wurden vor dem Einsatz in die Satzreaktoren zweimal mit dem Kulturvolumen mit ddH_2O gewaschen, um Verfälschungen der Ergebnisse durch Substratreste vorzubeugen. Die Substratzugabe erfolgte als Feuchtmasse in frischer, konzentrierter Form mit einer organischen Trockenmassekonzentration von etwa 100 g L^{-1} .

Ergebnisse & Diskussion

Die Plots in Abbildung 5.20 zeigen die Kinetik der Biogasbildung von heterotroph, photoheterotroph und photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse als Substrat für die Biogasgewinnung in einem dreizehntägigen, diskontinuierlichen Prozess. Bei einem Vergleich der Abbildungen 5.20 (a–c) wird deutlich, dass der Biogasertrag weitaus höher war, wenn Glucose bei der Kultivierung eingesetzt wurde. Auch in Bezug auf den Erntezeitpunkt konnten Unterschiede beobachtet werden, welche jedoch weniger stark ausgeprägt waren. Während der Biogasertrag von photoheterotroph gewonnener Biomasse (Abb. 5.20 (a)) bei jedem Erntezeitpunkt in etwa gleich war und einen durchschnittlichen Wert von $764 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ erreichte, zeigten die heterotroph und die photoautotroph gewonnenen Biomassen jeweils einen gegensätzlichen Trend. Der Biogasertrag, welcher unter der Verwendung von heterotroph gewonnener Biomasse generiert wurde (Abb. 5.20 (b)), nahm mit zunehmendem Alter der Kultur stetig ab. Während die Biomasse, welche nach einem Kultivierungszeitraum von vier Tagen geerntet wurde, einen maximalen Biogasertrag von $805 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ zu verzeichnen hatte, konnten maximale Gaserträge von $780 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ für die sieben Tage alte und nur noch $745 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ für die zehn Tage alte Kultur gemessen werden. Für die photoautotroph gewonnene Biomasse wurde ein gegenteiliges Ergebnis erzielt, was der Abbildung 5.20 (c) zu entnehmen ist. Zusätzlich zu der in Abschnitt 5.1.1.3 und 5.1.1.4 beschriebenen Erhöhung der α -Tocopherol- und Paramylonselektivität stieg auch die maximale Biogasquantität mit zunehmenden Alter der Kultur von $574 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ für die vier Tage alten Zellen auf $648 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ für die zehn Tage alten Zellen. Der Effekt einer Veränderung der Zusammensetzung in Abhängigkeit des Erntezeitpunktes auf den Biogasertrag, wurde auch für Nutzpflanzen beschrieben (Döhler *et al.*, 2006; Amon *et al.*, 2007).

Im Gegensatz *E. gracilis*-Biomasse als Substrat, welches bei der Biogasbildung keine ersichtliche *lag*-Phase zeigte, wies die Kontrollsubstanz Avicel® eine typische *lag*-Phase von zwei bis drei Tagen auf, welche gewöhnlich in jedem diskontinuierlichen Prozess unter Verwendung dieses Substrates beobachtet werden konnte. Daher kann darauf geschlossen werden, dass die *E. gracilis*-Biomasse von dem bakteriellen Konsortium nach Substratzugabe schneller abgebaut werden kann. Gemäß den Gleichungen 3.9 und 3.10 auf Seite 41 beträgt der maximal erreichbare Biogasertrag beim Einsatz von Avicel® $747 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$, da es sich bei dieser Substanz um Cellulose und somit um ein Glucosepolymer handelt. Wie der VDI-Richtlinie 4630 (2004) zu entnehmen ist, kann in einem anaeroben Prozess maximal 80 % des theoretisch erreichbaren Biogasertrags erreicht werden, da ein Teil der Energie für den Metabolismus und den Anabolismus der Mikroorganismen benötigt wird. Der finale Biogasertrag von $573 \pm 20,9 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$, welcher für diese Kontrollsubstanz gemessen wurde, entspricht in etwa diesem Wert.

Der maximale Biogasertrag, der Anteil an Methan im Biogas und der daraus berechnete maximale Methanertrag sind in Tabelle 5.9 zusammengefasst. Dieser ist zu entnehmen, dass die Biomassen, welche unter Illumination kultiviert wurden, einen höheren Methangehalt im Biogas aufwiesen, als jene, welche strikt heterotroph gewonnen wurden. Der durchschnittliche Methangehalt unter der Verwendung von photoheterotroph und photoautotroph gewonnener Biomasse betrug 65 bzw. 66,8 % (*v/v*). Im Gegensatz dazu betrug der durchschnittliche Methangehalt der heterotroph gewonnenen Substrate nur 60,6 % (*v/v*). Die Unterschiede in Bezug auf das Alter der Kultur sind jedoch marginal.

Laut der Gleichung von Symons & Buswell (1933) (vgl. Gleichung 3.6 auf Seite 41) liegt das Verhältnis von Methan zu Kohlenstoffdioxid bei 50 % (*v/v*) CH_4 und 50 % (*v/v*) CO_2 , wenn Kohlenhydrate als Substrat eingesetzt werden. Auf der selben Gleichung basierend, kann der höchste Methananteil bei dem Einsatz von Proteinen und Lipiden erwartet werden. Aufgrund des höchsten Paramylonanteils von 50 bis 83 % (*w/w*) bei dem heterotroph gewonnenem Substrat war auch der Methananteil im Biogas bei Verwendung dieses Substrates am geringsten. Das photoautotroph gewonnene Substrat wies den geringsten Paramylonanteil mit 8 bis 23 % (*w/w*) auf, wobei mit diesem Substrat der höchste Methananteil erzielt wurde. Dies legt nahe, dass vor allem der relative Proteinanteil bei dieser Biomasse weitaus höher liegt, als bei den Biomassen mit erhöhten Paramylonselektivitäten. Nach Baserga (1998) beträgt der durchschnittliche Methananteil beim Einsatz von Proteinen 70 bis 71 % (*w/w*), was den erhöhten Methananteil beim Einsatz des photoautotroph gewonnenen Substrats erklärt. Die photoheterotroph gewonnene Biomasse wies Paramylonanteile von 42 bis 72 % (*w/w*) auf, so dass auch der Methangehalt geringer ausfiel als beim Einsatz der photoautotroph gewonnenen Biomasse. Die Paramylonselektivitäten der bei diesem Versuch eingesetzten Substrate sind in Abbildung 5.3 (b) dargestellt. Nach

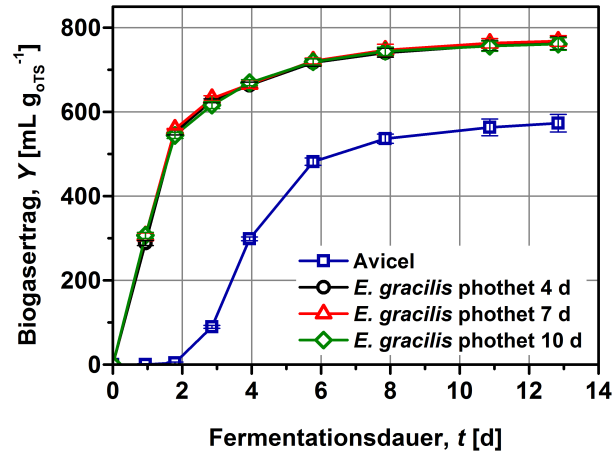
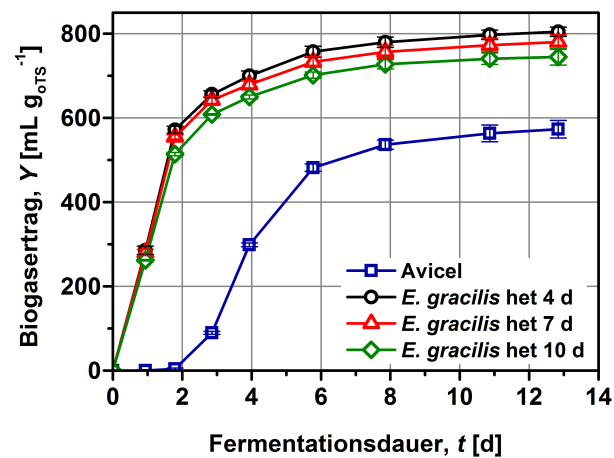
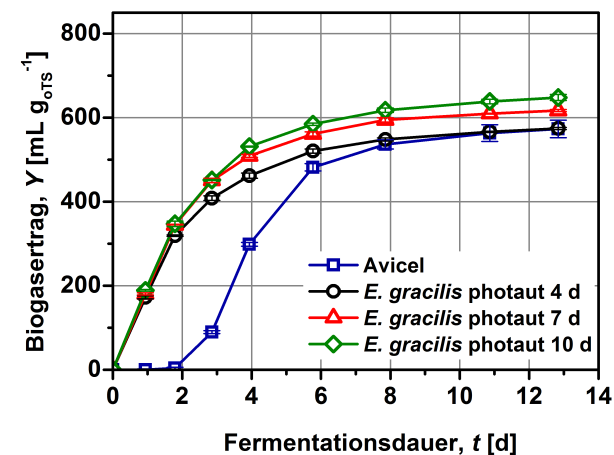

 (a) photoheterotroph gewonnene *E. gracilis*-Biomasse

 (b) heterotroph gewonnene *E. gracilis*-Biomasse

 (c) photoautotroph gewonnene *E. gracilis*-Biomasse

Abbildung 5.20: Biogasbildung von photoheterotroph (a), heterotroph (b) und photoautotroph (c) gewonnener *E. gracilis*-Biomasse als Substrat für die Biogasgewinnung in Bezug auf den Erntezeitpunkt in einem dreizehntägigen, diskontinuierlichen Prozess. Die Zellernte erfolgte nach vier, sieben und zehn Tagen. Die Kultivierung erfolgte gemäß Abschnitt 4.1.3 im Basalmedium nach Cramer & Myers (1952). Die Bestimmung der Vergärbarkeit der Substrate erfolgte nach DIN EN ISO 11734 (VDI, 2004) mit 200 mg Substrat in Bezug auf die organische Trockenmasse und 60 mL Impfschlamm. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar (n=3).

Tabelle 5.9: Vergleich des Biogasertrags, Methangehalts und Methanertrags von heterotroph, photoheterotroph und photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse als Substrat für die Biogasgewinnung in Bezug auf das Alter der Kultur und dem Kultivierungsmodus. Die Daten repräsentieren die maximalen Werte zum Ende der dreizehntägigen, satzweisen Fermentation. \pm =Standardabweichung ($n=3$). Siehe Abbildung 5.20 für weitere Informationen.

Kultivierungsmodus	Kultivierungszeit, t [d]	Biogasertrag [mL g_{oTS}^{-1}]	Methan-gehalt [% (v/v)]	Methan-ertrag [mL g_{oTS}^{-1}]
heterotroph	4	805 \pm 11	60,1 \pm 0,4	483,4
	7	780 \pm 19	60,2 \pm 0,4	469,9
	10	745 \pm 21	61,6 \pm 0,3	458,6
photoheterotroph	4	763 \pm 17	66,0 \pm 0,4	503,2
	7	768 \pm 14	65,0 \pm 0,7	499,4
	10	761 \pm 16	64,1 \pm 1,6	487,5
photoautotroph	4	574 \pm 3	66,3 \pm 1,9	380,6
	7	617 \pm 3	68,3 \pm 0,4	420,9
	10	648 \pm 7	65,8 \pm 0,3	426,4

Subtraktion des CO₂-Anteils konnten gemäß Tabelle 5.9 maximale Methanerträge von 483,4 mL g_{oTS}^{-1} für heterotroph, 503,2 mL g_{oTS}^{-1} für photoheterotroph und 426,4 mL g_{oTS}^{-1} für photoautotroph gewonnenes Substrat berechnet werden. Dass der Biogasertrag von heterotroph und photoheterotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse höher ist, als der von photoautotroph gewonnener Biomasse, deutet darauf hin, dass ein größerer Anteil des Substrats, bei dessen Gewinnung Glucose eingesetzt wurde, von dem bakteriellen Konsortium genutzt werden kann. Dies könnte dadurch begründet werden, dass das Paramylon im Gegensatz zu anderen Zellbestandteilen nahezu vollständig abgebaut werden konnte.

Der Biogasertrag beim Einsatz verschiedenartiger Mikroalgenpezies für die Biogasgewinnung ist zum Teil sehr unterschiedlich. In Tabelle 3.6 sind einige Biogas- bzw. Methanerträge nach verschiedenen Autoren aufgeführt. Untersuchungen über Biogaserträge beim Einsatz von *E. gracilis*-Biomasse sind in der Literatur jedoch sehr rar. Wie von Musgnug *et al.* (2010) berichtet wurde, beträgt der Biogasertrag von photoheterotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse 485 mL g_{oTS}^{-1} bei einem Methananteil von 67 % (v/v). Diese Daten wurden ebenfalls in einem satzweisen Prozess erhoben. Die Gewinnung dieser Biomasse fand jedoch mit einer geringen Kohlenstoffquellenkonzentration statt, welche nur 5 % des mit Glucose supplementierten Basalmediums betrug. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass der Grad an Heterotrophie eher gering war, so dass die Biomasse vermutlich eher photoautotrophe Eigenschaften aufwies. Ein direkter Vergleich der

Biogaserträge ist daher nicht möglich, obwohl die Werte bezüglich des Methananteils mit denen der photoautotroph gewonnenen Biomasse als Substrat vergleichbar waren.

Sialve *et al.* (2009) berechneten die theoretischen Methanerträge für verschiedene Mikroalgenspezies auf Basis des Protein-, Kohlenhydrat- und Lipidanteils ausgewählter Mikroalgen nach Becker (2004). Diese Berechnungen ergaben Methanerträge von 530 bis 800 mL g_{oTS}^{-1} für *E. gracilis*-Biomasse (Sialve *et al.*, 2009). Diese theoretischen Werte stimmen mit den in Tabelle 5.9 dargestellten Werten, vor allem im Hinblick auf die maximal erreichbaren 80 % (*v/v*) des theoretisch erreichbaren Biogasertrags (VDI, 2004) sehr gut überein. Der Grund, warum der Einsatz von *E. gracilis*-Biomasse zu höheren Biogaserträgen führt, als beim Einsatz der Biomasse von z. B. *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. und *Dunaliella* sp. liegt unter anderem darin begründet, dass *E. gracilis*-Biomasse in Biogasprozessen aufgrund fehlender Zellwände für die Bakterien leichter zugänglich ist, obwohl die Biomassezusammensetzung in Bezug auf Proteine, Lipide und Kohlenhydrate vergleichbar sind (Becker, 2004). Als Beispiel sei auf eine aktuelle Studie verwiesen, in der gezeigt wurde, dass mittels Vorbehandlung mit Proteasen der Biogasertrag von *Chlorella vulgaris*-Biomasse um das 2,6-fache gesteigert werden konnte (Mahdy *et al.*, 2015). Es ist generell bekannt, dass viele Mikroalgenspezies aufgrund ihrer Zellwandstrukturen eine hohe Resistenz gegenüber einer Degradation durch anaerobe Mikroorganismen zeigen (Golueke *et al.*, 1957; Mussnug *et al.*, 2010; Passos *et al.*, 2014; Klassen *et al.*, 2015). Da *E. gracilis* keine Zellwand aufweist, wird vor dem Einsatz in Biogasprozesse keine Vorbehandlungen benötigt. Daher kann auf diese energie- und kostenaufwendigen Schritte verzichtet werden.

5.2.1.1 Kurzzusammenfassung & Fazit

In Satzreaktoren konnte gezeigt werden, dass *E. gracilis*-Biomasse ein sehr vielversprechendes Substrat für die Biogasgewinnung darstellt. Neben den zum Teil sehr unterschiedlichen Selektivitäten bezüglich der Produkte Paramylon und α -Tocopherol, welche je nach angewandtem Kultivierungsmodus sehr unterschiedlich ausfielen, war auch der Biogasertrag und die Gaszusammensetzung deutlich verschieden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich der Biogasertrag ändert, wenn die Biomasse zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten geerntet wird. Während mit heterotroph gewonnener Biomasse als Substrat bis zu 805 mL g_{oTS}^{-1} Biogas erzielt wurden, konnte mit dem Einsatz von photoautotroph gewonnener Biomasse maximal 648 mL g_{oTS}^{-1} Biogas gewonnen werden. Während im Fall der heterotroph gewonnenen Biomasse der höchste Biogasertrag nach einer Kultivierungszeit von vier Tagen erzielt wurde, welcher nach längerer Kultivierungsdauer stetig abnahm, konnte bei der photoautotroph gewonnenen Biomasse zu späteren Zeitpunkten der Zellernte eine stete Zunahme an Biogas verzeichnet werden. Durch den Einsatz von photoheterotroph gewonnener Biomasse als Substrat konnte ein Biogasertrag von durchschnittlich

764 mL g_{oTS}^{-1} erzielt werden, wobei der Erntezeitpunkt keinen Einfluss auf den Biogasertrag zeigte. Auch die Biogaszusammensetzung fiel je nach angewandtem Kultivierungsmodus für die Substratgewinnung unterschiedlich aus. Während beim Einsatz von heterotroph gewonnener Biomasse ein Methangehalt von 60,6 % (v/v) erzielt wurde, lag dieser für die photoautotroph gewonnene Biomasse vermutlich aufgrund eines höheren Lipid- und Proteinanteils bei 66,8 % (v/v).

Dieser Versuch konnten zeigen, dass *E. gracilis*-Biomasse sehr gut als Substrat für die Biogasgewinnung geeignet ist und dass aufgrund fehlender Zellwandstrukturen keine Vorbehandlungen zur Erhöhung der Ausbeute benötigt werden. Die sehr kurze *lag*-Phase zeugte von einer raschen Abbaubarkeit dieses Substrates. Zwar wurde gezeigt, dass der Erntezeitpunkt der photoautotroph und heterotroph gewonnenen Biomassen einen Einfluss auf das Biogaspotential hat, jedoch ist dieser Unterschied im Vergleich zum applizierten Kultivierungsmodus eher gering. Es wäre für einen ökonomischen Prozess jedoch eher von Bedeutung, den Fokus auf eine hohe Produktivität bezüglich der Hochwertprodukte zu legen. Obwohl der Biogasertrag für die mit zusätzlicher Kohlenstoffquelle gewonnenen Biomasse weit höher war als bei photoautotropher Kultivierung, scheint der Einsatz einer Kohlenstoffquelle für die Kultivierung ökonomisch fragwürdig. Nach der Abtrennung des Paramylons stünde aufgrund der Aufreinigungsprozedur zudem kaum Restbiomasse für die Biogasgewinnung zur Verfügung. Die Untersuchung diesbezüglich war dennoch interessant, da Kultivierungsmodi und Erntezeitpunkte einer Mikroalge auf den Biogasertrag erst im Zuge dieser Arbeit beschrieben worden sind (Grimm *et al.*, 2015).

5.2.2 Verwendung von *E. gracilis*-Biomasse zur Biogasgewinnung nach α -Tocopherolextraktion

Ziel & Hintergrund

Da Bioraffineriekonzepte auf der stufenweisen Nutzung von Biomasse aufbauen, wurden die Biogaserträge jener Biomassen ermittelt, welcher zuvor α -Tocopherol mittels Methanol *p. A.* extrahiert wurden. Diese Extrakte beinhalteten zudem auch andere apolare Substanzen, wie z. B. Lipide, welche zusammen mit α -Tocopherol extrahiert wurden. Zum Vergleich wurde ein Teil der Biomassen unbehandelt belassen, um einen direkten Unterschied messen zu können. Die Bestimmung des Biogaspotentials erfolgte satzweise nach DIN EN ISO 11734 (VDI, 2004). Aufgrund einer replizierbareren Analytik wurde ein Teil der Biomassen vor der Produktextraktion lyophilisiert, obwohl in einem großtechnischen Prozess eine Gefriertrocknung energie- und kostenintensiv wäre. Aus diesem Grund wurde neben dem Lyophilisat auch frische Biomasse eingesetzt. Dies galt außerdem der Verifizierung, dass eine Produktextraktion aus frischer, unbehandelter Biomasse zu geringeren Ausbeuten führt.

Da Methanol von einigen methylo-trophen Bakterien als Substrat genutzt werden kann, wurde das restliche Methanol, welches nach der Extraktion im Pellet verblieb, bei einigen Ansätzen nicht mittels ddH_2O herausgewaschen, sondern im Pellet als zusätzliches Substrat belassen. Aufgrund der positiven Effekte der Illumination auf die α -Tocopherolselektivität und aufgrund der hohen Anzahl an benötigten Satzreaktoren wurde dieses Experiment nur mit photoheterotroph und photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse durchgeführt, welche ein Alter von zehn Tagen aufwiesen und im Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) mit bzw. ohne Glucosesupplementation bei Lichtflüssen von $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Schüttelkolben kultiviert wurden.

Ergebnisse & Diskussion

Die Biogaserträge, Methangehalte und Methanerträge von photoheterotroph und photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse als Substrat vor und nach Produktextraktion, welche in einem 22-tägigen, diskontinuierlichen Prozess erzielt wurden, sind in Tabelle 5.10 dargestellt. Zusätzlich zur Gasquantität und -qualität sind die α -Tocopherolselektivitäten der Biomassen angegeben. Die Gaserträge, sowohl der lyophilisierten als auch der frisch eingesetzten Biomassen, sind mit denen, welche in Abschnitt 5.2.1 beschrieben wurden und in Tabelle 5.9 aufgeführt sind, vergleichbar. Im Fall der photoautotroph gewonnenen Biomasse wurde der Biogasertrag durch die Lyophilisation lediglich um 3 % vermindert, die Menge an extrahiertem α -Tocopherol jedoch um 10 % erhöht. Für die photoheterotroph gewonnene Biomasse konnte die Menge an extrahiertem α -Tocopherol durch die Gefriertrocknung sogar um 24 % erhöht werden, wobei der Biogasertrag durch den Vorgang der Lyophilisation lediglich um 1 % verringert wurde. In einer Studie ist beschrieben worden, dass sich der Biogasertrag von *Chlorella kessleri* und *Chlamydomonas reinhardtii* als Substrat durch Trocknung um 20 % verringert (Mussgnug *et al.*, 2010). Eine solche Verminderung des Biogasertrags durch Trocknung konnte für *E. gracilis*-Biomassen nicht beobachtet werden. Beobachtungen aus vorangegangenen Extraktionsversuchen haben gezeigt, dass die Menge des extrahierten α -Tocopherols um so höher ist, je weniger Restflüssigkeit im Pellet verbleibt (Daten nicht gezeigt). Zumindest im Labormaßstab scheint eine Trocknung der Biomasse aufgrund einer höheren Reproduzierbarkeit unumgänglich zu sein.

Der Biogasertrag wurde durch den Prozess der Extraktion deutlich verringert. Im Fall der photoautotroph gewonnenen Biomasse konnte ein um 29 % geringerer Biogasertrag bei der lyophilisierten Biomasse und ein um 41 % geringerer Biogasertrag bei der frischen Biomasse gemessen werden. Dabei wurden Biogaserträge von $432 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ bzw. $370 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ erzielt (vgl. Tabelle 5.10). Wurde die photoheterotroph gewonnene Biomasse extrahiert, wurde für das Lyophilisat eine Abnahme des Biogasertrags von 23 % bzw.

Tabelle 5.10: Vergleich der Biogaserträge, Methangehalte und Methanerträge von extrahierter Biomasse in Bezug zum nicht extrahierten Substrat sowie α -Tocopherolselektivität von zehn Tage alter, photoautotroph und photoheterotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse. Die Daten repräsentieren die maximalen Werte zum Ende der 22-tägigen Fermentation. Die Lyophilisation erfolgte vor der Extraktion des Produktes. Die Lösemittelentfernung erfolgte durch zweimaliges Waschen des Pellets mit *ddH*₂O. Die Symbole + und – kennzeichnen, ob das Substrat behandelt wurde oder nicht. Die Bestimmung der Vergärbarkeit der Substrate erfolgte nach DIN EN ISO 11734 mit 200 mg Substrat in Bezug auf die organische Trockenmasse vor der Extraktion und 60 mL Impfschlamm. \pm =Standardabweichung (n=3).

Kultivierungsmodus	Lyophilisation	α -Tocopherol-extraktion	Lösemittelentfernung	Biogasertrag [mL g _{oTS} ⁻¹]	CH ₄ -Gehalt [% (v/v)]	CH ₄ -Ertrag [% der Rohbiomasse]	$S_{\alpha-Toc/X}$ [mg g ⁻¹]
Photo-auto-troph	+	–	–	608±14	67,1±0,7	100 ²	2,54±0,05
	+	+	–	1952±1047 ¹	77,0±0,2	321 ³	2,54±0,05
	+	+	+	432±10	69,2±1,6	71	2,54±0,05
	–	–	–	627±16	68,8±1,0	100 ²	2,30±0,05
	–	+	–	2237±348 ¹	76,4±0,8	357 ³	2,30±0,05
	–	+	+	370±8	69,4±1,4	59	2,30±0,05
Photo-heterotroph	+	–	–	777±4	64,4±0,5	100 ²	0,56±0,01
	+	+	–	3171±66 ¹	73,7±0,7	408 ³	0,56±0,01
	+	+	+	598±6	66,7±0,7	77	0,56±0,01
	–	–	–	787±9	64,9±1,0	100 ²	0,45±0,02
	–	+	–	2036±60 ¹	68,1±0,8	259 ³	0,45±0,02
	–	+	+	570±10	63,2±1,3	72	0,45±0,02

¹ Biogasertrag nach α -Tocopherol-extraktion inklusive des Biogasertrags einer undefinierten Menge restlichen Methanols im feuchten Pellet

² Methanertrag des jeweiligen nicht extrahierten Substrates, welcher als 100 % definiert wurde

³ Methanertrag in % bezogen auf das nicht extrahierte Substrat. Methanbildung aus dem Substrat inklusive einer undefinierten Menge restlichen Methanols im feuchten Pellet

28 % für die frische Biomasse im Vergleich zur unbehandelten Biomasse gemessen. Dies resultierte in Biogaserträgen von 598 mL g_{oTS}^{-1} bzw. 570 mL g_{oTS}^{-1} . Laut den gewonnenen Daten wurde der Methangehalt durch den Prozess der Extraktion nicht vermindert. Im Falle der photoautotroph gewonnenen Biomasse lag der Methangehalt beim Einsatz der extrahierten Biomasse um 0,6 % bezüglich der frischen Biomasse und um 2,1 % im Falle des Lyophilisats höher, als beim Einsatz der nicht extrahierten Biomasse. Ähnliches wurde auch für die photoheterotroph gewonnene Biomasse gemessen. Auch hier war der Methangehalt beim Einsatz des Lyophilisats um 2,3 % höher. Bezüglich der frischen Biomasse wurde ein um 1,7 % verminderter Methangehalt gemessen. Es wurde erwartet, dass der Methangehalt generell durch die Extraktion vermindert würde, zumal die Lipidanteile durch die Extraktion deutlich reduziert würden. Eventuell war trotz zweimaligen Waschens des Zellpellets noch minimale Reste des Lösemittels vorhanden, was zu leicht erhöhten Methangehalten geführt haben könnte. Dies würde allerdings auch implizieren, dass der Biogasertrag etwas geringer ausfiel, als tatsächlich gemessen.

Im Gegensatz zu Daten aus der Literatur, waren die Biogaserträge aus *E. gracilis*-Biomasse nach der Extraktion der Lipide, welche vermutlich größtenteils zusammen mit α -Tocopherol durch die Extraktion mit einem organischen Lösemittel ebenfalls entfernt wurden, geringer als bei unbehandelter Biomasse. Alzate *et al.* (2014) haben berichtet, dass die Extraktion von Lipiden aus *Nannochloropsis gadiata* mit Ethanol als organisches Lösemittel im Vergleich zur unbehandelten Biomasse zu einem 15 % höheren Biogasertrag führt. Wie von Ramos-Suárez und Ramos-Suárez & Carreras (2014) berichtet wurde, führt die Lipidextraktion aus der Biomasse von *Scenedesmus* sp. mit n-Hexan zu einem um 52 % höheren Biogasertrag. Diese Erhöhungen sind vermutlich das Resultat der Zerstörung der Zellwände durch die Behandlung mit dem organischen Lösemittel, da ein lipidarmes Substrat im Gegensatz zu einem lipidreichen Substrat verminderte Gaserträge liefern müsste. Dass sich das Biogaspotential unbehandelter Biomasse von *Scenedesmus* sp. mittels thermischer Vorbehandlung oder einer Vorbehandlung mittels Ultraschall deutlich erhöhen lässt, wurde von González-Fernández *et al.* (2012a) beschrieben. Auch bei anderen Mikroalgenspezies führt eine thermische Behandlung zu höheren Methanerträgen (Chen & Oswald, 1998; González-Fernández *et al.*, 2012b; Passos *et al.*, 2013). Bei *E. gracilis*-Zellen hingegen kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen aufgrund einer fehlenden Zellwand zu einem hohen Grad durch die anaerobe Fermentation allein zerstört wurden. Der durch die Extraktion hervorgerufene geringere Lipidanteil führte vermutlich zu der geringeren Biogasbildung. Die Lipide, welche als Nebenprodukt der α -Tocopherolgewinnung extrahiert wurden, könnten jedoch als Rohstoff für die Biodieselproduktion ebenfalls energetisch verwendet werden (Chisti, 2007; Campbell, 2008; Scott *et al.*, 2010).

Die Verwendung von Methanol als organisches Lösemittel für die Extraktion hat gegenüber anderen organischen Lösemitteln einen entscheidenden Vorteil, wenn die Restbiomasse für die Biogasproduktion bereitgestellt werden soll. Da Methanol von einigen methylo-trophen Methanogenen als zusätzliches Substrat genutzt werden kann (Garcia *et al.*, 2000), ist eine vollständige Entfernung dieses Lösemittels vor dem Einsatz der Biomasse für die Biogasgewinnung nicht notwendig und hat sogar den Vorteil, dass der Biogasertrag und der Methananteil im Biogas dadurch sogar erhöht wird. Aufgrund der Oxidationszahl des Methanols wird diese Substanz anaerob zu 75 % CH₄ und zu 25 % CO₂ reduziert (Gujer & Zehnder, 1983). Wie der Tabelle 5.10 zu entnehmen ist, entstand durch das restliche Methanol im Pellet ein weit höherer Biogasertrag mit einem höheren Methangehalt. Im Fall der photoautotroph gewonnenen Biomasse war der Methanertrag etwa um das Dreifache höher, wobei maximale Methangehalte von 77 und 76,4 % (*v/v*) erzielt wurden. Theoretisch können bei der Biogasbildung aus Methanol keine Methangehalte > 75 % (*v/v*) vorkommen. Es wurde jedoch angenommen, dass ein Teil des Kohlenstoffdioxids aufgrund des neutralen bis leicht basischen pH-Wertes, bei welcher die Biogasbildung stattfindet, in der wässrigen Phase gebunden wurde und der tatsächliche Methangehalt etwas geringer war. Für die photoheterotroph gewonnene Biomasse war sogar ein etwa vierfach höherer Biogasertrag für die lyophilisierte und ein ca. 2,5-fach höherer Biogasertrag für die frische Biomasse zu verzeichnen, wobei Methangehalte von 73,7 bzw. 68,1 % (*v/v*) erzielt wurden. Dieser zusätzliche Biogasertrag ist hauptsächlich durch das Methanol im Retentat zustande gekommen. Aufgrund der Schwierigkeit einer reproduzierbaren Entfernung der Extraktanden zeigten diese Werte jedoch extrem hohe Standardabweichungen.

5.2.2.1 Fazit

Für Bioraffineriekonzepte, in denen die Restbiomasse für die Bioenergiegewinnung zur Verfügung stehen soll, ist es essenziell, dass diese Substanzen auch nach der Extraktion der Hochwertprodukte eingesetzt werden können. Bei diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass bei dem Einsatz von *E. gracilis*-Biomasse auch nach der Extraktion des Produktes α -Tocopherol noch immer hohe Biogaserträge erzielt werden können. Im Fall von Paracylon gestaltet sich dies jedoch schwierig, da der Aufreinigungsprozess die sequenzielle Entfernungen aller nicht erwünschten Substanzen beinhaltet. Nach der vollständigen Aufreinigung bliebe nur ein hochgradig verdünntes Prozesswasser mit Proteinen, Peptiden und Harnstoff übrig, welches zudem noch einen Konzentrierungsschritt benötigt. Dies lässt einen energieeffizienten Prozess nahezu unmöglich erscheinen. Hinzu kommt, dass Harnstoff anaerob zwar abgebaut werden kann, aufgrund der Oxidationszahl des Kohlenstoffs würde jedoch ausschließlich CO₂ gebildet (Gujer & Zehnder, 1983). Eine zusätzliche Stickstofffracht könnte mitunter negative Folgen für den Prozess haben, da hohe Konzentrationen

an inhibierendem Ammonium gebildet würden. Eine alternative Methode zur Aufreinigung des Paramylons könnte eventuell die Nutzung der Restbiomasse zur Biomethangewinnung ermöglichen.

Wenn α -Tocopherol das einzige Hochwertprodukt darstellt, wobei die Lipide im Extrakt noch zusätzlich z. B. für Biodieselproduktion verwendet werden könnten (Chisti, 2007; Campbell, 2008; Scott *et al.*, 2010), bleibt ein Großteil der Biomasse für die Gewinnung von Biogas übrig, welches problemlos ohne weitere Behandlung den Biogasfermentern zugeführt werden kann. Obwohl eine Trocknung der Biomasse, welche beispielsweise mittels Lyophilisation oder Sprühtrocknung bewerkstelligt werden kann, einen erheblichen Kosten- und Energieaufwand darstellt, kann eine Trocknung eine effizientere und reproduzierbarere Produktgewinnung gewährleisten. Obwohl apolarere organische Lösemittel als Methanol eine höhere Extraktionseffizienz gewährleisten könnten, müsste dieses vermutlich ausgiebig aus dem Substrat entfernt werden, da viele organische Lösemittel im Gegensatz zu Methanol nicht abgebaut werden und den anaeroben Prozess inhibieren können (Chen *et al.*, 2008).

Die in diesem Versuch eingesetzte Extraktionsmethode hat den Nachteil, dass diese nur für lyophilisierte Biomasse hohe Ausbeuten erzielt. Bei dem Einsatz von frischer Biomasse könnten andere Methoden angewendet werden. Weil α -Tocopherol als Membranbestandteil intrazellulär vorliegt, müsste die Biomasse vor der Extraktion desintegriert werden. Für die Extraktion selbst wäre die Verwendung eines stark apolaren Lösemittels wie z. B. *n*-Hexan zu verwenden und eine Zweiphasenextraktion durchzuführen, wobei das organische Lösemittel z. B. in einem Rotationsverdampfer wiedergewonnen und recycelt werden kann. Eine effiziente, alternative Methode, α -Tocopherol zu extrahieren, stellt die Extraktion mittels überkritischem CO₂ dar (King *et al.*, 1996; Ge *et al.*, 2002; Mendiola *et al.*, 2008), was jedoch aufgrund der technischen Umsetzbarkeit im Zuge dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

5.2.3 Elementare Zusammensetzung der *E. gracilis*-Biomasse und theoretischer Biogasertrag sowie Methangehalt beim Einsatz der Biomasse als Substrat für die Biogask Gewinnung

Ziel & Hintergrund

Wenn die elementare Zusammensetzung eines Substrates bekannt ist, kann der Biogasertrag und die Biogaszusammensetzung theoretisch berechnet werden. Aufgrund der unterschiedlichen Paramylonselektivitäten, welche aus den unterschiedlichen Kultivierungsmodi resultieren, ist zu erwarten, dass auch die Biomassen sehr unterschiedliche elementare Zusammensetzungen aufweisen. Auch der Vorgang der α -Tocopherolextraktion müsste eine Veränderung der elementaren Zusammensetzung bewirken, weil dadurch au-

ßerdem ein Großteil der Lipide aus der Biomasse extrahiert werden. Die Extraktion der lipophilen Substanzen dürfte somit eine Verringerung des C/N-Verhältnisses bewirken. Über eine Elementaranalyse lässt sich das C/N-Verhältnis ermitteln, welches bei kontinuierlichen Prozessen einen erheblichen Einfluss auf die Biogasbildung zeigt, da geringe C/N-Verhältnisse aufgrund hoher Proteingehalte zu einer erhöhten Akkumulation von Ammonium bzw. Ammoniak führen. Des Weiteren ist die Zusammensetzung und die Konzentration der Spurenelemente von Interesse, da vor allem die methanogenen Archaeen häufig durch Spurenelementmangel inhibiert werden. Dies ist häufig bei Prozessen ohne Gülle als Grundsubstrat kritisch (Scholwin *et al.*, 2009).

Ergebnisse & Diskussion

Für die Bestimmung der elementaren Zusammensetzung wurde *E. gracilis* heterotroph, photoheterotroph und photoautotroph über einen Zeitraum von sieben Tagen gemäß Abschnitt 4.1.3 im Basalmedium nach Cramer & Myers (1952) kultiviert. Die Zellen wurden nach der Ernte zweimal mit den Volumina der Ausgangskulturen mit ddH_2O gewaschen und anschließend lyophilisiert. Aus einem Teil der photoheterotroph und photoautotroph gewonnenen Biomasse wurde α -Tocopherol mit Methanol *p. A.* extrahiert, um auch die elementare Zusammensetzung von extrahierter Biomasse zu ermitteln. Die Extraktion erfolgte aus jeweils ca. 3 g lyophilisierter *E. gracilis*-Biomasse mit 70 mL Methanol *p. A.* gemäß Abschnitt 4.2.3 in einem 250 mL-Rundkolben. Die Elementarzusammensetzung in Bezug auf die Elemente C, H, O, N, P und S sind in Tabelle 5.11 dargestellt.

Das Verhältnis von CO_2 zu CH_4 ließ sich mittels der Gleichung 3.6 auf Seite 41 nach Symons & Buswell (1933) bestimmen. Nach der Gleichung von Angelidaki & Sanders (2004) konnte außerdem der maximale Methanertrag theoretisch berechnet werden (vgl. Gleichung 3.9 auf Seite 41). Als Grundlage dazu dienten die Daten aus Tabelle 5.11. Da sowohl der Anteil an CH_4 und CO_2 sowie das Methanvolumen berechnet werden konnte, konnte auch der Biogasertrag ermittelt werden (vgl. Gleichung 3.10 auf Seite 41). Die Ergebnisse dazu sind in Tabelle 5.12 dargestellt.

Während laut den theoretischen Berechnungen mit der heterotroph gewonnenen Biomasse als Substrat für die Biogasgewinnung Methangehalte von 56,2 % (v/v) erzielt werden können, wurden höhere Methangehalte für die unter Illumination gewonnenen Biomassen berechnet. Der theoretische Methangehalt beim Einsatz von photoautotroph gewonnener Biomasse war mit ca. 65 % (v/v) am höchsten. Weil der theoretische Methangehalt der photoheterotroph gewonnenen Biomasse mit 57,2 % (v/v) nur geringfügig höher war als der der heterotroph gewonnenen Biomasse, wurde angenommen, dass die Heterotrophie einen größeren Einfluss auf die Biogaszusammensetzung aufweist, als die Illumination. Dies war auf den höheren Paramylongehalt der photoheterotroph gewonnenen Biomasse

Tabelle 5.11: Elementare Zusammensetzung von heterotroph (het), photoheterotroph (phohtet) und photoautotroph (photaut) gewonnenen, sieben Tage alten, lyophilisierten *E. gracilis*-Biomassen in Bezug auf die Elemente C, H, O, N, P und S. Dargestellt als Massenanteil ω in % (w/w) (obere Tabellenhälfte) und als Stoffmengenanteil χ in Mol-% (untere Tabellenhälfte). Ein Teil der photoheterotroph und photoautotroph gewonnenen Biomassen wurde vor der Analyse mit Methanol *p. A.* extrahiert.

Element	het	phohtet	phohtet, extrahiert	photaut	photaut, extrahiert
	ω [% (w/w)]	ω [% (w/w)]	ω [% (w/w)]	ω [% (w/w)]	ω [% (w/w)]
C	44,5	46,3	41,5	49	43,5
H	6,6	6,9	6,5	7,3	6,7
O	38,2	37,5	37,8	19,4	24,6
N	2,1	2,3	2,3	7,8	9
P	1,7	1,1	1,1	2,3	2,6
S	0,12	0,13	0,13	0,42	0,44
	χ [Mol-%]	χ [Mol-%]	χ [Mol-%]	χ [Mol-%]	χ [Mol-%]
C	28,73	28,99	27,61	30,84	28,76
H	51,14	51,85	51,89	55,13	53,15
O	18,50	17,61	18,86	9,16	12,20
N	1,16	1,23	1,31	4,21	5,10
P	0,44	0,28	0,29	0,58	0,69
S	0,03	0,03	0,03	0,09	0,11

zurückzuführen. Auch die Extraktion zeigte einen Einfluss auf den theoretischen Methangehalt. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei dem Extraktionsmittel um ein organisches Lösemittel handelt, wurden auch Lipide aus der Biomasse extrahiert, was zu einem etwas verminderten, theoretischen Methangehalt führte.

Die in Abschnitt 5.2.1 beschriebenen, in einer satzweisen Fermentation erzielten Methangehalte waren jedoch höher, als die theoretisch berechneten (vgl. Tabelle 5.9). Beim Einsatz der Biomassen, welche nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen geerntet wurden, wurden Methangehalte von 60,2 % (v/v) für die heterotroph, 65 % (v/v) für die photoheterotroph und 68,3 % (v/v) für die photoautotroph gewonnene Biomasse erzielt. Der theoretische Methangehalt war im Fall der heterotrophen und photoautotrophen gewonnenen Biomassen nur 4 % (v/v) bzw. 3,2 % (v/v) geringer. Für die photoheterotroph gewonnene Biomasse wurde jedoch eine Abweichung von 7,8 % (v/v) beobachtet. Laut der Richtlinie 4630 vom Verein Deutscher Ingenieure (VDI, 2004) ist der theoretische Methangehalt häufig geringer als der im Versuch gemessene, da ein Teil des Kohlendioxids aufgrund des pH-Wertes des Gärmediums stärker absorbiert wird als Methan. Dies wurde im Fall der in Satzfermentationen bestimmten und theoretisch berechneten Methangehalte für diese Biomassen nicht beobachtet. Die theoretisch berechneten und die empirisch

erhobenen Methangehalte waren jedoch einigermaßen vergleichbar und ließen einen Trend erkennen.

Der Biogasertrag, welcher anhand der elementaren Biomassezusammensetzung berechnet wurde, war für die mit Glucose kultivierten Zellen im Gegensatz zu den photoautotroph gewonnenen Zellen deutlich geringer. Für die heterotroph und photoheterotroph gewonnenen Biomassen wurden $930 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ bzw. $953 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ berechnet, wohingegen beim Einsatz von photoheterotroph gewonnener Biomasse $1208 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ theoretisch erzielt werden können. Wurden die Biomassen zuvor extrahiert, waren die theoretischen Biogaserträge etwas geringer. Für die photoheterotroph gewonnene Biomasse konnte jedoch noch ein Biogasertrag von $903 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ berechnet werden, wohingegen im Fall der photoautotrophen Biomasse nach Extraktion nur noch $1086 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ theoretisch erzielt werden können.

Diese theoretisch ermittelten Biogaserträge waren weitaus höher als die empirisch erhobenen Biogaserträge, welche in Tabelle 5.9 dargestellt sind. Des Weiteren wird bei einem Vergleich der Tabellen 5.9 und 5.12 deutlich, dass, abgesehen von den absoluten Werten, gegensätzliche Ergebnisse erzielt wurden. Während beim Einsatz der heterotroph gewonnenen Biomasse in der Satzfermentation ein Biogasertrag von $780 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ erzielt wurde, konnten beim Einsatz der photoautotroph gewonnene Biomasse lediglich $617 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ gewonnen werden.

Dass die theoretischen Biogas- bzw. Methanerträge experimentell nie erreicht werden können, wurde auch von Angelidaki & Sanders (2004) beschrieben. Demnach können im Fall von wasserlöslichen Substanzen maximale Abbaugrade von 90 bis 95 % erreicht werden, wohingegen bei partikel- und strukturreichem Substrat Abbaugrade von 30 bis 60 % möglich sind. Nach der VDI-Richtlinie 4630 (2004) werden Abbaugrade von durchschnittlich 80 % angegeben. Als Grund, weshalb beim Einsatz der photoautotroph gewonnene Biomasse im Satzfermentationen im Vergleich zur theoretischen Berechnung weitaus geringere Biogas- bzw. Methanerträge erzielt werden konnten, könnte angenommen werden, dass einige der Substanzen, welche hauptsächlich im photoautotrophen Kultivierungsmodus gebildet werden, von dem bakteriellen Konsortium schlechter abgebaut werden bzw. dass beim Einsatz der im heterotrophen und photoheterotrophen Kultivierungsmodus gewonnenen Biomasse aufgrund des hohen Anteils an leicht abbaubarem Paramylon höhere Abbaugrade erzielt werden können. Eine andere Möglichkeit wäre eine Inhibition des Abbaus des photoautotroph gewonnenem Substrats durch eine hohe Ammoniakakkumulation im Satzreaktor, da die photoautotroph gewonnene Biomasse laut Tabelle 5.11 weitaus höhere Stickstoffanteile als jene Biomassen aufwies, welche mit einem organischen Kohlenstoffsupplement gewonnen wurden. Die Ammoniakkonzentration wurde bei den Satzfermentationen jedoch nicht ermittelt, weshalb an dieser Stelle diesbezüglich nur spekuliert werden kann.

Tabelle 5.12: Theoretische Methan- und Kohlenstoffdioxidgehalte, Methan- und Biogaserträge sowie C/N-Verhältnisse von heterotroph, photoheterotroph und photoautotroph gewonnenen, sieben Tage alten *E. gracilis*-Biomassen. Einem Teil der photoheterotroph und photoautotroph gewonnenen Biomassen wurden vor der Analyse mit Methanol *p. A.* extrahiert.

Biomasse	CH₄ [% (v/v)]	CO₂ [% (v/v)]	CH₄ [mL g _{oTS} ⁻¹]	Biogas [mL g _{oTS} ⁻¹]	C/N [-]
heterotroph	56,2	43,8	522	930	21,2:1
photoheterotroph	57,2	42,8	545	953	20,1:1
photohet, extrahiert	56,4	43,6	509	903	18,0:1
photoautotroph	64,9	35,1	784	1208	6,3:1
photaut, extrahiert	62,5	37,5	678	1086	4,8:1

Von Sialve *et al.* (2009) wurde der Methanertrag beim Einsatz von *E. gracilis*-Biomasse zur Biogasgewinnung anhand der Zusammensetzung in Bezug auf den Anteil an Kohlenhydraten, Proteinen und Lipiden nach Becker (2004) berechnet. Demnach wäre ein Methanertrag von 530 bis 800 mL g_{oTS}⁻¹ zu erwarten. Diese Berechnungen stimmen mit den theoretischen Methanerträgen aus Tabelle 5.12 relativ gut überein.

Der Einfluss des Kultivierungsmodus und der Extraktion auf das C/N-Verhältnis ist ebenfalls in Tabelle 5.12 dargestellt. Es wird deutlich, dass das C/N-Verhältnis höher war, wenn die Biomasse mit einer organischen Kohlenstoffquelle gewonnen wurde. Während die heterotroph und photoheterotroph gewonnenen Biomassen C/N-Verhältnisse von 21,2:1 bzw. 20,1:1 aufwies, betrug dieses für die photoautotroph gewonnene Biomasse lediglich 6,3:1. Auch die Extraktion ging mit einer Verringerung des C/N-Verhältnisses einher. Nach der Extraktion des α -Tocopherols mittels Methanol *p. A.* wiesen die photoheterotroph und photoautotroph gewonnenen Biomassen C/N-Verhältnisse von 18:1 bzw. 4,8:1 auf.

In der Literatur werden typische C/N-Verhältnisse von Mikroalgenbiomassen in einem Bereich von 5:1 bis 9:1 angegeben (Yen & Brune, 2007; Lardon *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2012). Die photoautotroph gewonnene Biomasse wies demnach ein für Mikroalgenbiomasse typisches C/N-Verhältnis auf. Im Gegensatz dazu wiesen die heterotroph und die photoheterotroph gewonnenen Zellen aufgrund der in Abschnitt 5.1.1.3 beschriebenen höheren Paramylonselektivitäten weit höhere C/N-Verhältnisse auf, welche für stabile Prozesse optimale C/N-Verhältnisse darstellen, deren optimaler Bereich laut Literatur zwischen 15:1 und 30:1 (Braun, 1982; Zubr, 1986) bzw. 16:1 und 25:1 (Deublein & Steinhauser, 2008) liegt. Laut Yen & Brune (2007) geht ein höheres C/N-Verhältnis zudem mit einer Erhöhung der Biogasbildungsgeschwindigkeit einher. Bei einem Vergleich der Abbildungen 5.20 (a–c), welche in Abschnitt 5.2.1 dargestellt sind, wird ersichtlich, dass dies auch für die *E. gracilis*-Biomassen beobachtet werden konnte.

In Tabelle 5.13 sind die spezifischen Konzentration der Spurenelemente der *E. gracilis*-Biomassen dargestellt. Dieser ist zu entnehmen, dass die Biomassen vor allem reich an Cobalt, Eisen, Mangan und Zink sind, während Chrom, Kupfer, Molybdän, Selen und Zinn hingegen nur in geringeren Konzentrationen vorhanden sind. Die Letztgenannten wurden laut des Prüfberichts der Wessling GmbH zwar detektiert, jedoch war die Konzentration vergleichsweise gering, so dass diese lediglich mit einer Konzentration von $< 5 \mu\text{g g}^{-1}$ angegeben wurden. Aufgrund uneinheitlicher Angaben über benötigte Spurenelementkonzentrationen für anaerobe Prozesse (vgl. Tabelle 3.4) war eine qualitative Bewertung nicht möglich. Es wurde jedoch angenommen, dass eine Inhibition durch eine Spurenelementdepletion durch die Elemente Cobalt, Eisen, Mangan und Zink unwahrscheinlich erscheint. Aufgrund der geringen Konzentrationen an Chrom, Kupfer, Molybdän, Selen, Zinn scheint eine mögliche Inhibition jedoch nicht ausgeschlossen.

Tabelle 5.13: Spezifische Konzentrationen der Spurenelemente von heterotroph (het), photoheterotroph (photohet) und photoautotroph (photoaut) gewonnenen, sieben Tage alten, lyophilisierten *E. gracilis*-Biomassen. Ein Teil der photoheterotroph und photoautotroph gewonnenen Biomassen wurde vor der Analyse mit Methanol *p. A.* extrahiert. Die Angabe $\mu\text{g g}^{-1}$ bezieht sich auf die Biotrockenmasse.

Element	het [$\mu\text{g g}^{-1}$]	photohet [$\mu\text{g g}^{-1}$]	photohet, extrahiert [$\mu\text{g g}^{-1}$]	photoaut [$\mu\text{g g}^{-1}$]	photoaut, extrahiert [$\mu\text{g g}^{-1}$]
Co	12	9,1	8,4	47	52
Cr	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Cu	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Fe	220	130	140	460	530
Mn	64	52	57	220	250
Mo	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Ni	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Se	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Zn	16	18	21	61	72

5.2.3.1 Fazit

Die theoretische Berechnung des Methan- bzw. Biogasertrags kann zwar für eine erste Approximation durchaus verwertbare Daten liefern, wobei auf Basis dieser Daten keine tatsächlichen Erträge vorhergesagt werden können, da diese zum Teil widersprüchliche Aussagen im Vergleich zu den empirisch erhobenen Biogaserträgen liefern. Jedoch werden einige Aspekte, vor allem in Bezug auf eventuelle Inhibitoren und schwer abbaubare Substanzen, nicht berücksichtigt. Als Beispiel sei an dieser Stelle auf Lignin verwiesen, welches zwar keinen Stickstoff aufweist und somit zu einem höheren C/N-Verhältnis führt, jedoch in anaeroben Prozessen nicht abgebaut werden kann. Somit ist das C/N-Verhältnis

des verwertbaren Anteils geringer, da nur dieser Anteil von den Bakterien und Archaeen auch umgesetzt werden kann. Im Fall der theoretischen Biogaszusammensetzung stimmen die theoretischen Approximationen mit den empirischen Daten einigermaßen überein.

Die elementare Zusammensetzung liefert jedoch wichtige Daten bezüglich des C/N-Verhältnisses. Es konnte gezeigt werden, dass die heterotroph und photoheterotroph gewonnenen Biomassen optimale C/N-Verhältnisse aufweisen, wohingegen der Einsatz von photoautotroph gewonnener Biomasse aufgrund des geringen C/N-Verhältnis bei der fermentativen Biogasgewinnung eventuell zu hohen Ammoniakkonzentrationen führen kann. Auch die Extraktion weist einen negativen Einfluss auf C/N-Verhältnis auf, was im Fall der photoautotroph gewonnenen Biomasse das ohnehin geringe C/N-Verhältnis zusätzlich verringert.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Biomasse nur geringe spezifische Konzentrationen bestimmter Spurenelemente aufweist, so dass eine Spurenelementdepletion beim Einsatz der Biomasse als Substrat für die Biogasgewinnung nicht auszuschließen ist. Durch die gezielte Supplementierung dieser Spurenelemente könnte einer Inhibition durch Spurenelementmangel jedoch problemlos entgegengewirkt werden.

5.2.4 Kontinuierliche Gewinnung von Biogas mit *E. gracilis*-Biomasse im Rührkesselreaktor

Die Ergebnisse in Abschnitt 5.2.1 konnten zeigen, dass mit *E. gracilis*-Biomassen als Substrat hohe Biogaserträge von 574 bis 805 mL $\text{g}_{\text{OTS}}^{-1}$ mit Methangehalten von 60,1 bis 68,3 % in Satzverfahren erzielt werden können, wobei die Biogaserträge und die -zusammensetzungen vom Kultivierungsmodus und vom Erntezeitpunkt der *E. gracilis*-Biomassen zum Teil stark beeinflusst wurde. In Abschnitt 5.2.2 wurde gezeigt, dass die Biomassen auch nach der Extraktion des Produktes α -Tocopherol hohe Biogaserträge und Methangehalte ermöglichen.

Die kontinuierlichen Fermentationen bezüglich der Monovergärung von *E. gracilis*-Biomassen als Substrat für die Biogasgewinnung galten der Überprüfung, ob bei einer solchen Betriebsweise ebenfalls hohe Gaserträge erzielt werden können und bis zu welcher Faulraumbelastung stabile Prozesse möglich sind. Dazu wurde photoautotroph gewonnene Biomasse in einem 3,5 L Rührkesselreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 1 L mesophil über einen längeren Zeitraum vergoren, wobei die Substratzugabe aufgrund des personellen Aufwands nur einmal täglich erfolgte. Zur Überprüfung, ob im Sinne einer Wertschöpfungskette mehrere Produkte aus der Biomasse generiert werden können, wurde zudem photoautotroph gewonnene Biomasse eingesetzt, welche zuvor lyophilisiert und das Produkt α -Tocopherol mittels Methanol *p. A.* extrahiert wurde.

Zur Bewertung der Prozesse wurden mehrere Parameter gemessen und bewertet. Zur Bestimmung der Produktivität des Substrates wurde der Gasvolumenstrom gemessen und die Gaszusammensetzung bestimmt. Daraus ließ sich der Methanertrag berechnen. Anhand dieser Parameter wurde die volumetrische und die massebezogene Produktivität berechnet. Als weitere Prozessparameter wurde der pH-Wert und das Redoxpotential aufgenommen. Während die letztgenannten Parameter nur bedingt Rückschlüsse auf Prozessimbalancen zuließen, dienten die Konzentrationen der flüchtigen organische Säuren, welche täglich gemessen wurden, als bessere Indikatoren für die Prozessstabilität bzw. für eine beginnende Imbalance. Generell benötigen Prozesse ohne Gülle als Grundsubstrat eine erhöhte Prozessüberwachung (Scholwin *et al.*, 2009). Weiland (2008) hat beschrieben, dass das Verhältnis von Propionsäure zu Essigsäure als Indikator für eine Prozessinstabilität verwendet werden kann. Ein weiterer Hinweis auf die Entstehung einer Prozessstörung sind steigende Buttersäure- und Isobuttersäurekonzentrationen (Ahring *et al.*, 1995). Die Ammoniumkonzentrationen wurden wöchentlich gemessen und die Ammoniakkonzentrationen bei dem jeweiligen pH-Wert und der vorherrschenden Temperatur berechnet, um eine mögliche Inhibition durch hohe Ammoniakkonzentrationen zu detektieren.

5.2.4.1 Kontinuierliche Gewinnung von Biogas mit photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse im Rührkesselreaktor

Ziel & Hintergrund

Das Ziel dieser Fermentation lag in der kontinuierlichen Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse als Monosubstrat. Die Gesamtdauer dieser Fermentation betrug 100 Tage und wurde mit einer Faulraumbelastung von $0,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ begonnen, wobei diese nach einem konstanten Biogasertrag über einen Zeitraum von etwa vier Tagen um jeweils ca. $0,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erhöht wurde. Da dieser Prozess ohne Gülle als Grundsubstrat ablief, erfolgte die Prozessüberwachung regelmäßig, um den Zeitpunkt einer auftretenden Prozessstörung zu ermitteln. Es wurde erwartet, dass Prozessstörungen bei einer Faulraumbelastung $\geq 2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ aufgrund einer erhöhten organischen Fracht auftreten, welche zudem ein geringes C/N-Verhältnis von ca. 6:1 (vgl. Tabelle 5.12) aufwies, was die Wahrscheinlichkeit einer Inhibition durch Ammoniak erhöhte.

Die Biomasse stammte aus mehreren photoautotrophen, kontinuierlichen Kultivierungen, welche in einem Flachplattenphotobioreaktor realisiert wurden. Als Medium für diese Kultivierungen wurde das EG5.1-Medium, welches von Herrn Dominik Cholewa am Lehrstuhl für Fermentationstechnik entwickelt wurde, verwendet. Bei diesem Medium handelte es sich, wie beim Basalmedium nach Cramer & Myers (1952), um ein Minimalmedium. Die Zusammensetzung dieses Mediums ist in Tabelle 4.2 aufgeführt. Die Ergebnisse zu diesen

Kultivierungen sind der Dissertationsschrift von Herrn Dominik Cholewa, Universität Bielefeld, zu entnehmen.

Das Substrat wurde auf eine Trockenmassekonzentration von ca. $100 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1}$ konzentriert und in frischer Form dem Fermenter zugeführt. Die Probenahme erfolgte unmittelbar vor der Substratzugabe, wobei das Volumen des Zulaufs dem des Ablaufs entsprach. Infolgedessen entsprach die hydraulische Verweilzeit bei einer Faulraumbelastung von $0,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 200 Tage. Diese verkürzte sich jedoch mit steigender Faulraumbelastung. Der Zusammenhang zwischen Faulraumbelastung und Verweilzeit in Abhängigkeit von der Trockenmassekonzentration des Substrates ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Ein geringer konzentriertes Substrat hätte im Laufe der Zeit eventuell ein Auswaschen einiger Spezies des mikrobiellen Konsortiums zufolge gehabt, weil die Wachstumsgeschwindigkeiten der acetogenen Bakterien und methanogenen Archaeen zum Teil sehr niedrig sind. Es wurde während der gesamten Prozessdauer kein frischer Klärschlamm hinzugefügt. Der Gehalt an organischer Trockensubstanz für dieses Substrat betrug 91,6 % (*w/w*).

Der pH-Wert wurde zwar *online* gemessen, jedoch hat sich herausgestellt, dass trotz der Verwendung einer für Klärschlämme geeigneten pH-Einstabmesskette und regelmäßiger Kalibrierung nach einigen Wochen keine verlässlichen Werte geliefert werden konnten. Es wurde vermutet, dass das Diaphragma im Laufe der Fermentation von einem bakteriellen Biofilm überzogen worden war. Das gleiche galt auch für die Redox-Einstabmesskette. Daher wurde der pH-Wert und das Redoxpotenzial bei jeder Probenahme zusätzlich *offline* gemessen. Diese *offline*-ermittelten Werte sind im Folgenden dargestellt.

Ergebnisse

Abbildung 5.21 zeigt den Verlauf des pH-Wertes und des Redoxpotentials über den gesamten Versuchszeitraum von 100 Tagen. Der initiale pH-Wert des Klärschlammes betrug 8, nahm jedoch direkt nach Beginn der Zufütterung ab und erreichte nach einer dreitägigen Fermentationsdauer Werte um 7,5. Bis zum Tag 30 schwankte der pH-Wert mit einer Ausnahme am 23. Versuchstag zwischen 7,5 und 7,65, woraufhin ein Anstieg des pH-Wertes auf etwa 7,8 zu verzeichnen war. Im weiteren Verlauf war der pH-Wert relativ konstant und erreichte Werte zwischen 7,7 und 7,9. Erst zum Ende der Fermentation sank der pH-Wert erneut auf unter 7,5. Da die Zufütterung jedoch zu diesem Zeitpunkt eingestellt wurde, wurde der ursprüngliche pH-Wert wieder erreicht. Anhand des pH-Wertes, welcher während des gesamten Prozesses aufgrund der Pufferkapazität im optimalen Bereich lag, konnten keine Rückschlüsse auf Prozessimbilanzen gezogen werden. Das Redoxpotential lag in den ersten zehn Tagen der Fermentation zwischen -240 und -220 mV und erreichte nach 29 Tagen ein Minimum von -297 mV. Bis zum Tag 58 schwankte das Redoxpotential zwischen -300 und -250 mV. Nach diesem Zeitpunkt lag das Redoxpotential konstant

bei -300 mV. Da auch das Redoxpotential vor allem bei einer Faulraumbelastung von $2,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ im optimalen Bereich lag, konnte auch anhand dieses Parameters keine Störung des Prozesses detektiert werden.

Der kumulierte Biogasertrag und der Gasvolumenstrom sind ebenso in Abbildung 5.21 dargestellt. Zu Beginn des Prozesses konnte bei der Biogasbildung zunächst eine leichte Verzögerung mit sehr geringer Biogasbildung beobachtet werden. Nach Erhöhung der Faulraumbelastung auf $1,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ war zu erkennen, dass der Anstieg der Biogasertragskurve in etwa linear verlief. Dieser lineare Anstieg war auch bei einer Faulraumbelastung von $2 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ zu erkennen. Bei einer Faulraumbelastung von $2,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ flachte die Kurve zum Ende hin etwas ab. Nach dem Zufütterungsstopp wurde kaum restliches, im Schlamm verbliebenes Substrat umgesetzt. Abgesehen von den ersten elf Tagen der Fermentation, wo eine stetige Erhöhung des Gasvolumenstroms beobachtet werden konnte, unterlag dieser täglichen Schwankungen. Bezogen auf den gesamten Verlauf der Fermentation, betrug der durchschnittliche Gasvolumenstrom $899 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Bei einer Faulraumbelastung von $0,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ konnte ein mittlerer Gasvolumenstrom von $219 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gemessen werden. Dieser erschien jedoch nur deshalb so gering, da in den ersten zwei Tagen aufgrund der erfolgten Adaptation der Bakterien nur geringe Mengen Biogas produziert wurde und sich erst etwas Überdruck im Reaktor bilden musste, um das Biogas durch den MilliGascounter[®] zu befördern. Bei Erhöhung der Faulraumbelastung stieg auch der durchschnittliche Gasvolumenstrom an. Bei einer Faulraumbelastung von $1 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ betrug der mittlere Volumenstrom $829 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, bei $1,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 1071 mL d^{-1} und bei $2 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 1209 mL d^{-1} . Erst ab einer Faulraumbelastung von $2,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nahm der Volumenstrom deutlich ab und erreichte einen Mittelwert von 802 mL d^{-1} . Insgesamt wurden bei diesem kontinuierlichen Prozess $84,9 \text{ L}$ Biogas gebildet und 128 g_{oTS} Substrat zugegeben. Daraus ergibt sich, dass durchschnittlich $663 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ Biogas erzielt werden konnten. Dieser Wert stimmt mit denen, welche bei den in Abschnitt 5.2.1 beschriebenen satzweisen Prozessen ermittelt wurden, überein. Dies kann als Indiz dafür angesehen werden, dass das gesamte zugeführte Substrat nahezu vollständig umgesetzt wurde.

Der Methangehalt sowie der daraus berechnete kumulierte Methanertrag sind ebenfalls der Abbildung 5.21 zu entnehmen. Zu Beginn der Fermentation lag der Methangehalt aufgrund der geringen Aktivität der Methanogenen lediglich bei 29% (v/v), nahm jedoch bis zur Erhöhung der Faulraumbelastung auf $1,5 \text{ g L}^{-1}$ stetig zu und betrug zu diesem Zeitpunkt etwa 70% (v/v). Im weiteren Verlauf der Fermentation schwankte der Methangehalt zwischen 64 und 70% (v/v), wobei unter Vernachlässigung der ersten zehn Tage der Fermentation ein durchschnittlicher Methangehalt von $67,8 \%$ (v/v) erzielt wurde. Auch diese Werte stimmten sehr gut mit den in Abschnitt 5.2.1 dargestellten Methangehalten, welche

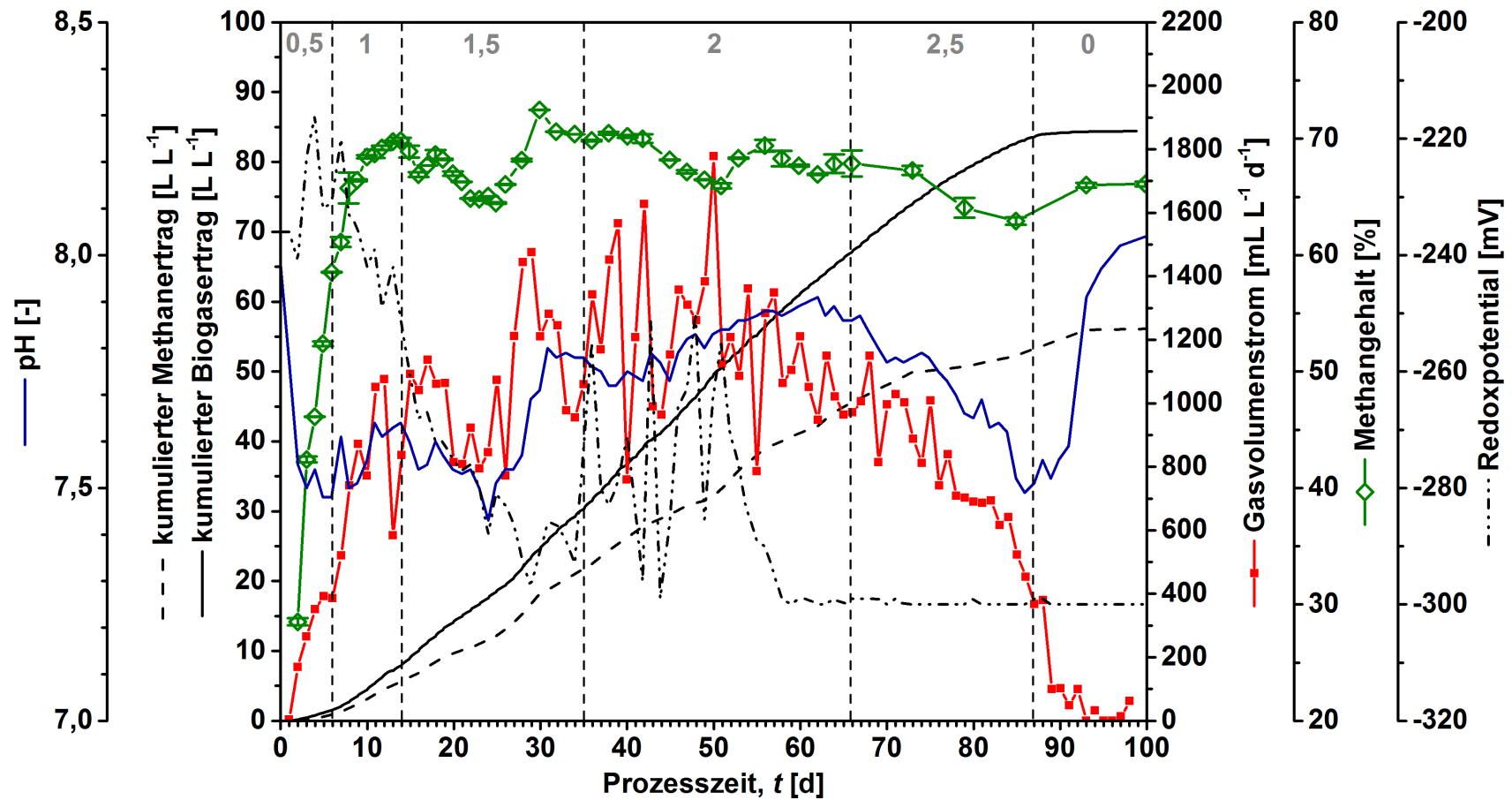


Abbildung 5.21: pH- und Redoxprofil, kumulierter Biogas- sowie Methanertrag, Methangehalt und Gasvolumenstrom bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse als Substrat über einen Zeitraum von 100 Tagen bei verschiedenen Faulraumbelastungen. Prozessparameter: Temperatur: 38 °C, Arbeitsvolumen: 1 L, Rührerdrehfrequenz: 100 min^{-1} . Die vertikalen, gestrichelten Linien zeigen die Änderung der Faulraumbelastung um jeweils 0,5 $g_{OTS} L^{-1} d^{-1}$ bzw. den Zufütterungsstopp (graue Zahlen). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar ($n=2$).

in der satzweisen Fermentation ermittelt wurden, sowie mit den theoretisch berechneten Methangehalten, welche in Tabelle 5.12 gezeigt sind, gut überein. Aufgrund von Problemen mit dem Gaschromatographen konnte die Gasanalyse zum Ende der Fermentation nur unregelmäßig erfolgen. Es wurde jedoch angenommen, dass größere Schwankungen in der Biogaszusammensetzung zwischen den einzelnen Messungen unwahrscheinlich waren.

In dem Plot in Abbildung 5.22 sind die volumenbezogene Produktivität und die spezifische Produktivität dargestellt. In beiden Fällen zeigte die Kurve bei einer Faulraumbelastung von $0,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ eine stetige Steigung. Ab einer Faulraumbelastung $> 0,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ unterlagen beide Kurven täglichen Schwankungen. Bezogen auf die Mittelwerte der volumenbezogenen Produktivität stieg diese mit zunehmender Faulraumbelastung zunächst an, zeigte jedoch nach ca. 55 Tagen bei einer Faulraumbelastung von $2 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ trotz anhaltender Substratzugabe einen Negativtrend. Die maximale durchschnittliche volumenbezogene Produktivität konnte bei einer Faulraumbelastung von $2 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erzielt werden und betrug $1213 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, wobei bereits zu erkennen war, dass diese an den letzten Tagen bei dieser Faulraumbelastung bereits geringer wurde. Obwohl die Kurve der spezifischen Produktivität einen ähnlichen Verlauf zeigt, war die höchste mittlere spezifische Produktivität von $970 \text{ mL g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bei einer Faulraumbelastung von $1 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ zu messen. Diese extrem hohen spezifischen Produktivitäten waren auf die Trägheit anaerober Prozesse zurückzuführen, da derartig hohe Gaserträge für solche Substrate lediglich theoretisch möglich sind. Laut Baserga (1998) können mit Lipiden als Monosubstrat theoretisch maximal $1250 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ Biogas erzielt werden (vgl. Tabelle 3.5). Nach Becker (2004) beträgt der Lipidanteil in *E. gracilis* jedoch nur 14 bis 20 %, was eine solch hohe spezifische Produktivität unwahrscheinlich erscheinen lässt. Daher war dieser hohe Wert auf nicht abgebautes Substrat vorheriger Tage zurückzuführen. Im weiteren Verlauf der Fermentation nahm die mittlere spezifische Produktivität stetig ab, was auf eine beginnende Prozessimbalance zurückzuführen war. Auch bei dieser Kurve war zum Ende der Faulraumbelastung von $2 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bereits ein Negativtrend zu beobachten.

Während des Prozesses wurden verschiedene flüchtige organische Säuren gebildet, deren Konzentrationen in einem stabilen Prozess, unabhängig der Faulraumbelastung, in etwa konstant sein sollte. Erst bei einer auftretenden Prozessimbalance dürfte die Bildungsgeschwindigkeit aufgrund einer beginnenden Inhibition der acetogenen Bakterien und methanogenen Archaeen größer sein, als die Verbrauchsgeschwindigkeit. Aufgrund des neutralen bzw. leicht basischen pH-Wertes lagen diese hauptsächlich in der deprotonierten Form vor, wobei inhibitorische Effekte vor allem von der protonierten Form ausgehen (Weiland, 2010). In einem stabilen Betrieb werden hauptsächlich Acetat, Propionat, Butyrat und Valerat gebildet, welche mit der gleichen Geschwindigkeit zu Methan umgewandelt

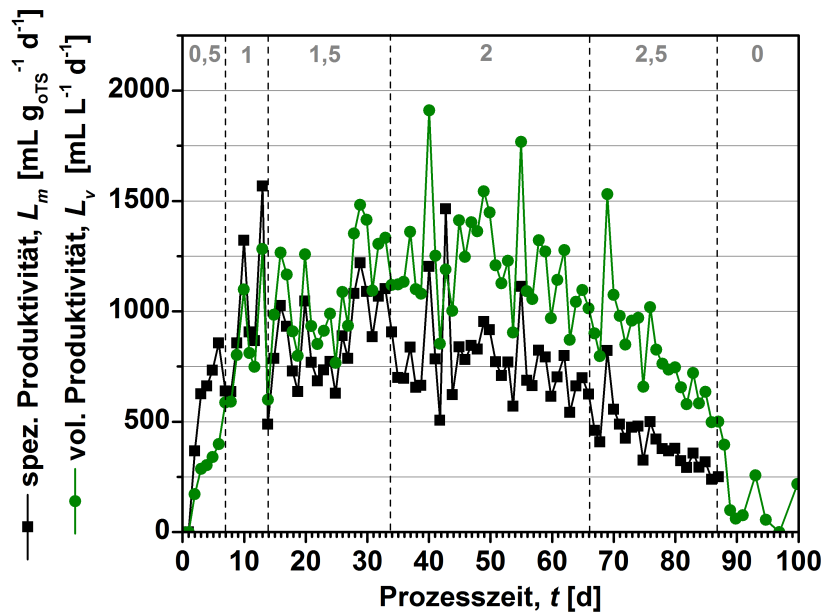


Abbildung 5.22: Volumenbezogene Produktivität (L_V) und spezifische Produktivität (L_m) bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse als Substrat über einen Zeitraum von 100 Tagen bei verschiedenen Faulraumbelastungen. Prozessparameter: Temperatur: 38 °C, Arbeitsvolumen: 1 L, Rührerdrehfrequenz: 100 min^{-1} . Die vertikalen, gestrichelten Linien zeigen die Änderung der Faulraumbelastung um jeweils 0,5 $\text{g}_{\text{oTS}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ bzw. den Zufütterungsstopp (graue Zahlen).

wie sie gebildet werden (Scholwin *et al.*, 2009). Je höher die Faulraumbelastung gewählt wurde, desto höher dürfte die Wahrscheinlichkeit eines Anstiegs der Konzentrationen gegeben sein. Auch das Verhältnis der einzelnen Säuren relativ zueinander kann sich verschieben. Das ermittelte Säurespektrum beinhaltet Acetat, Propionat, Isobutyrat, n-Butyrat, Isovalerat und n-Valerat. Die länger-kettigen Säuren Isocapronat, n-Capronat und Heptanoat wurden zwar ebenfalls gebildet und wurden bei den gaschromatographischen Messungen detektiert, jedoch waren deren Konzentrationen sehr gering und lagen zumeist unterhalb der Detektionsgrenze, so dass diese vernachlässigt wurden.

Abbildung 5.23 zeigt den Verlauf der Konzentration der flüchtigen organischen Säuren, welche als Essigsäureäquivalente bzw. als Gesamtsäurekonzentration dargestellt werden. In den ersten 20 Tagen der Fermentation war die Gesamtsäurekonzentration relativ konstant, wobei nur eine geringe Konzentration von ca. 0,3 g L^{-1} gemessen wurde. Die erste nennenswerte Erhöhung der Gesamtsäurekonzentration erfolgte vier Tage nach Erhöhung der Faulraumbelastung auf 1,5 $\text{g}_{\text{oTS}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$. Dabei konnte ein Anstieg mit einem temporären Maximum von 2,7 g L^{-1} am Tag 27 beobachtet werden. Trotz stetiger Zuführung von Substrat konnte sich das mikrobielle Konsortium auf diese Faulraumbelastung adaptieren, so dass die Gesamtsäurekonzentration bis zum Tag 34 wieder auf einen sehr niedrigen Wert von 0,3 g L^{-1} abnahm. Etwa zu diesem Zeitpunkt wurde die Faulraumbelastung auf 2 $\text{g}_{\text{oTS}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ erhöht. In den folgenden 29 Tagen der Fermentation konnte kein

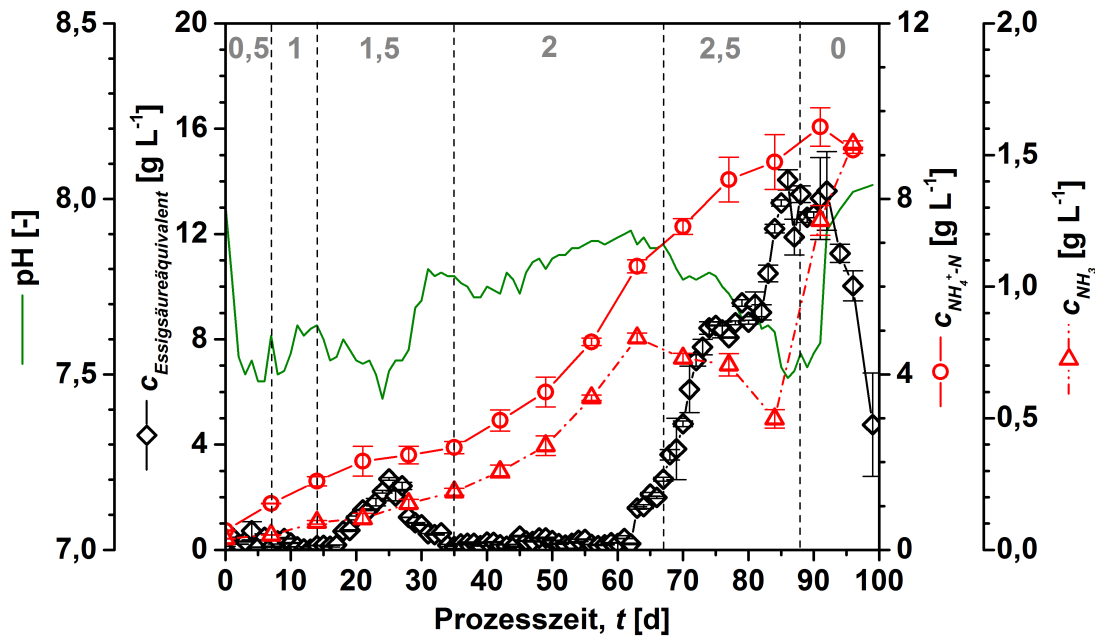


Abbildung 5.23: Verlauf der Konzentration der Essigsäureäquivalenz, der Ammoniumstickstoff- und der Ammoniakkonzentration bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse als Substrat über einen Zeitraum von 100 Tagen bei verschiedenen Faulraumbelastungen. Aufgrund des Einflusses des pH-Wertes auf die Ammoniakkonzentration ist der Verlauf des pH-Wertes ebenfalls dargestellt. Prozessparameter: Temperatur: 38 °C, Arbeitsvolumen: 1 L, Rührerdrehfrequenz: 100 min⁻¹. Die vertikalen, gestrichelten Linien zeigen die Änderung der Faulraumbelastung um jeweils 0,5 g_{oTS} L⁻¹d⁻¹ bzw. den Zufütterungsstopp (graue Zahlen).

nennenswerter Anstieg der Gesamtsäurekonzentration verzeichnet werden, was als weiteres Indiz für die Adaptation der Mikroorganismen anzusehen war. Erst nach diesem Zeitraum konnte ein stetiger Anstieg verzeichnet werden. Da bereits fünf Tage vor Erhöhung der Faulraumbelastung auf 2,5 g_{oTS} L⁻¹ d⁻¹ eine erhöhte Gesamtsäurekonzentration gemessen wurde, stieg die Konzentration nach erneuter Erhöhung der Faulraumbelastung weiter an und erreichte Werte bis 14 g L⁻¹. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass die flüchtigen organischen Säuren bereits sehr kritische Konzentrationen erreicht haben, obwohl die pH- und Redoxwerte keine Inhibition vermuten ließen.

Nach Braun (1982) deutet eine Gesamtsäurekonzentration < 1 g L⁻¹ auf einen stabilen Prozess hin, wohingegen von Bischofberger *et al.* (2005) eine maximale Gesamtsäurekonzentration von 4 g L⁻¹ beschrieben haben. Andere Autoren berichteten von einer beginnenden Inhibition ab einer Gesamtsäurekonzentration von > 3 g L⁻¹ (Ahring *et al.*, 1995). Demnach konnte ab einer Faulraumbelastung von > 2 g_{oTS} L⁻¹ d⁻¹ kein stabiler Prozess mehr beobachtet werden. In einem großtechnischen Prozess könnte diesem Anstieg durch einen temporären Zufütterungsstopp oder mittels Verringerung der Faulraumbelastung entgegengewirkt werden. Nach dem Zufütterungsstopp nach 88 Tagen wurde die Gesamtsäurekonzentration geringer, was darauf hindeutete, dass trotz der hohen Konzen-

tration nur eine geringe Inhibition der acetogenen Bakterien und methanogenen Archaeen durch zu hohe Säurekonzentrationen aufgetreten sind.

Die Gesamtammoniumstickstoffkonzentration und die Konzentration des inhibierenden, undissoziierten Ammoniaks sind ebenfalls in Abbildung 5.23 dargestellt. Aus dieser wird deutlich, dass während der gesamten Zeit der Substratzugabe ein stetiger Anstieg der Gesamtammoniumstickstoffkonzentration beobachtet werden konnte. Die maximale Konzentration wurde dabei kurz nach finaler Beendigung des Zulaufs mit einem Wert von $9,6 \text{ g L}^{-1}$ gemessen. Von McCarty & McKinney (1961b) wurde eine Inhibition ab einer Gesamtammoniumstickstoffkonzentration von 3 g L^{-1} beschrieben. Dieser Wert wurde in dem hier beschriebenen Prozess bereits nach 42 Tagen erreicht. Dass in diesem Prozess trotz dieser hohen Konzentrationen Aktivitäten der Methanogenen beobachtet wurde, hing vermutlich mit der hohen Adaptationsfähigkeit zusammen. Eine Aktivität der methanogenen Archaeen nach einer längeren Adaptationszeit bei hohen Gesamtammoniumstickstoffkonzentration von 6 g L^{-1} (Parkin & Miller, 1983) und $7,8 \text{ g L}^{-1}$ (De Baere *et al.*, 1984) wurde bereits beschrieben. Aufgrund des sinkenden pH-Wertes nahm die Ammoniakkonzentration im Vergleich zur Gesamtammoniumstickstoffkonzentration zum Ende des Prozesses jedoch weiter ab, weil der pH-Wert aufgrund der steigenden Säurekonzentration gleichzeitig geringer wurde und somit weniger des inhibitorischen Ammoniaks vorlag. Es wurde angenommen, dass der Prozess aufgrund hoher Gesamtammoniumstickstoffkonzentrationen bei einer Faulraumbelastung von $2 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ inhibiert wurde, was dazu führte, dass die flüchtigen organischen Säuren nur noch verlangsamt abgebaut wurden. Die plötzliche Erhöhung der Konzentrationen der flüchtigen organischen Säuren nach einer Prozesszeit von 63 Tagen ist vermutlich das Resultat einer Inhibition der Acetogenese und der acetoclastischen Methanogenese durch eine hohe Ammoniakkonzentration und nicht die Ursache der Inhibition selbst. Die Ammoniakkonzentration zum Zeitpunkt der Erhöhung der Konzentrationen der flüchtigen organischen Säuren betrug etwa 800 mg L^{-1} . Die von Angelidaki & Ahring (1994) beschriebene Ammoniakkonzentration von 700 mg L^{-1} , ab welcher eine Inhibition auftritt, wurde kurz zuvor erreicht.

Die Verläufe der Konzentrationen der flüchtigen organischen Säuren sind in den Abbildungen 5.24 (a–f) dargestellt. Daraus ist zu entnehmen, dass die temporäre Erhöhung der Konzentration der Essigsäureäquivalente, welche bei einer Faulraumbelastung von $1,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ aufgetreten ist, hauptsächlich auf die Bildung von Acetat und Propionat zurückzuführen war, da bei längererkettigen flüchtigen organischen Säuren, mit Ausnahme vom Tag 27, keine Erhöhung während dieses Zeitraums detektiert werden konnte. Es wurde beschrieben, dass ein vermehrtes Auftreten der längererkettigen flüchtigen organischen Säuren, vor allem der Isoformen von Butyrat und Valerat, eine Prozessimbalance anzeigt (Fischer *et al.*, 1983; Chen & Day, 1986; Hill & Bolte, 1989). Aufgrund des deutlichen

Anstiegs aller Säurespezies ab dem Tag 63, deutete auch dies darauf hin, dass ab diesem Zeitpunkt eine beginnende Prozessstörung aufgetreten war. Der von Hill & Holmberg (1988) beschriebene Konzentrationsbereich von Isobutyrat und Isovalerat von 0,06 bis 0,17 mM, welcher zwar noch einen stabilen Prozess erlaubt, jedoch schon eine Prozessimbalance anzeigt, wurde deutlich überschritten. Die maximale Isobutyratkonzentration betrug 17 mM und war somit 100 mal höher als die beschriebene, maximal zulässige Konzentration. Die höchste Isovaleratkonzentration war mit 35 mM etwa 600 mal höher. Die durchschnittliche Konzentration dieser Säuren betrug während der ersten 62 Tage 0,18 mM Isobutyrat und 0,5 mM Isovalerat, so dass die von Hill & Holmberg beschriebenen Konzentrationen in stabilen Prozessen mehr oder weniger realistisch erschienen. Die Erhöhung der Konzentrationen der länger-kettigen flüchtigen organischen Säuren ist ebenfalls eher als Folge der erhöhten Gesamtammoniumstickstoffkonzentration und weniger als Ursache für die Inhibition zu betrachten.

Als ein weiterer Indikator für eine Prozessstörung wurde das Verhältnis von Propionat zu Acetat herangezogen. Nach Hill (1982) ist eine Störung gegeben, wenn das Verhältnis $> 1,4:1$ beträgt. Weiland (2008) hat beschrieben, dass das Verhältnis von Propionat zu Acetat $> 1:1$ auf eine Prozessstörung hindeutet. Die Verhältnisse für den in diesem Abschnitt dargestellten Prozess sind in Abbildung 5.25 dargestellt. Zu Beginn der Fermentation war das Verhältnis sehr gering und nahm bei Erhöhung der Faulraumbelastung auf $1 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ deutlich zu. Bei der nächsten Erhöhung der Faulraumbelastung auf $1,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ stellte sich zunächst ein Gleichgewicht von etwa 0,2 zwischen den beiden Säuren ein. Erst ab dem Zeitpunkt, an dem beide Säuren eine Erhöhung der Konzentration zu verzeichnen hatten, nahm auch das Verhältnis zugunsten der Propionsäure zu und es wurde ein Maximum von 0,5 am Tag 29 erzielt. Daraufhin nahm das Verhältnis ab und es stellte sich erneut ein Gleichgewicht um 0,07 ein. Ab dem Zeitpunkt der erhöhten Akkumulation der Säuren, nahm auch das Propionat-zu-Acetat-Verhältnis zu. Nachdem am Tag 70 ein zweites Maximum von 0,42 erreicht wurde, nahm das Verhältnis daraufhin wieder ab. Zwar blieb das Propionat-zu-Acetat-Verhältnis während der gesamten Fermentationsdauer $< 0,5$, jedoch können ansteigende Werte als eine beginnende Prozessimbalance, wie von Hill (1982) und Weiland (2008) beschrieben, interpretiert werden.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass photoautotroph gewonnene *E. gracilis*-Biomasse ein potentiell Substrat für die Biogasgewinnung darstellt, bei dessen Einsatz etwa $660 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ Biogas mit einem Methananteil von ca. 68 % (v/v) gewonnen werden kann. Dies entspricht einem Methanertrag von etwa $450 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$. Bei einem Vergleich mit den in Tabelle 3.6 erzielten Biogaserträgen nach verschiedenen Autoren wird deutlich, dass, abgesehen von der einzelligen Grünalge *C. reinhardtii*, für sämtliche aufgeführten

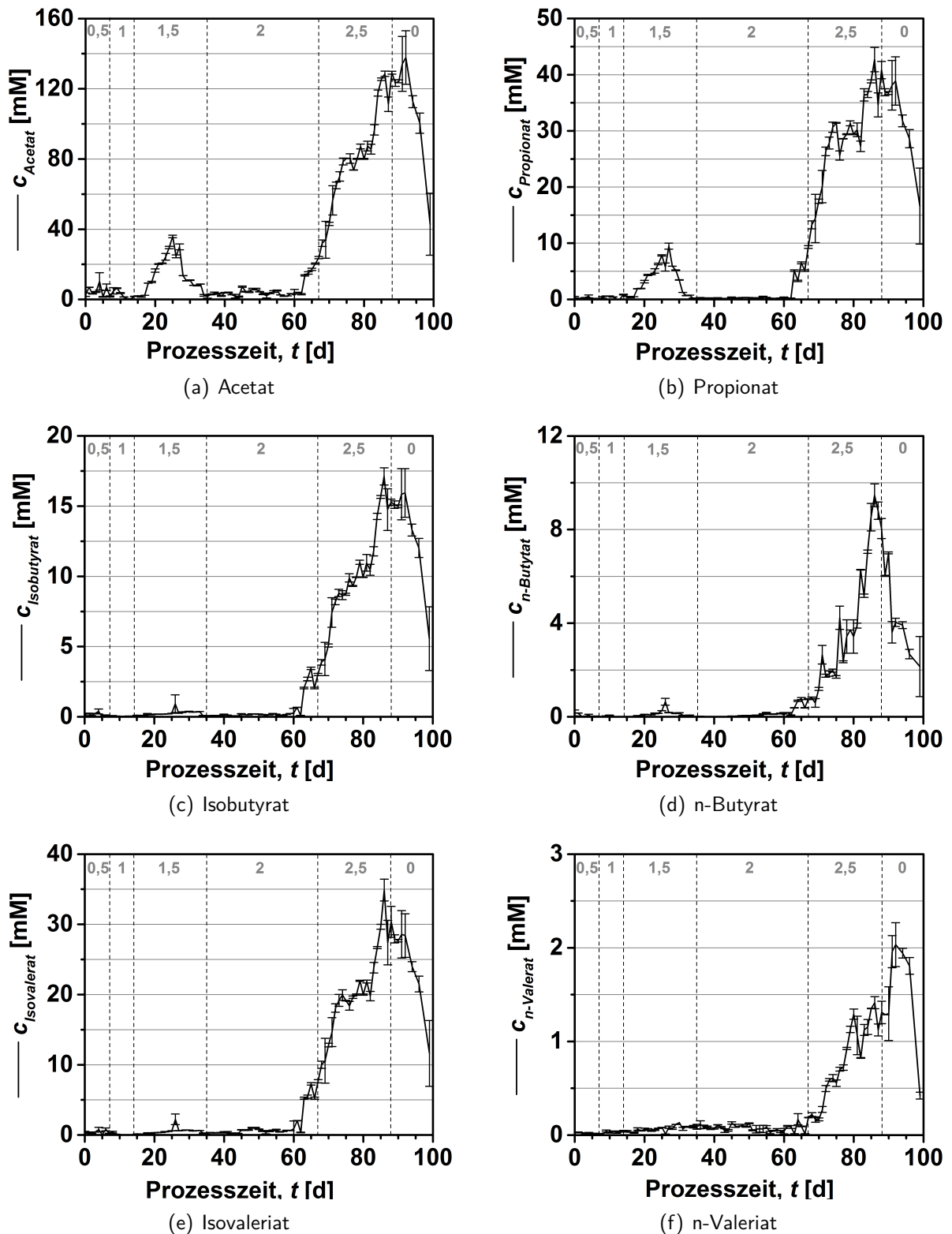


Abbildung 5.24: Verläufe der flüchtigen organischen Säuren Acetat (a), Propionat (b), Isobutytrat (c), n-Butytrat (d), Isovalerat (e) und n-Valerat (f) bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse als Substrat über einen Zeitraum von 100 Tagen bei verschiedenen Faulraumbelastungen. Prozessparameter: Temperatur: 38 °C, Arbeitsvolumen: 1 L, Rührerdrehfrequenz: 100 min⁻¹. Die vertikalen, gestrichelten Linien zeigen die Änderung der Faulraumbelastung um jeweils 0,5 g_{oTS} L⁻¹d⁻¹ bzw. den Zufütterungsstopp (graue Zahlen).

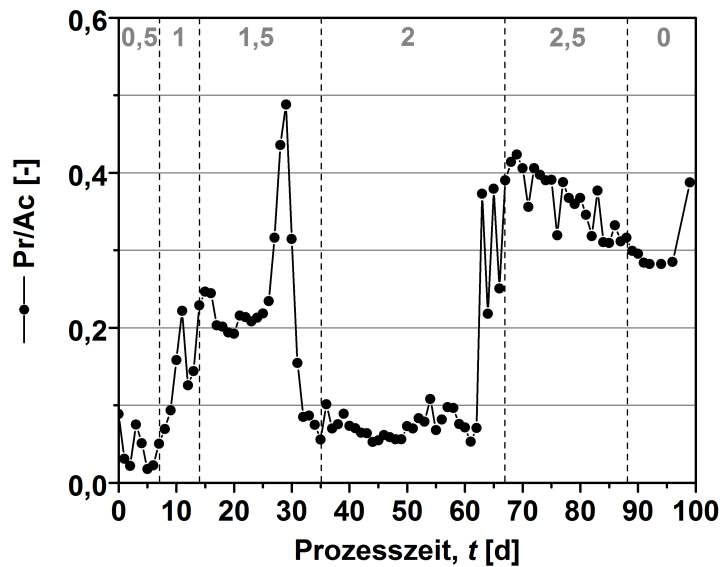


Abbildung 5.25: Verlauf des Propionat-zu-Acetat-Verhältnisses bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse als Substrat über einen Zeitraum von 100 Tagen bei verschiedenen Faulraumbelastungen. Prozessparameter: Temperatur: 38 °C, Arbeitsvolumen: 1 L, Rührerdrehfrequenz: 100 min⁻¹. Die vertikalen, gestrichelten Linien zeigen die Änderung der Faulraumbelastung um jeweils 0,5 g_{oTS} L⁻¹d⁻¹ bzw. den Zufütterungsstopp (graue Zahlen).

Mikroalgen geringere Biogaserträge erzielt worden sind. Der Biogasertrag beim Einsatz von *C. reinhardtii*, dessen Kultivierung zur Erhöhung des C/N-Verhältnisses unter Stickstoffmangel erfolgte, betrug 698 mL g_{oTS}⁻¹ (Klassen *et al.*, 2015), war jedoch lediglich um ca. 40 mL g_{oTS}⁻¹ höher.

Zwar sind Prozessimbalancen bei einer Faulraumbelastung von 2 g_{oTS} L⁻¹ d⁻¹ aufgetreten, was jedoch hauptsächlich aufgrund des geringen C/N-Verhältnisses und der daraus resultierenden hohen Ammoniakkonzentration im Zusammenhang mit der Verweilzeit resultierte. Anhand der Konzentrationen der flüchtigen organischen Säuren und der Ammoniakkonzentration konnten eine beginnende Prozessimbalance schnell erkannt werden. Der Verlauf des pH-Wertes und des Redoxpotentials hingegen ließen keine Prozessstörungen vermuten.

5.2.4.2 Kontinuierliche Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse nach α -Tocopherolextraktion im Rührkesselreaktor

Ziel & Hintergrund

Im Hinblick auf ein Bioaffineriekonzept wurde bei dieser Fermentation photoautotroph gewonnene *E. gracilis*-Biomasse als Monosubstrat eingesetzt, aus welcher zuvor das Produkt α -Tocopherol extrahiert wurde. Aufgrund der in Abschnitt 5.2.2 beschriebenen Problematik, dass die Effizienz der α -Tocopherolextraktion sinkt, wenn die Extraktion aus frischer Biomasse erfolgt, wurde die Biomasse vor der Extraktion lyophilisiert. Um vergleichbare

hydraulische Verweilzeiten wie in der in Abschnitt 5.2.4.1 beschriebenen Fermentation zu gewährleisten, wurde das Substrat ebenfalls mit einem organischen Trockensubstanzgehalt von ca. $100 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1}$ zugegeben. Dazu wurde die Biomasse vor jeder Zugabe in den Fermenter in autoklaviertem Klärschlammüberstand resuspendiert. Der Klärschlamm wurde zuvor mindestens zwei Wochen bei $38 \text{ }^\circ\text{C}$ ausfaulen gelassen, damit keine gelösten organischen Substanzen das Messergebnis verfälschen. Die Verwendung von Klärschlammüberstand anstelle von Wasser galt lediglich der Sicherstellung, dass im Laufe der Fermentation keine Salzdepletion auftrat.

Mit steigender Faulraumbelastung stieg auch das Volumen des Klärschlammes. Aufgrund der gleichbleibenden Biotrockenmassekonzentration des resuspendierten Substrates, resultierte dies in verschiedenen hydraulischen Verweilzeiten für jede Faulraumbelastung. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 3.10 verdeutlicht. Die durchschnittlich zugeführten Substratmengen in Bezug auf die organische Trockensubstanz, die Volumina des Klärschlammüberstands und die hydraulischen Verweilzeiten für jede Faulraumbelastung sind in Tabelle 5.14 dargestellt.

Die Biomasse für diesen Versuch stammte aus einer repetitiven Satzkultivierung, welche in Abschnitt 5.1.5 beschrieben wurde. Die α -Tocopherolkonzentrationen und -selektivitäten, welche bei dieser Kultivierung erzielt wurden, sind in Tabelle 5.8 dargestellt. Die Extraktion der bei diesem Versuch eingesetzten Biomasse erfolgte mit 500 mL Methanol *p.A.* auf 25 g photoautotroph gewonnene, lyophilisierte *E. gracilis*-Biomasse in einen 1 L Rundkolben gemäß Abschnitt 4.2.3. Insgesamt wurden drei Mal je 25 g Biomasse mit jeweils 500 mL Methanol *p.A.* extrahiert und das Retentat der drei Extraktionen vor Beginn der Fermentation vereint. Der Anteil an organischer Trockensubstanz betrug $90,4 \%$ (*w/w*).

Die Dauer dieses Biogasprozesses betrug insgesamt 60 Tage, wobei die Faulraumbelastung zu Beginn $0,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ betrug und stetig in $0,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ -Schritten erhöht wurde. Auch bei diesem Versuch wurde erwartet, dass Prozessimbilanzen aufgrund des geringen C/N-Verhältnisses von etwa 4,8 (vgl. Tabelle 5.12) bei einer Faulraumbelastung $\geq 2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ in Erscheinung treten.

Ergebnisse

Abbildung 5.26 zeigt den Verlauf des pH-Wertes und des Redoxpotentials über eine Prozessdauer von 60 Tagen. Aufgrund der in Abschnitt 5.2.4.1 beschriebenen Probleme erfolgte auch hier die Messung des pH-Wertes und des Redoxpotentials *offline* bei jeder Probenahme. Der pH-Wert des Klärschlammes vor der ersten Zufütterung betrug 7,7, nahm direkt nach der ersten Substratzugabe ab und wies nach einer siebentägigen Fermentation ein Minimum von 7,3 auf. Bis zum 35. Tag stieg der pH-Wert unter Vernachlässigung kleiner Schwankungen auf 7,5 an, woraufhin ein leichter Abfall auf 7,3 zu verzeichnen war.

Tabelle 5.14: Täglich zugeführte Substratmengen in Bezug auf die organische Trockensubstanz, die Volumina des Klärschlammüberstands und die hydraulischen Verweilzeiten ($\tau_{hyd.}$) bei den jeweiligen Faulraumbelastungen (FRB). Der Klärschlamm wurde für mindestens 14 Tage bei 38 °C ausfaulen gelassen.

FRB [g _{oTS} L ⁻¹ d ⁻¹]	Substrat- masse [g _{oTS}]	Klärschlamm- überstand [mL]	$\tau_{hyd.}$ [d]
0,5	0,5	5	200
1	1	10	100
1,5	1,5	15	75
2	2	20	50

Im weiteren Verlauf stieg der pH-Wert bis zum Ende der Substratzufuhr auf 7,5 an. Erst nach diesem Zeitpunkt konnte ein Anstieg auf 8,1 beobachtet werden. Das Redoxpotential zeigte während der Faulraumbelastung von 0,5 g_{oTS} L⁻¹ d⁻¹ Schwankungen zwischen -240 und -200 mV, war jedoch während einer Faulraumbelastung von 1 g_{oTS} L⁻¹ d⁻¹ mit ca. -205 mV nahezu konstant. Nach Erhöhung der Faulraumbelastung auf 1,5 g_{oTS} L⁻¹ d⁻¹ war daraufhin eine Abnahme zu verzeichnen. Die größte Änderung erfolgte während einer Faulraumbelastung von 2 g L⁻¹ d⁻¹, wobei ein Redoxpotential von -285 mV erreicht wurde. Der sprunghafte Anstieg des Redoxpotentials von -263 auf -237 mV, welcher nach einer Prozessdauer von etwa 37 Tagen aufgetreten ist, deutete bereits auf eine eventuell beginnende Prozessimbalance hin, da laut Rieger & Weiland (2006) sprunghafte Erhöhungen des Redoxpotentials um > 10 mV mögliche Prozessstörungen anzeigen können. Auch der pH-Wert zeigte zu diesem Zeitpunkt parallel einen Abfall von 7,5 auf 7,3, was als Indiz für eine Versauerung und somit ebenfalls als eine beginnende Prozessstörung aufgefasst werden konnte. Erst nach Beendigung des Zulaufs wurde das für methanogene Archaeen optimale Redoxpotential von -300 mV (Deublein & Steinhauser, 2008; Scholwin *et al.*, 2009) erreicht.

In Abbildung 5.26 ist zudem der kumulierte Biogasertrag und den Gasvolumenstrom dargestellt. Auch bei diesem Prozess war zunächst eine leichte Verzögerung in der Biogasbildung von mindestens drei Tagen zu verzeichnen. Nach einer kurzen exponentiellen Phase war der Anstieg daraufhin in etwa linear, wobei die täglichen Schwankungen aufgrund der nur einmal täglich erfolgten Zufütterung aus dieser Abbildung ersichtlich wurden. Der Anstieg nahm mit steigender Faulraumbelastung zu. Ab dem 35. Tag der Fermentation, etwa zu dem Zeitpunkt, an dem auch das Redoxpotential gestiegen und ein pH-Abfall zu verzeichnen war, war auch eine Abnahme des kumulierten Biogasertrags zu erkennen. Auch die Schwankungen in der Gasproduktion, welche aufgrund der nur einmal täglich erfolgten Zufütterung im 24-Stunden-Zyklus auftraten, waren ab diesem Zeitpunkt nicht mehr vorhanden. Dies ließ vermuten, dass der Abbau der flüchtigen organischen Säuren

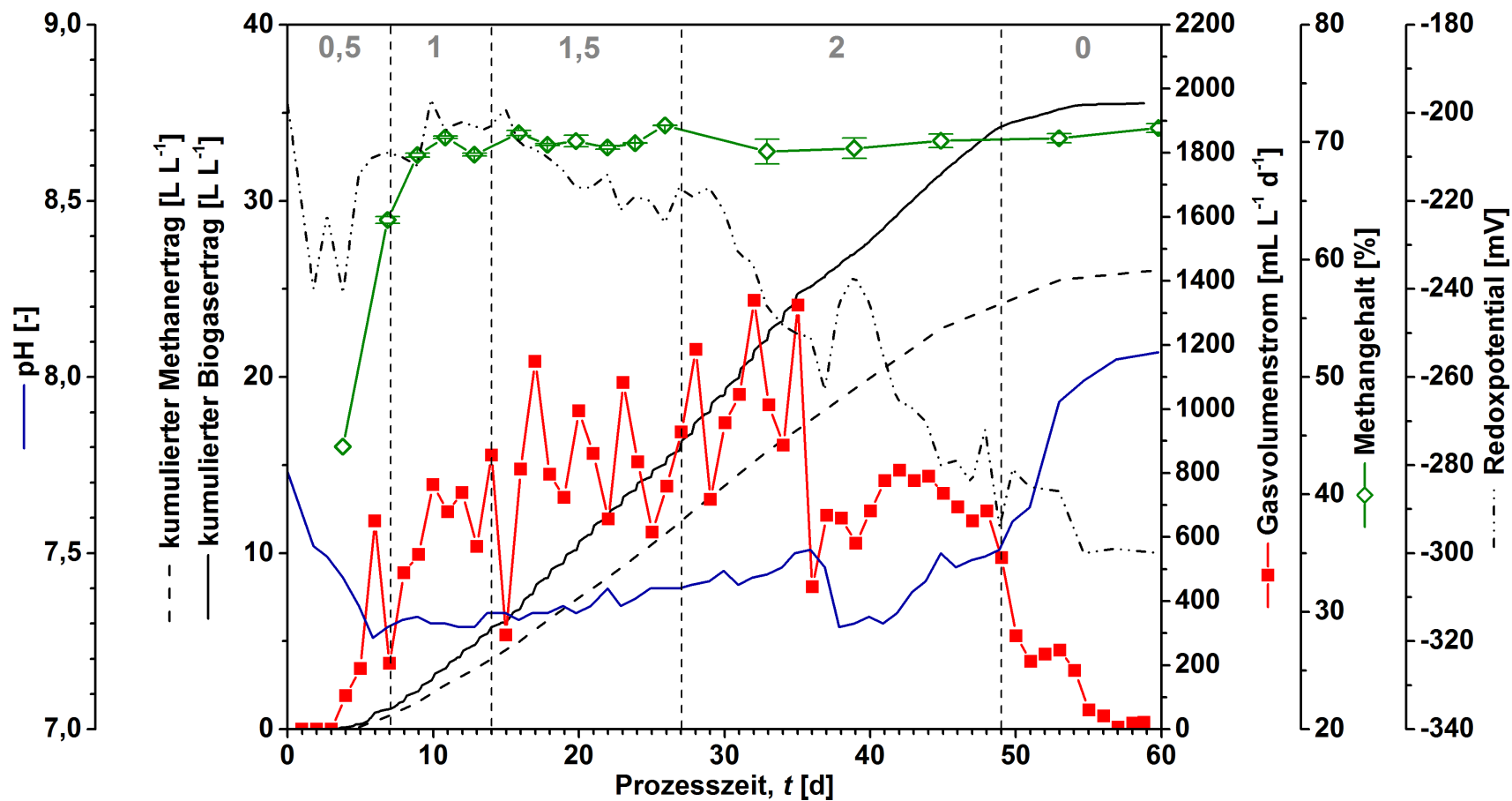


Abbildung 5.26: pH- und Redoxprofil, kumulierter Biogas- sowie Methanertrag, Methangehalt und Gasvolumenstrom bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnenem *E. gracilis*-Lyophilisat nach α -Tocopherolextraktion als Substrat über einen Zeitraum von 60 Tagen bei verschiedenen Faulraumbelastungen. Der Biomasse wurde zuvor das α -Tocopherol mittels Methanol *p. A.* extrahiert. Prozessparameter: Temperatur: 38 °C, Arbeitsvolumen: 1 L, Rührerdrehfrequenz: 100 min⁻¹. Die vertikalen, gestrichelten Linien zeigen die Änderung der Faulraumbelastung um jeweils 0,5 g_{oTS} L⁻¹d⁻¹ bzw. den Zufütterungsstopp (graue Zahlen). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar (n=2).

nicht mehr einwandfrei ablief. Nachdem die Zufütterung eingestellt worden ist, wurde jedoch noch restliches gelöstes und partikuläres Substrat verbraucht, so dass ein leichter Anstieg auch ohne Substratzugabe erfolgte.

Nachdem in den ersten drei Tagen zunächst gar kein Gasvolumenstrom gemessen wurde, war in den darauffolgenden vier Tagen ein stetiger Anstieg des Gasvolumenstroms zu verzeichnen. Diese *lag*-Phase ließ darauf schließen, dass die Bakterien noch nicht auf das Substrat adaptiert waren und dass das Substrat zum Teil noch hydrolysiert werden musste. Die Ergebnisse aus Abschnitt 5.2.1 haben jedoch gezeigt, dass die *lag*-Phase beim Einsatz von *E. gracilis*-Biomasse als Substrat für die Biogasproduktion sehr gering ist und dass bereits 24 Stunden nach Substratzugabe Biogas generiert wurde. Es wurde vermutet, dass auch im Rührkesselreaktor bereits 24 Stunden nach der ersten Substratzugabe Biogas gebildet wurde, aber aufgrund der Tatsache, dass sich im Fermenter erst etwas Druck aufgebaut werden musste, um die Sperrflüssigkeit aus der Gaseinlassseite des Milligascounters® zu drücken, erfolgte die quantitative Messung des gebildeten Biogases zeitlich etwas verzögert. Nach Erhöhung der Faulraumbelastung auf $1 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ waren tägliche Schwankungen aufgetreten, wobei jedoch ein Trend zu erkennen war. Mit jeder Erhöhung der Faulraumbelastung stieg auch der Gasvolumenstrom erwartungsgemäß, jedoch nur bis zum Tag 35. Zu diesem Zeitpunkt, neun Tage nach Erhöhung der Faulraumbelastung auf $2 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, sank der Gasvolumenstrom schlagartig von durchschnittlich $1036 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ für die ersten neun Tage auf durchschnittlich $728 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ für die letzten zwölf Tage bei dieser Faulraumbelastung, was ebenfalls als Indiz für eine beginnende Prozessstörung aufgefasst werden könnte.

Die gesamte bei diesem Versuch gebildete Gasmenge betrug $36,6 \text{ L}$ Biogas, wobei insgesamt $68,1 \text{ g}_{oTS}$ Substrat umgesetzt wurde. Dies entsprach einem Biogasertrag von $538 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$. Der erzielte Biogasertrag war in dieser kontinuierlichen Fermentation höher als bei der satzweisen Fermentation, welche in Abschnitt 5.2.2 erzielt wurde und $432 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ betrug. Da bei dem Versuch im Satzreaktor die Methanolreste mittels $dd\text{H}_2\text{O}$ entfernt wurden, bei diesem Versuch das restliche Methanol jedoch abdampfen gelassen wurde, wurde angenommen, dass zwar das Methanol vollständig abgedampft war, aber die sich im Methanol gelösten Substanzen teilweise wieder in die Biomasse zurückgeführt wurden. Diese Fraktion bewirkte eventuell einen höheren Biogasertrag oder ermöglichte eine bessere Adaptation der Mikroorganismen auf dieses Substrat. Auch die kontinuierliche Betriebsweise könnte eine höhere Adaptation bewirkt haben.

Der kumulierte Methanertrag ließ sich aus dem kumulierten Biogasertrag und aus dem Methangehalt berechnen. Beide Verläufe sind ebenfalls in Abbildung 5.26 gezeigt. Der Methangehalt war zu Beginn der Fermentation mit 44% (v/v) relativ gering, was, wie bereits in Abschnitt 5.2.4.1 beschrieben, auf die geringe anfängliche Aktivität der methanogenen

Bakterien zurückzuführen war. Ein Methangehalt von ca. 70 % (v/v) wurde jedoch schon nach elf Tagen bei einer Faulraumbelastung von $1 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erzielt. Daraufhin war der Methangehalt bis zum Ende der Kultivierung relativ konstant und lag bei durchschnittlich 70,3 % (v/v). Auch bei diesem Versuch konnten die Messungen aufgrund eines technischen Problems nicht täglich erfolgen, so dass eventuelle Schwankungen unentdeckt geblieben sein könnten. Ein vergleichbarer Methangehalt von 69,2 % (v/v) wurde auch bei der satzweisen Fermentation (vgl. Abschnitt 5.2.2) mit diesem Substrat erzielt.

Die Verläufe der volumenbezogenen Produktivität und der spezifischen Produktivität sind in Abbildung 5.27 gezeigt. In den ersten sieben Tagen der Fermentation konnte ein stetiger Anstieg beider Kurven beobachtet werden. Daraufhin unterlagen die Kurven unregelmäßigen Schwankungen. Auch bei einer Faulraumbelastung von $1 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ wurde eine stetige Erhöhung der Produktivitäten beobachtet. Bei einer Faulraumbelastung von $1,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ waren die Produktivitäten in etwa konstant und zeigte Mittelwerte von $613 \text{ mL g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bzw. $842 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Nachdem die Faulraumbelastung auf $1,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erhöht wurde, nahmen zunächst auch die Produktivitäten zu. Am Tag 37, an jenem Tag, an dem auch eine Verringerung des pH-Wertes und eine Erhöhung des Redoxpotentials verzeichnet wurde, nahmen auch die Produktivitäten ab. Während bei dieser Faulraumbelastung bis zu diesem Zeitpunkt eine mittlere spezifische Produktivität von $563 \text{ mL g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und einer volumenbezogenen Produktivität von $1042 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erzielt wurde, waren bis zum Ende der Substratzufuhr nur noch $392 \text{ mL g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bzw. $728 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ zu verzeichnen. Dies war als Beweis für eine Prozessimbalance anzusehen.

Auch für diese Fermentation wurde das Säurespektrum ermittelt und die Konzentration der Essigsäureäquivalente berechnet. Wie der Abbildung 5.28 zu entnehmen ist, lag die Gesamtsäurekonzentration bis zum Tag 37 bei einer sehr geringen Konzentration von durchschnittlich $0,04 \text{ g L}^{-1}$ und nahm erst bei einer Faulraumbelastung von $2 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ am Tag 38 zu. Ab diesem Zeitpunkt stieg die Konzentration stetig an und erreichte am letzten Tag des Zulaufs eine Konzentration von $3,8 \text{ g L}^{-1}$. Nachdem der Zulauf gestoppt wurde, nahm die Konzentration unmittelbar ab, was darauf hindeutete, dass es sich in diesem Fall noch nicht um eine starke Inhibition gehandelt haben konnte. In einem solchen Fall wäre der Abbau der flüchtigen organischen Säuren eher verlangsamt erfolgt. Der plötzliche Anstieg der Konzentration am Tag 38 hatte sich auch im pH-Wert bemerkbar gemacht. Auch das Redoxpotential war zu diesem Zeitpunkt gestiegen und die Produktivität gesunken. Elf Tage nach dem Ende des Zulaufs betrug die Konzentration $0,4 \text{ g L}^{-1}$.

Im Vergleich zu den Konzentrationen der Essigsäureäquivalente, welche bei der Fermentation mit photoautotroph gewonnener Biomasse ohne Produktextraktion erzielt wurden (vgl. Abbildung 5.23), war die Gesamtsäurekonzentration bei diesem Versuch zu jedem

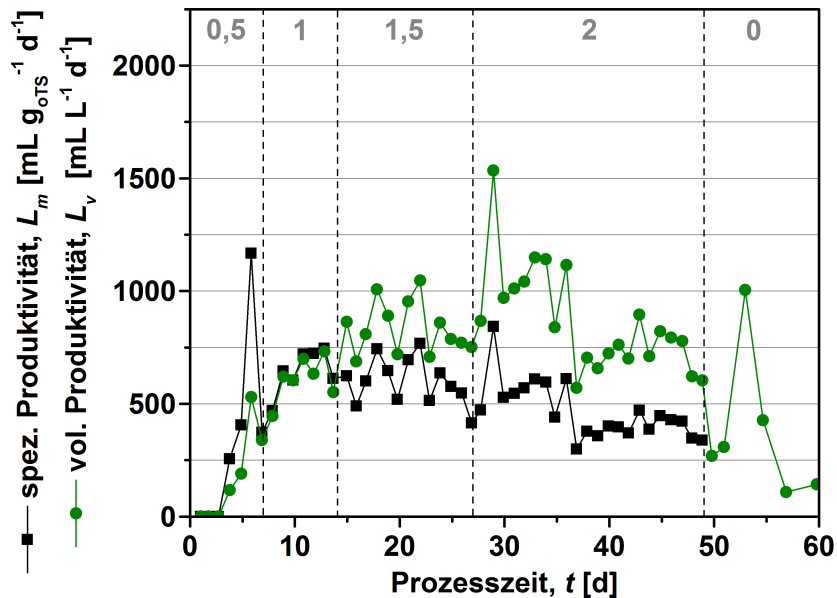


Abbildung 5.27: Volumenbezogene Produktivität (L_V) und spezifische Produktivität (L_m) bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnenem *E. gracilis*-Lyophilisat nach α -Tocopherolextraktion als Substrat über einen Zeitraum von 60 Tagen bei verschiedenen Faulraumbelastungen. Prozessparameter: Temperatur: 38 °C, Arbeitsvolumen: 1 L, Rührerdrehfrequenz: 100 min^{-1} . Die vertikalen, gestrichelten Linien zeigen die Änderung der Faulraumbelastung um jeweils 0,5 $\text{g}_{\text{oTS}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ bzw. den Zufütterungsstopp (graue Zahlen).

Zeitpunkt geringer. Während bei dem in Abschnitt 5.2.4.1 beschriebenen Prozess bis zum Anstieg der Gesamtsäurekonzentration am Tag 63, mit Ausnahme der kurzfristigen Erhöhung zwischen Tag 18 und Tag 34, durchschnittlich ca. $0,3 \text{ g L}^{-1}$ gemessen wurde, war die durchschnittliche Konzentration bei diesem Prozess bis zum Zeitpunkt der beginnenden Imbalance am Tag 37 um $0,26 \text{ g L}^{-1}$ geringer als beim Einsatz der unbehandelten Biomasse. Die maximale Konzentration von 14 g L^{-1} war beim Einsatz der Biomasse ohne Produktextraktion um etwa 10 g L^{-1} höher als beim Einsatz der extrahierten Biomasse. Der Grund, weshalb solch unterschiedliche Konzentrationen beim Einsatz eines vergleichbaren Substrats gemessen wurde, ließ sich anhand der Prozessdaten nicht ermitteln. Dies ist jedoch als Nachweis dafür anzusehen, dass bei jedem Prozess zum Teil sehr unterschiedliche Konzentrationen gemessen werden und dass keine optimalen bzw. maximal zulässigen Gesamtsäurekonzentrationen für anaerobe Prozesse angegeben werden können. Obwohl die Gesamtsäurekonzentrationen zwischen dem 38. und dem 47. Tag die von Bischofberger *et al.* (2005) und Ahring *et al.* (Ahring *et al.*, 1995) als inhibitorisch beschriebenen Konzentrationen von 4 g L^{-1} bzw. 3 g L^{-1} zu keinem Zeitpunkt überschritten wurden, wurde dennoch eine Prozessimbalance beobachtet, welche aufgrund des sinkenden pH-Werts und des steigenden Redoxpotentials ab dem Tag 38 vermutet und aufgrund der sinkenden Produktivität ab diesem Zeitpunkt bestätigt wurde.

In Abbildung 5.28 sind außerdem die Verläufe der Gesamtammoniumstickstoffkonzentration und der Konzentration des inhibierenden undissoziierten Ammoniaks sowie des pH-Werts dargestellt. Wie bei dem Prozess, in welchem die *E. gracilis*-Biomasse ohne Produktextraktion eingesetzt wurde, konnte während des gesamten Prozesses ein stetiger Anstieg der Gesamtammoniumstickstoffkonzentration beobachtet werden. Eine maximale Konzentration von $6,7 \text{ g L}^{-1}$ wurde dabei am letzten Tag der Substratzugabe gemessen. Zum Zeitpunkt der Erhöhung der flüchtigen organischen Säuren und des beobachteten Abfalls des pH-Wertes bei gleichzeitiger Zunahme des Redox-Potentials und der verminderten Produktivität betrug die Gesamtammoniumstickstoffkonzentration 2 g L^{-1} . Es wurde angenommen, dass ab diesem Zeitpunkt eine beginnende Inhibition der Biogasbildung durch eine zu hohe Gesamtammoniumstickstoff- bzw. Ammoniakkonzentration stattgefunden hatte und nicht durch zu hohe Konzentrationen an flüchtigen organischen Säuren, da diese bis zum Tag 38 nahezu unverändert blieben, die Gesamtammoniumstickstoffkonzentration jedoch einen stetigen Anstieg zu verzeichnen hatte.

Die von McCarty & McKinney (1961b) als inhibitorisch beschriebene Konzentration von 3 g L^{-1} wurde nach etwa 42 Tagen überschritten. Da bereits fünf Tage zuvor Prozessimbilanzen aufgrund anderer Parameter detektiert wurden, schien bei diesem Prozess eine geringere Gesamtammoniumstickstoffkonzentration als die von McCarty & McKinney (1961b) beschriebenen 3 g L^{-1} inhibierend zu sein. Nachdem der pH-Wert zum Zeitpunkt des Beginns der Inhibition am Tag 38 zunächst sank, nahm dieser daraufhin aufgrund der rasch ansteigenden Gesamtammoniumstickstoffkonzentration stetig zu, so dass vermehrt das inhibitorisch wirkende undissoziierte Ammoniak vorlag. Bei der Fermentation in Abschnitt 5.2.4.1 nahm der pH-Wert aufgrund des extremen Anstiegs der Konzentration der flüchtigen organischen Säuren auf 14 g L^{-1} ab, was einem Anstieg der Ammoniakkonzentration entgegenwirkte. Bei dem hier dargestellten Prozess hat die Zunahme des pH-Wertes eine Erhöhung der Ammoniakkonzentration und somit die inhibierende Wirkung verstärkt. Zum Ende der Fermentation wurde eine maximale Ammoniakkonzentration von 520 mg L^{-1} berechnet, welche unterhalb der von Angelidaki & Ahring (1994) als inhibierend beschriebenen Ammoniakkonzentration von 700 mg L^{-1} lag. Die Ammoniakkonzentration zum Zeitpunkt des raschen Anstiegs der Konzentration der Essigsäureäquivalente betrug lediglich 100 mg L^{-1} . Solch geringe Konzentrationen, welche eine Inhibition eines anaeroben Prozesses verursachen, wurden in der Literatur nicht beschrieben und konnten anhand der erhobenen Prozessdaten nicht erklärt werden.

Abbildungen 5.29 (a–f) zeigen die Verläufe der Konzentrationen der einzelnen flüchtigen organischen Säuren. Abgesehen von kurzen Erhöhungen der Konzentrationen, welche jeweils kurz nach Erhöhung der Faulraumbelastungen auftraten, blieben die Konzentrationen aller

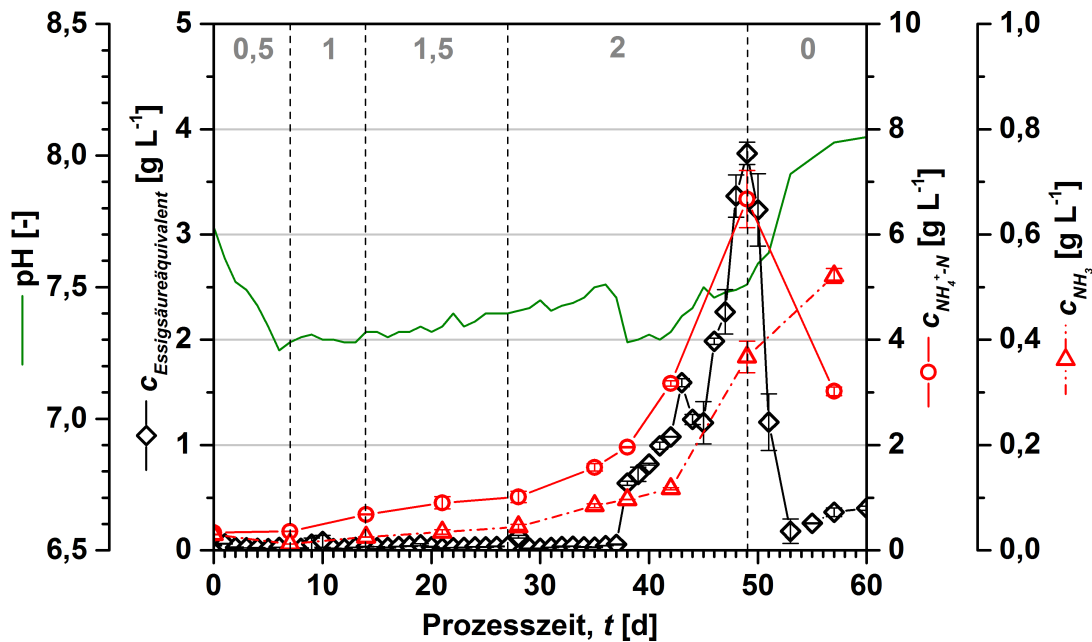


Abbildung 5.28: Verlauf der Konzentration der Essigsäureäquivalenz sowie der Ammoniumstickstoff- und der Ammoniakkonzentration bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnenem *E. gracilis*-Lyophilisat nach α -Tocopherolextraktion als Substrat über einen Zeitraum von 60 Tagen bei verschiedenen Faulraumbelastungen. Aufgrund des Einflusses des pH-Wertes auf die Ammoniakkonzentration ist der Verlauf des pH-Wertes ebenfalls dargestellt. Prozessparameter: Temperatur: 38 °C, Arbeitsvolumen: 1 L, Rührerdrehfrequenz: 100 min⁻¹. Die vertikalen, gestrichelten Linien zeigen die Änderung der Faulraumbelastung um jeweils 0,5 g_{oTS} L⁻¹d⁻¹ bzw. den Zufütterungsstopp (graue Zahlen).

flüchtigen organischen Säuren bis zum Tag 37 konstant auf einem sehr niedrigem Niveau. Erst ab einer Prozesszeit von 38 Tagen war eine Erhöhung der Konzentrationen bei allen flüchtigen organischen Säuren aufgetreten. Während die Konzentrationen von Isobutyrat, n-Butyrat, Isovalerat und n-Valerat erst einen Tag vor dem Zufütterungsstopp sehr hohe Werte erreicht haben, waren die Acetat- und vor allem die Propionatkonzentrationen bereits ab Tag 38 rasch angestiegen und waren hauptsächlich für die Erhöhung der Essigsäureäquivalentkonzentration verantwortlich.

In dem Zeitraum bis zum 38. Tag der Fermentation wurden jedoch eher geringe Konzentrationen der einzelnen flüchtigen organischen Säuren gemessen. Hill & Holmberg (1988) haben eine Konzentration von < 0,06 mM für Isobutyrat und Isovalerat als unkritisch beschrieben. Die durchschnittliche Isobutyrat- und Isovaleratkonzentration bis zum Tag 38 betragen lediglich 0,01 mM bzw. 0,04 mM und waren somit bis zu diesem Zeitpunkt unterhalb dieser Grenze. Als maximale Konzentration wurden hingegen 3,4 mM Isobutyrat und 6,9 mM Isovalerat am Tag 49 gemessen. Obwohl diese Maximalwerte weitaus geringer waren als jene, welche in dem Prozess ohne vorherige Produktextraktion gemessen wurden (vgl. Abschnitt 5.2.4.1 sowie Abbildungen 5.24 (a–f)) war der von Hill & Holmberg (1988) beschriebene Konzentrationsbereich weit überschritten. Auch für diesen Prozess wurde angenommen, dass die Erhöhung der Konzentration der länger-kettigen flüchtigen

organischen Säuren, vor allem die der Isoformen, die Folge der hohen Gesamtammoniumstickstoffkonzentration bzw. der Ammoniakkonzentration war und nicht die Ursache für die Inhibition darstellte.

Bei der Betrachtung des Propionat-zu-Acetat-Verhältnisses, dessen Verlauf in Abbildung 5.30 dargestellt ist, wird deutlich, dass kurz nach Beginn der Fermentation und nach Erhöhung der Faulraumbelastung auf $1 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und auf $1,5 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ jeweils eine leichte Erhöhung des Propionat-zu-Acetat-Verhältnisses aufgetreten ist. Kurze Zeit später fiel das Verhältnis jedoch wieder auf einen niedrigeren Wert zurück, wobei sich jeweils ein annähernd konstanter Wert eingestellt hat. Bei der Erhöhung der Faulraumbelastung auf $2 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ wurde bis zum Tag 37 zunächst ein geringer werdendes Propionat-zu-Acetat-Verhältnis beobachtet. Aufgrund des schnelleren Anstiegs der Propionatkonzentration im Vergleich zur Acetatkonzentration zu diesem Zeitpunkt erhöhte sich dieses Verhältnis und erreichte ein Maximum von 0,35 nach 41 Tagen. Die unterproportionale Erhöhung der Propionatkonzentration ließ sich auf eine Störung der Acetogenese zurückführen. Obwohl die Substratzugabe zu diesem Zeitpunkt noch erfolgte, stieg dieser Wert nicht weiter an und fiel zu Zeitpunkt des Zufütterungstopps auf 0,21 ab. Auch für diese Fermentation konnte ein rascher Anstieg des Propionat-zu-Acetat-Verhältnisses ab dem Tag 37 eine beginnende Prozessimbalance anzeigen. Die Abnahme des Verhältnisses zum Ende des Zulaufs hingegen ließ jedoch eher auf eine Erholung des Systems schließen, als auf eine anhaltende Imbalance. Auch diese Ergebnisse machen deutlich, dass keine definierten Maximalverhältnisse wie von Hill (1982) und Weiland (2008) beschrieben wurden, angegeben werden konnte, sondern lediglich der Anstieg selbst als Hinweis aufgefasst werden kann.

Somit ist schlusszufolgern, dass auch die photoautotroph gewonnene *E. gracilis*-Biomasse nach Extraktion des Produktes α -Tocopherol ein ergiebiges Substrat für die Gewinnung von Biogas darstellt. Beim Einsatz in einen kontinuierlichen Prozess konnten ca. $540 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ Biogas, welches einen Methananteil von etwa 69 % (v/v) aufwies, generiert werden. Der daraus errechnete Methanertrag beträgt etwa $375 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$. Auch für die extrahierte Biomasse konnte ein höherer Biogasertrag erzielt werden, als für die meisten in Tabelle 3.6 aufgeführten Mikroalgen. Als problematisch war jedoch das geringe C/N-Verhältnis von etwa 4,8 anzusehen.

Auch bei diesem Prozess Inhibitionen der Acetogenese und der Methanogenese aufgrund einer Ammoniakakkumulation bei einer Faulraumbelastung von $2 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ aufgetreten, was die Entstehung hoher Konzentrationen an flüchtigen organischen Säuren bewirkte. Im Gegensatz zu dem kontinuierlichen Prozess mit der unbehandelten Biomasse, konnte eine Prozessstörung bereits anhand des pH-Wertes und des Redoxpotentials bemerkt werden.

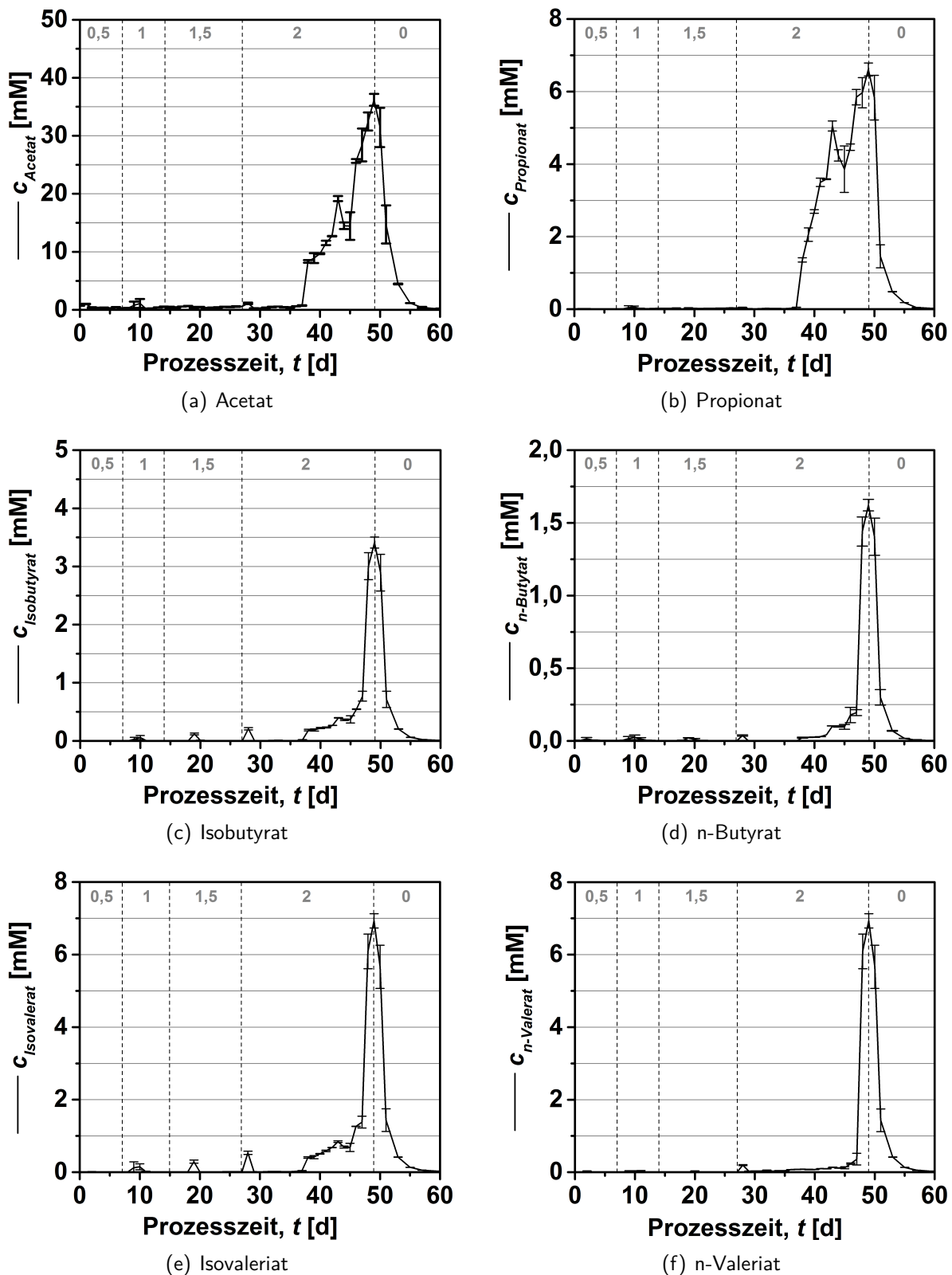


Abbildung 5.29: Verläufe von Acetat (a), Propionat (b), Isobutytrat (c), n-Butytrat (d), Isovalerat (e) und n-Valerat (f) bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnenem *E. gracilis*-Lyophilisat nach α -Tocopherolextraktion als Substrat über einen Zeitraum von 60 Tagen bei verschiedenen Faulraumbelastungen. Prozessparameter: Temperatur: 38 °C, Arbeitsvolumen: 1 L, Rührerdrehfrequenz: 100 min⁻¹. Die vertikalen, gestrichelten Linien zeigen die Änderung der Faulraumbelastung um jeweils 0,5 g_{O₂S} L⁻¹d⁻¹ bzw. den Zufütterungsstopp (graue Zahlen).

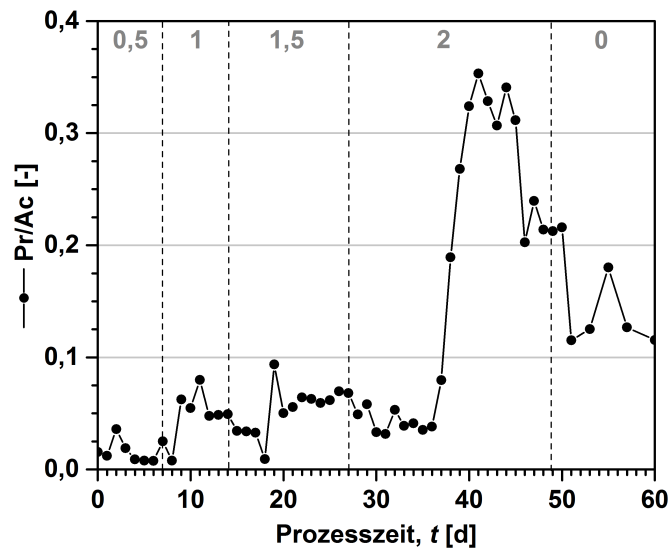


Abbildung 5.30: Verlauf des Propionat-zu-Acetat-Verhältnisses bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnenem *E. gracilis*-Lyophilisat nach α -Tocopherolextraktion als Substrat über einen Zeitraum von 60 Tagen bei verschiedenen Faulraumbelastungen. Prozessparameter: Temperatur: 38 °C, Arbeitsvolumen: 1 L, Rührerdrehfrequenz: 100 min⁻¹. Die vertikalen, gestrichelten Linien zeigen die Änderung der Faulraumbelastung um jeweils 0,5 g_{oTS} L⁻¹d⁻¹ bzw. den Zufütterungsstopp (graue Zahlen).

5.2.4.3 Kurzzusammenfassung & Fazit

Diese kontinuierlichen Fermentationen konnten zeigen, dass eine Monovergärung mit photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden kann und dass hohe Gaserträge von durchschnittlich 660 mL g_{oTS}⁻¹ mit einem hohem Methangehalt von durchschnittlich 67,8 % (v/v) erzielt werden können. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass photoautotroph gewonnene *E. gracilis*-Biomasse auch nach Extraktion des Produktes als Substrat für die Biogasgewinnung eingesetzt und somit im Sinne einer Wertschöpfungskette in einem Bioraffineriekonzept integriert werden kann. Im Vergleich zur unbehandelten Biomasse war jedoch eine um etwa 125 mL g_{oTS}⁻¹ geringere Gasausbeute zu verzeichnen, was jedoch nach der Extraktion der meisten lipophilen Substanzen erwartet wurde. Der Methangehalt war mit 70,3 % (v/v) etwas höher als beim Einsatz von unbehandelter Biomasse. Diese leichte Erhöhung des Methangehaltes und ein geringerer Biogasertrag wurde auch in den satzweisen Prozessen für photoautotroph gewonnene, lyophilisierte und extrahierte Biomasse beobachtet (vgl. Tabelle 5.10). Die Lipide im Extrakt, welche zusammen mit α -Tocopherol aufgrund ihrer apolaren Eigenschaften extrahiert wurden und somit einen verminderten Biogasertrag bewirkten, könnten jedoch zusätzlich zur Gewinnung von Bioenergie in Form von Biodiesel oder als Ausgangsstoff für weitere Produkte verwendet werden (Chisti, 2007; Campbell, 2008; Scott *et al.*, 2010; Schwarzthans *et al.*, 2014).

Da die Produktivitäten am Ende der Faulraumbelastung von 2 g_{oTS} L⁻¹ d⁻¹ bereits geringer wurden und etwa zur selben Zeit die Konzentration der länger-kettigen flüch-

tigen organischen Säuren und die Ammoniumstickstoff- bzw. Ammoniakkonzentration extrem angestiegen sind, kann davon ausgegangen werden, dass ab diesem Zeitpunkt bei beiden Prozessen beginnende Prozessimbilanzen auftraten. Es wurde beschrieben, dass Prozesse mit hohen Ammoniak- bzw. Ammoniumkonzentrationen oft stabil erhöhte Säurekonzentrationen aufweisen (Scholwin *et al.*, 2009). Außerdem kann es vorkommen, dass das Zusammenspiel zwischen der Ammoniak- bzw. Ammoniumkonzentration, der Konzentrationen an flüchtigen organischen Säuren und dem pH-Wert zu einem „inhibierten Gleichgewichtszustand“ führen kann, welcher zwar stabil abläuft, aber eine verminderte Gasproduktion aufweist (Angelidaki *et al.*, 1993; Angelidaki & Ahring, 1993; Chen *et al.*, 2008). Es wurde vermutet, dass der Prozess zunächst trotz hoher Inhibitorkonzentrationen stabil mit einer hohen Gasproduktion ablief, welche jedoch zum Ende hin vermindert wurde. Aufgrund des stetigen, aber langsamen Anstiegs der Ammoniakkonzentration und des plötzlichen Anstiegs der Konzentrationen der flüchtigen organischen Säuren, wurde vermutet, dass die Ammoniakkonzentration einen kritischen Wert erreicht hatte, woraufhin der Abbau der flüchtigen organischen Säuren inhibiert wurde. Daher war die inhibitorische Wirkung des Ammoniaks als Ursache für die Prozessimbalance anzusehen.

Obwohl bei beiden Prozessen bereits ab einer Faulraumbelastung von $2 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Prozessimbilanzen aufgetreten sind, bedeutet dies jedoch nicht, dass eine langfristige Beschickung eines Biogasreaktors mit photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse, mit oder ohne Produktextraktion, bei dieser Faulraumbelastung nicht möglich ist, da ein kurzfristiges Verringern der Faulraumbelastung eine Adaptation der an diesem Prozess beteiligten Bakterien und Archaeen erlauben müsste. Als einziges Problem sei hier auf die geringen C/N-Verhältnisse von ca. 6,3 für die unbehandelte Biomasse bzw. ca. 4,8 für die extrahierte Biomasse verwiesen (vgl. Tabelle 5.12), was jedoch durch eine Cofermentation mit einem Substrat, welches ein sehr hohes C/N-Verhältnis aufweist, behoben werden könnte. Als eine Möglichkeit wäre eine Cofermentation mit kohlenstoffreichem Substrat wie z. B. Papierabfällen anzusehen (Yen & Brune, 2007). Eine andere Möglichkeit wäre der Einsatz eines Mangelmediums bei der Kultivierung der *E. gracilis*-Biomasse, welches nur eine geringe Konzentration einer Stickstoffquelle aufweist. Dies würde aufgrund der geringeren Stickstoffkonzentration zu einer verminderten Proteinsynthese führen, was sich positiv auf das C/N-Verhältnis auswirken würde (Turpin, 1991; Klassen *et al.*, 2015). Eine weitere Alternative zur Verminderung der Anreicherung von Ammoniak und flüchtigen organischen Säuren wäre eine Verringerung der hydraulischen Verweilzeit, da diese inhibitorischen Substanzen somit schneller aus dem System gespült würden. Letzteres hätte jedoch den Nachteil, dass sowohl ungenutztes Substrat als auch die ohnehin schon langsam wachsenden Archaeen und acetogenen Bakterien ausgespült würden, was die Leistung des Reaktors vermindern würde. Auch ein Spurenelementmangel wurde aufgrund der in Abschnitt 5.2.3

beschriebenen Spurenelementkonzentration des Substrats nicht ausgeschlossen. Aufgrund der für anaerobe Prozesse vergleichsweise kurze Fermentationsdauer dieser Versuche war eine Prozessimbalance aufgrund eines Spurenelementmangels jedoch eher unwahrscheinlich.

Beide kontinuierlichen Fermentationen konnten zeigen, dass der pH-Wert und das Redoxpotential als Indikatoren für eine Prozessimbalance nicht ausgereicht hätten und dass sich die Stabilität von Biogasprozessen über die Gesamtammoniumstickstoff- bzw. Ammoniakkonzentrationen, die Konzentrationen der flüchtigen organischen Säuren als Summenparameter sowie die der Isoformen von Butyrat und Valerat sowie über das Verhältnis von Propionsäure zu Essigsäure weitaus besser verfolgen lassen. Dies wurde auch in anderen Studien beschrieben (Hill, 1982; Chen & Day, 1986; Hill *et al.*, 1987; Hill & Bolte, 1989; Ahring *et al.*, 1995; Weiland, 2008; Scholwin *et al.*, 2009; Weiland, 2010).

Für diese Prozesse wären auch die Wasserstoff- und die Schwefelwasserstoffkonzentrationen im Biogas interessant gewesen, jedoch konnten diese auf den Prozess inhibitorisch wirkenden Gase mit der zur Verfügung stehenden technischen Ausstattung nicht gemessen werden. Zwar war die Micro-GC-Anlage laut Hersteller auch für die Messung dieser Substanzen ausgelegt, jedoch konnten selbst bei Applikation des Kalibriergases, welches 0,2 % (*v/v*) Wasserstoff und 0,1 % (*v/v*) Schwefelwasserstoff aufwies, kaum auswertbare *Peaks* generiert werden. Dies könnte einerseits darauf hinweisen, dass diese inhibierenden Substanzen bei den beschriebenen Prozessen nur in geringen Konzentrationen im Biogas vorhanden waren. Andererseits hätten beim Auftreten der Imbalancen höhere Wasserstoffpartialdrücke gemessen werden und aufgrund des hohen Proteinanteils im Substrat höhere Schwefelwasserstoffkonzentrationen auftreten müssen.

Laut Weiland (2010) beträgt der Biogasertrag beim Einsatz von Maissilage 560 bis 650 mL g_{oTS}^{-1} . Von Amon *et al.* (2007) wurde ein Methanertrag 268 bis 365 mL g_{oTS}^{-1} , Abhängigkeit vom Reifezustand der Pflanzen zum Zeitpunkt der Ernte beschrieben. Im Vergleich zu Maissilage stellt photoautotroph gewonnene *E. gracilis*-Biomasse daher auch nach der Extraktion des Produktes α -Tocopherol ein ergiebigeres Substrat für die Biogasgewinnung dar. Die in Abschnitt 3.5 beschriebenen Vorteile bezüglich der Nutzung von Mikroalgen gegenüber Landpflanzen sind weitere Beispiele für die Relevanz von Mikroalgenbiomasse als Rohstoff für die Bioenergiegewinnung. Im Hinblick auf die erhobenen Daten und jenen aus Tabelle 3.6 wird deutlich, dass *E. gracilis*-Biomasse im Vergleich zu anderen Mikroalgen sehr gute Eigenschaften als Substrat für die Biogasgewinnung aufweist.

6 Zusammenfassung

Bioraffineriekonzepte fußen auf der stufenweisen Nutzung biogener Rohstoffe für die Gewinnung von Nahrungs- und Futtermittelzusätzen, Grund- und Feinchemikalien sowie Biokraftstoffen. Die Nutzung der Restbiomasse als Basis für Biokraftstoffe kann z. B. bei der Gewinnung von Hochwertprodukten die Wirtschaftlichkeit eines Prozesses erhöhen. In dieser Arbeit wurden potentielle Bioraffineriekonzepte mit dem photosynthetisch aktiven Protisten *Euglena gracilis* Z untersucht. Als Hochwertprodukte wurde das β -1,3-Glucan Paramylon und das Vitamin-E Isomer α -Tocopherol gewählt, weil der Organismus in der Literatur als ein besonders guter Kandidat für die Gewinnung dieser Produkte beschrieben wurde. Des Weiteren wurde untersucht, inwiefern sich die Biomasse dieses Einzellers als Substrat für die Biogasgewinnung eignet.

Zunächst wurde der Organismus bei verschiedenen Kultivierungsmodi kultiviert und die Biotrockenmassekonzentrationen und die Konzentrationen der Hochwertprodukte ermittelt. Erfolgte die Kultivierung heterotroph im Satzverfahren, konnten in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer relativ hohe Biotrockenmassekonzentrationen von bis zu $12,3 \text{ g L}^{-1}$ erzielt werden, welche Paramylonanteile von maximal 80 % (w/w) aufwiesen. Die α -Tocopherolkonzentration betrug maximal $5,3 \text{ mg L}^{-1}$. Die volumetrischen Produktivitäten waren aufgrund des satzweisen Verfahrens mit $2,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Biotrockenmasse, $1,3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Paramylon und $0,56 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ α -Tocopherol jedoch gering. Um die Produktivitäten zu steigern, wurde ein quasikontinuierlicher Prozess im Rührkesselreaktor etabliert, wodurch die Produktivitäten bei einer Raumgeschwindigkeit von 1 d^{-1} auf $5,6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Biotrockenmasse und $4,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Paramylon erhöht werden konnten. Die höchste α -Tocopherolproduktivität von $0,82 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ konnte bei einer Raumgeschwindigkeit von $0,6 \text{ d}^{-1}$ erzielt werden. Die α -Tocopherolkonzentration ließ sich durch eine quasikontinuierliche, sequenziell heterotrophe und photoheterotrophe Betriebsweise steigern. In einem 43-tägigen Prozess konnte die Produktivität bezüglich α -Tocopherol nach einer Verweilzeit von acht Tagen unter Illumination und einer Raumgeschwindigkeit von $0,5 \text{ d}^{-1}$ auf $1,82 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erhöht werden.

Erfolgte die Kultivierung photoautotroph im Satzverfahren, war zwar die α -Tocopherolkonzentration mit $8,6 \text{ mg L}^{-1}$ höher als bei (photo-)heterotropher Kultivierung, die Bio-

trockenmasse- und die Paramylontrockenmassekonzentration waren hingegen mit $3,6 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $0,78 \text{ g L}^{-1}$ verhältnismäßig gering.

Der Einsatz der Biomassen als Substrat für die Biogasgewinnung in satzweisen Prozessen konnte zeigen, dass die verschiedenen Kultivierungsmodi auch einen Einfluss auf den Biogasertrag und die Gaszusammensetzung aufwiesen. Während mit heterotroph gewonnener Biomasse bis zu $805 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ Biogas mit einem Methangehalt von $60,6 \%$ (v/v) erzielt werden konnten, betrug der Biogasertrag mit photoautotroph gewonnener Biomasse maximal $648 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ mit einem Methangehalt $66,8 \%$ (v/v). Außerdem wurde gezeigt, dass auch das Alter der Kultur einen Einfluss auf den Biogasertrag zeigte. Im Sinne eines Bioraffineriekonzeptes wurde zudem der Biogasertrag aus der Restbiomasse nach Extraktion des α -Tocopherols in Satzverfahren ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass der Biogasertrag von lyophilisierter, extrahierter Biomasse um 23 bis 29% geringer war als beim Einsatz von frischer Biomasse. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das Methanol, welches zur Extraktion des α -Tocopherols eingesetzt wurde, nicht vollständig aus dem Retentat entfernt werden muss, da dies den Mikroorganismen als zusätzliches Substrat in der Methanogenese dienen kann.

In kontinuierlichen, anaeroben Prozessen wurden die Faulraumbelastungen ermittelt, welche stabile Prozesse ermöglichten. Beim Einsatz von frischer, photoautotroph gewonnener Biomasse konnten durchschnittlich $660 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ mit einem Methangehalt von 68% (v/v) gewonnen werden. In einem Prozess mit photoautotroph gewonnener *E. gracilis*-Biomasse nach Extraktion des Produktes α -Tocopherol konnten pro Gramm Substrat $538 \text{ mL g}_{oTS}^{-1}$ Biogas mit einem Methangehalt von 70% (v/v) erzielt werden. Somit stellt selbst die extrahierte Biomasse ein ergiebigeres Substrat als Maissilage dar. Bei beiden Prozessen wurde jedoch ab einer Faulraumbelastung von ca. $2 \text{ g}_{oTS} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ eine Prozessimbalance durch hohe Ammoniakkonzentrationen beobachtet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen zwei vielversprechende, aber grundsätzlich verschiedene Bioraffineriekonzepte in Aussicht: Eine Möglichkeit beschreibt die simultane Gewinnung der Hochwertprodukte Paramylon und α -Tocopherol, wohingegen das andere Bioraffineriekonzept die Gewinnung von α -Tocopherol und die anschließende Nutzung der Restbiomasse als Substrat für die Biogasproduktion darstellt. Für das erste Bioraffineriekonzept sollte die Biomasse kontinuierlich sequentiell heterotroph und photoheterotroph gewonnen werden, da bei dieser Betriebsweise die Produktivitäten in Bezug auf beide Hochwertprodukte am höchsten war. Stellt Biogas neben α -Tocopherol eines der Produkte dar, müsste die Biomasse photoautotroph gewonnen werden, da der Einsatz einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle ökonomisch nicht gerechtfertigt wäre. Die photoautotrophe Gewinnung beider Hochwertprodukte und die energetische Nutzung der Restbiomasse hingegen war aufgrund der angewendeten Methode zur Aufreinigung des Paramylons problematisch.

7 Ausblick

Im Hinblick auf die simultane Gewinnung von Paramylon und α -Tocopherol bietet die quasikontinuierliche, sequenziell heterotrophe und photoheterotrophe Betriebsweise viele Vorteile. Bezüglich der technischen Realisierbarkeit war es jedoch im Bioreaktormaßstab nicht möglich, optimierte Leuchtmittel, wie die unter Schüttelkolbenbedingungen verwendeten LEDs, einzusetzen. Auch die Schichtdicke war im Gegensatz zu denen im Schüttelkolben größer. Für eine weitere Optimierung müssten die Reaktoren der photoheterotrophe Stufe mit adäquaten Leuchtmitteln versehen werden und die Dimension im Hinblick auf eine geringere Schichtdicke verändert werden. Des Weiteren sollten unterschiedliche Raumgeschwindigkeiten appliziert werden, um herauszufinden, welche eine optimale Produktivität gewährleisten kann. Zudem sollte der Durchlauf durch die zweite Stufe kontinuierlich erfolgen. Auch die Verwendung anderer Kohlenstoffquellen, wie z. B. Ethanol, könnte untersucht werden, da in der Literatur beschrieben wurde, dass dadurch höhere α -Tocopherolselektivitäten erzielt werden können.

Bezüglich der photoautotrophen Gewinnung von α -Tocopherol und der Nutzung der Restbiomasse für die Biogasgewinnung sind einige Optimierungen für die Gewinnung der Biomasse denkbar. Die in dieser Arbeit dargestellten Kultivierungen fanden in verbesserungswürdigen Photobioreaktoren statt, wobei der Fokus nicht auf eine optimale Produktivität gelegt wurde. Vor allem für ein Bioraffineriekonzept wäre von Interesse, dass die Kultivierung im Freiland unter der Nutzung von Sonnenlicht stattfinden würde und eventuell CO_2 aus Rauchgas als Kohlenstoffquelle eingesetzt werden könnte. Letzteres wäre jedoch ohne eine entsprechende Infrastruktur schwer zu bewerkstelligen. Zudem könnte die Gewinnung zur Erhöhung der Produktivität kontinuierlich erfolgen oder die repetitive Satzkultivierung optimiert werden.

Als weitere Optimierungsmöglichkeit könnte die Produktextraktion bzw. die Aufreinigung angesehen werden. In Bezug auf die Extraktion des α -Tocopherols stellt die Extraktion mit überkritischem CO_2 eine aussichtsreiche Methode dar, welche untersucht werden sollte. Dabei könnte auch untersucht werden, ob die Biomasse dafür frisch eingesetzt werden kann oder ob ein Trocknungsschritt für eine hohe Extraktionseffizienz obligat wäre. Die Paramylonaufreinigung könnte insoweit optimiert werden, dass eventuell geringere Konzentrationen an Harnstoff und Proteasen zu dem gleichen Ergebnis führen könnten. Es wäre

auch zu überlegen, ob die verbleibende Restbiomasse dabei als Medienbestandteile für die Kultivierung von *E. gracilis* im Sinne eines Stoffkreislaufs zurückgeführt werden könnte.

Im Hinblick auf die kontinuierlichen Biogasfermentationen wäre interessant, ob eine langsamere Erhöhung der Faulraumbelastungen zu einer erhöhten Adaptation der beteiligten Mikroorganismen führen würde. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine Cofermentation mit kohlenstoffreichem Substrat einen stabileren Prozess mit höheren Faulraumbelastungen ermöglichen könnte. Weiterhin wäre interessant, ob die Verwendung eines Stickstoffmangelmediums bei der Kultivierung der Biomasse zu höheren C/N-Verhältnissen führt. Auch eine Immobilisierung der Bakterien und Archaeen an Schüttgut und die Verwendung von Wirbelschicht- oder Festbettreaktoren könnte die Stabilität der Prozesse erhöhen. Dies würde dazu führen, dass kürzere Verweilzeiten appliziert werden könnten, wobei weniger Organismen aus dem System ausgespült würden. Auch ein zweistufiges System mit räumlich getrennter Hydrolyse/Acidogenese und Acetogenese/Methanogenese wäre denkbar.

Um einen nahezu geschlossenen Stoffkreislauf zu gewährleisten, könnte der Biogasschlamm als Quelle für Medienbestandteile für die Kultivierung von *E. gracilis* verwendet werden. Dass der Schlammüberstand dafür geeignet ist, wurde in einigen Versuchen im Zuge dieser Arbeit gezeigt und bereits in der Literatur beschrieben. Die Ergebnisse dieser Versuche waren jedoch schwer zu replizieren und wiesen geringere Biotrockenmassekonzentrationen als bei der Verwendung des Basalmediums auf. Eine detailliertere Untersuchung diesbezüglich könnte jedoch die Replizierbarkeit und die Konzentration an gewonnener Biomasse erhöhen.

8 Literaturverzeichnis

- Acién, F., Fernández, J., Magán, J. und Molina, E. (2012). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances*, 30(6):1344–1353.
- Adolf, J., Fehrenbach, H., Fritsche, U. und Liebig, D. (2013). Welche Rolle können Biokraftstoffe im Verkehrssektor spielen? *Wirtschaftsdienst*, 93(2):124–131.
- Afiukwa, C. A. und Ogbonna, J. C. (2007). Effects of mixed substrates on growth and vitamin production by *Euglena gracilis*. *African Journal of Biotechnology*, 6(22):2612–2615.
- Ahring, B. K., Sandberg, M. und Angelidaki, I. (1995). Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(3):559–565.
- Alzate, M., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F. und Pérez-Elvira, S. (2014). Biochemical methane potential of microalgae biomass after lipid extraction. *Chemical Engineering Journal*, 243:405–410.
- Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Zollitsch, W., Mayer, K. und Gruber, L. (2007). Biogas production from maize and dairy cattle manure – influence of biomass composition on the methane yield. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 118(1):173–182.
- Andrade, M., Ouzounis, C., Sander, C., Tamames, J. und Valencia, A. (1999). Functional classes in the three domains of life. *Journal of Molecular Evolution*, 49(5):551–557.
- Angelidaki, I. und Ahring, B. K. (1993). Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(4):560–564.
- Angelidaki, I. und Ahring, B. K. (1994). Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: effect of temperature. *Water Research*, 28(3):727–731.
- Angelidaki, I. und Sanders, W. (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science & Biotechnology*, 3(2):117–129.

- Angelidaki, I., Ellegaard, L. und Ahring, B. K. (1993). A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(2):159–166.
- Antonian, A. A., Abakumova, I. A., Meleshko, G. I. und Vlasova, T. F. (1985). Possibilities of using proteins from unicellular algae in biological life support systems. *Kosmicheskaja Biologija i Aviakosmicheskaja Meditsina*, 19(1):65–69.
- Archibald, J. M. und Keeling, P. J. (2002). Recycled plastids: a ‘green movement’ in eukaryotic evolution. *Trends in Genetics*, 18(11):577–584.
- Asinari di San Marzano, C.-M., Legros, A., Naveau, H. P. und Nyns, E.-J. (1982). Biomethanation of the marine algae *Tetraselmis*. *International Journal of Solar Energy*, 1(4):263–272.
- Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y. und Banerjee, U. C. (2002). *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(3):245–279.
- Barley, M. E., Bekker, A. und Krapež, B. (2005). Late Archean to early Paleoproterozoic global tectonics, environmental change and the rise of atmospheric oxygen. *Earth and Planetary Science Letters*, 238(1):156–171.
- Barras, D. R. und Stone, B. A. (1968). Carbohydrate composition and metabolism in *Euglena*. In: Buetow, D. E. (Hrsg.), *The Biology of Euglena*, Band II: Biochemistry, Seiten 149–191. *Academic Press, London & New York*.
- Barras, D. R. und Stone, B. A. (1969). β -1,3-Glucan hydrolases from *Euglena gracilis* - I. The nature of the β -hydrolases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 191:329–341.
- Barsanti, L., Bastianini, A., Passarelli, V., Tredici, M. R. und Gualtieri, P. (2000). Fatty acid content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5):515–520.
- Barsanti, L., Vismara, R., Passarelli, V. und Gualtieri, P. (2001). Paramylon (β -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *Journal of Applied Phycology*, 13(1):59–65.
- Baserga, U. (1998). Landwirtschaftliche Co-Vergärungs-Biogasanlagen: Biogas aus organischen Reststoffen und Energiegras. *Eidg. Forschungsanstalt für Agrarwirtschaft und Landtechnik (FAT)*, 512:1–11.

- Bauer, C., Korthals, M., Gronauer, A. und Lebuhn, M. (2008). Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. *Water Science and Technology*, 58(7):1433.
- Bauernfeind, J. C. und Desai, I. D. (1977). The tocopherol content of food and influencing factors. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 8(4):337–382.
- Beams, H. W. und Anderson, E. (1961). Fine structure of protozoa. *Annual Reviews in Microbiology*, 15(1):47–68.
- Becker, W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond, A. (Hrsg.), Handbook of microalgal culture, Seiten 312–315. *Blackwell Science Ltd., Oxford*.
- Benemann, J. R. (2000). Hydrogen production by microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5):291–300.
- Beyer, R. E. (1994). The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 26(4):349–358.
- BGBl (2009). Internationale Organisation für erneuerbare Energien. Gesetz zu der Satzung vom 26. Januar 2009 der Internationalen Organisation für erneuerbare Energien (BGBl. 2009 II). *Bundesanzeiger Verlag*, Seiten 634–646.
- Biller, P., Ross, A. B., Skill, S. C., Lea-Langton, A., Balasundaram, B., Hall, C., Riley, R. und Llewellyn, C. A. (2012). Nutrient recycling of aqueous phase for microalgae cultivation from the hydrothermal liquefaction process. *Algal Research*, 1(1):70–76.
- Bischofberger, W., Dichtl, N., Rosenwinkel, K.-H., Seyfried, C.-F. und Böhnke, B. (2005). Anaerobtechnik. *Springer-Verlag, Berlin*.
- Bischoff, M. (2009). Erkenntnisse beim Einsatz von Zusatz- und Hilfsstoffen sowie von Spurenelementen in Biogasanlagen. *VDI-Berichte*, 2057:111–123.
- Bluhm, T. L. und Sarko, A. (1977). The triple helical structure of lentinan, a linear β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan. *Canadian Journal of Chemistry*, 55(2):293–299.
- BMELV (2014). Roadmap Bioraffinerien im Rahmen der Aktionspläne der Bundesregierung zur stofflichen und energetischen Nutzung nachwachsender Rohstoffe. https://www.bmbf.de/pub/RoadmapBioraffinerien_2014_bf_1.pdf.
- Bovee, E. C. (1982). Movement and locomotion of *Euglena*. In: Buetow, D. E. (Hrsg.), The Biology of *Euglena*, Band III: Physiology, Seiten 143–168. *Academic Press, London & New York*.

- Bramley, P. M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F. J., Manios, Y., Roxborough, H. E., Schuch, W., Sheehy, P. J. A. und Wagner, K.-H. (2000). Review vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:913–938.
- Brauer, A. und Weiland, P. (2009). Kontinuierliche Wasserstoffmessung zur Beurteilung der Prozessstabilität von Fermentationsversuchen. *VDI-Berichte*, 2057:2237–2247.
- Braun, R. (1982). Biogas – Methangärung Organischer Abfallstoffe: Grundlagen und Anwendungsbeispiele (Innovative Energietechnik), Band III. *Springer-Verlag, Wien, New York*.
- Braun, R., Huber, P. und Meyrath, J. (1981). Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion. *Biotechnology Letters*, 3(4):159–164.
- Briand, J. und Calvayrac, R. (1980). Paramylon synthesis in heterotrophic and photoheterotrophic *Euglena* (Euglenophyceae). *Journal of Phycology*, 16(2):234–239.
- Brown, G. D. und Gordon, S. (2001). Immune recognition: a new receptor for β -glucans. *Nature*, 413(6851):36–37.
- Brown, G. D. und Gordon, S. (2003). Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity*, 19(3):311–315.
- Brown, J. R. und Doolittle, W. F. (1997). Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4):456–502.
- Brown, L. M. (1996). Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. *Energy Conversion and Management*, 37(6):1363–1367.
- Buetow, D. E. (1968). Morphology and ultrastructure of *Euglena*. In: Buetow, D. E. (Hrsg.), *The Biology of Euglena*, Band I: General Biology and Ultrastructure, Seiten 109–184. *Academic Press, London & New York*.
- Buetow, D. E. (1989). The mitochondrion. In: Buetow, D. E. (Hrsg.), *The Biology of Euglena*, Band IV: Subcellular Biochemistry and Molecular Biology, Seiten 247–314. *Academic Press, London & New York*.
- Buetow, D. E. (2011). *Euglena*. *John Wiley & Sons, Ltd, New York*.
- Buettner, G. R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(2):535–543.

- Buhr, H. O. und Andrews, J. F. (1977). The thermophilic anaerobic digestion process. *Water Research*, 11(2):129–143.
- Bäumer, D. (1998). Isolierung und partielle Charakterisierung der Paramylonsynthese aus *Euglena gracilis* (Euglenozoa). Dissertation, Universität Bielefeld.
- Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (2012). Gesetz zur Förderung der Kreislaufwirtschaft und Sicherung der umweltverträglichen Bewirtschaftung von Abfällen (Kreislaufwirtschaftsgesetz – KrWG). www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/krwg/gesamt.pdf.
- Burton, G. W. (1994). Vitamin E: molecular and biological function. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53(02):251–262.
- Burton, G. W. und Ingold, K. U. (1981). Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *Journal of the American Chemical Society*, 103(21):6472–6477.
- Burton, G. W., Foster, D. O., Perly, B., Slater, T. F., Smith, I. C. P., Ingold, K. U., Willson, R. L. und Scott, G. (1985). Biological antioxidants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 311(1152):565–578.
- Burton, G. W., Joyce, A. und Ingold, K. U. (1983). Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 221(1):281–290.
- Buxy, S., Diltz, R. und Pullammanappallil, P. (2013). Biogasification of marine algae *Nannochloropsis oculata*. *Materials Challenges in Alternative and Renewable Energy II: Ceramic Transactions*, Seiten 59–67.
- Calvayrac, R., Laval-Martin, D., Briand, J. und Farineau, J. (1981). Paramylon synthesis by *Euglena gracilis* photoheterotrophically grown under low O₂ pressure. *Planta*, 153(1):6–13.
- Campbell, M. N. (2008). Biodiesel: algae as a renewable source for liquid fuel. *Guelp Engineering Journal*, 1:2–7.
- Campbell, N. A., Reece, J. B. und Mar, J. (2006). Biologie, 6. Auflage. *Pearson Studium, München*.
- Cann, I. K. O. und Ishino, Y. (1999). Archaeal DNA replication: identifying the pieces to solve a puzzle. *Genetics*, 152(4):1249–1267.

- Chae, S. R., Hwang, E. J. und Shin, H. S. (2006). Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. *Bioresource Technology*, 97(2):322–329.
- Chan, A. C. (1993). Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 71(9):725–731.
- Cheeseman, K. H., Burton, G. W., Ingold, K. U. und Slater, T. F. (1984). Lipid peroxidation and lipid antioxidants in normal and tumor cells. *Toxicologic Pathology*, 12(3):235–239.
- Chen, D. und Ainsworth, A. J. (1992). Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *Journal of Fish Diseases*, 15(4):295–304.
- Chen, J. und Raymond, K. (2008). Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. *Vascular Health and Risk Management*, 4(6):1265.
- Chen, P. H. und Oswald, W. J. (1998). Thermochemical treatment for algal fermentation. *Environment International*, 24(8):889–897.
- Chen, T. H. und Day, D. L. (1986). Effects of temperature change on the stability of thermophilic fermentation of swine manure. *Agricultural Wastes*, 16(4):313–317.
- Chen, Y., Cheng, J. J. und Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology*, 99(10):4044–4064.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3):294–306.
- Chisti, Y. (2008). Response to Reijnders: do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants. *Trends in Biotechnology*, 26(7):351–352.
- Chiu, A. und Kimball, A. B. (2003). Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. *British Journal of Dermatology*, 149(4):681–691.
- Chynoweth, D. P. und Mah, R. A. (1971). Anaerobic biological treatment processes. *Advances in Chemical Science*, 105:41–53.
- Clarke, A. E. und Stone, B. A. (1960). Structure of the paramylon from *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 44:161–163.
- Conrad, R. (1999). Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 28(3):193–202.

- Cook, J. R. (1963). Adaptations in growth and division in *Euglena* effected by energy supply. *The Journal of Protozoology*, 10(4):436–444.
- Cook, J. R. (1968). The cultivation and growth of *Euglena*. In: Buetow, D. E. (Hrsg.), *The Biology of Euglena*, Band I: General Biology and Ultrastructure, Seiten 243–314. *Academic Press, London & New York*.
- Cook, J. R. (1971). Influence of culture pH on photo-inhibition of division in *Euglena gracilis*. *Journal of Cellular Physiology*, 78(2):273–276.
- Cramer, M. und Myers, J. (1952). Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*. *Archiv für Mikrobiologie*, 17:384–402.
- Darzins, A., Pienkos, P. und Edye, L. (2010). Current status and potential for algal biofuels production. *A Report to IEA Bioenergy Task*, 39.
- De Baere, L., Devocht, M., Van Assche, P. und Verstraete, W. (1984). Influence of high NaCl and NH₄Cl salt levels on methanogenic associations. *Water Research*, 18(5):543–548.
- Dębowski, M., Zieliński, M., Grala, A. und Dudek, M. (2013). Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies – review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27:596–604.
- Demirbas, A. und Demirbas, M. F. (2010). *Algae energy: algae as a new source of biodiesel*. Springer-Verlag, New York.
- Deng, M.-D. und Coleman, J. R. (1999). Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2):523–528.
- Deppenmeier, U. (2002). The unique biochemistry of methanogenesis. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 71:223–283.
- Deublein, D. und Steinhauser, A. (2008). *Biogas from waste and renewable resources: an introduction*. John Wiley & Sons, Weinheim.
- DGE (2000). Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 1. Auflage. *Umschau Braus GmbH, Frankfurt am Main*.
- Döhler, H., Eckel, H. und Frisch, J. (2006). *Energiepflanzen*. KTBL, Darmstadt.
- Diekert, G. und Wohlfarth, G. (1994). Metabolism of homoacetogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(1–3):209–221.

- DIN 38406-5 (1983). Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Kationen (Gruppe E); Bestimmung des Ammonium-Stickstoffs (E 5). *Beuth Verlag GmbH, Berlin*.
- DIN 38414-8 (2006). Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Schlamm und Sedimente (Gruppe S); Bestimmung des Faulverhaltens (S 8). *Beuth Verlag GmbH, Berlin*.
- DIN 51732 (2014). Testing of solid mineral fuels – Determination of total carbon, hydrogen and nitrogen – Instrumental methods. *Beuth Verlag GmbH, Berlin*.
- DIN EN ISO 11466 (1995). Soil quality – Extraction of trace elements soluble in aqua regia. *Beuth Verlag GmbH, Berlin*.
- DIN EN ISO 11885 (2009). Water quality – Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885:2007). *Beuth Verlag GmbH, Berlin*.
- DIN EN ISO 6141 (2013). Gas analysis – Requirements for certificates for calibration gases and gas mixtures. *Beuth Verlag GmbH, Berlin*.
- Diplock, A. T., Green, J., Edwin, E. E. und Bunyan, J. (1961). Tocopherol, ubiquinones and ubichromenols in yeasts and mushrooms. *Nature*, 189:749–750.
- Dobell, C. (1932). Antony van Leeuwenhoek and his ‘little animals’. *Swets & Zeitlinger, Amsterdam*.
- Domke, A., Großklaus, R., Niemann, B., Przyrembel, H., Richter, K., Schmidt, E., Weiborn, A., Wörner, B. und Ziegenhagen, R. (2004). Verwendung von Vitaminen in Lebensmitteln – Toxikologische und ernährungsphysiologische Aspekte, Teil 1. *Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin*.
- Dornack (2000). Möglichkeiten der Optimierung bestehender Biogasanlagen am Beispiel Plauen/Zobes. In: Anaerobe biologische Abfallbehandlung. Tagungsband der Fachtagung 21.–22.2.2000, Beiträge zur Abfallwirtschaft, Band 12. *Schriftenreihe des Institutes für Abfallwirtschaft und Altlasten der TU Dresden*.
- Dornack, C. (2009). Stickstoff in Biogasanlagen. *VDI-Berichte*, 2057:155–171.
- Doucha, J., Straka, F. und Lívanský, K. (2005). Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 17(5):403–412.

- Dragone, G., Fernandes, B. D., Vicente, A. A. und Teixeira, J. A. (2010). Third generation biofuels from microalgae. *Formatex Research Center*, Seiten 1355–1366.
- Drake, H. L., Daniel, S. L., Küsel, K., Matthies, C., Kuhner, C. und Braus-Stromeier, S. (1997). Acetogenic bacteria: what are the in situ consequences of their diverse metabolic versatilities? *Biofactors*, 6(1):13–24.
- Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Rice, E. W. und Greenberg, A. E. (1985). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association, Washington*.
- Edmunds, L. N. (1988). Cellular and molecular bases of biological clocks: models and mechanisms for circadian timekeeping. *Springer, New York*.
- Efthimiou, S. (1996). Dietary intake of β -1,3/1,6-glucans in juvenile dentex (*Dentex dentex*), Sparidae: effects on growth performance, mortalities and non-specific defense mechanisms. *Journal of Applied Ichthyology*, 12(1):1–7.
- Eggersdorfer, M., Laudert, D., Létinois, U., McClymont, T., Medlock, J., Netscher, T. und Bonrath, W. (2012). One hundred years of vitamins – a success story of the natural sciences. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(52):12960–12990.
- Ehrenberg, C. G. (1838). Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen: Ein Blick in das tiefere organische Leben der Natur. *Leopold Voss, Leipzig*.
- Eisberg, N. (2006). Harvesting energy. *Chemistry and Industry*, (17):24–25.
- Elliott, D. C., Hart, T. R., Schmidt, A. J., Neuenschwander, G. G., Rotness, L. J., Olarte, M. V., Zacher, A. H., Albrecht, K. O., Hallen, R. T. und Holladay, J. E. (2013). Process development for hydrothermal liquefaction of algae feedstocks in a continuous-flow reactor. *Algal Research*, 2(4):445–454.
- Evans, H. M. und Bishop, K. S. (1922). On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*, 56:650–651.
- Fawcett, D. W. und Porter, K. R. (1954). A study of the fine structure of ciliated epithelia. *Journal of Morphology*, 94(2):221–281.
- Fehrenbach, H., Giegrich, J., Reinhardt, G., Sayer, U., Gretz, M., Lanje, K. und Schmitz, J. (2008). Kriterien einer nachhaltigen Bioenergienutzung im globalen Maßstab. *UBA-Forschungsbericht*, 206:41–112.

- Fischer, J., Iannotti, E. und Porter, J. (1983). Anaerobic digestion of swine manure at various influent concentrations. *Biological Wastes*, 6:147–166.
- FNR (2013). Leitfaden Biogas: Von der Gewinnung zur Nutzung. *Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.*
- Follmann, H., Markl, H. und Vortmeyer, D. (1978). Continuous production of microalgae under mixotrophic conditions. *Chemie Ingenieur Technik*, 50(4):319–319.
- Food & Nutrition Board (1989). Recommended Dietary Allowances. *National Research Council, Washington*.
- Foote, C. S., Clough, R. L. und Yee, B. G. (1978). Photooxidation of tocopherols. In: de Duve, C. und Hayaishi, O. (Hrsg.), *Tocopherol, Oxygen and Biomembrane*, Seiten 13–21. *Biomedical Press, Amsterdam*.
- Forbes, M. und György, P. (1957). Effect of yeast and of yeast extracts on liver necrosis and hemolysis by dialuric acid of red blood cells of rats on a necrogenic diet. *The Journal of Nutrition*, 63(3):461–470.
- Friedlaender, M. H. G., Cook, W. H. und Martin, W. G. (1954). Molecular weight and hydrodynamic properties of laminarin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 14:136–144.
- Fryer, M. J. (1992). The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant, Cell and Environment*, 15:381–392.
- Fujita, T., Ogbonna, J. C., Tanaka, H. und Aoyagi, H. (2009). Effects of reactive oxygen species on α -tocopherol production in mitochondria and chloroplasts of *Euglena gracilis*. *Journal of Applied Phycology*, 21(2):185–191.
- Gaffron, H. und Rubin, J. (1942). Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *The Journal of General Physiology*, 26(2):219–240.
- Gallert, C., Bauer, S. und Winter, J. (1998). Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(4):495–501.
- Garber, W. F., Ohara, G. T., Colbaugh, J. E. und Raksit, S. K. (1975). Thermophilic digestion at the Hyperion treatment plant. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, Seiten 950–961.
- Garcia, J.-L., Patel, B. K. C. und Ollivier, B. (2000). Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*, 6(4):205–226.

- Ge, Y., Yan, H., Hui, B., Ni, Y., Wang, S. und Cai, T. (2002). Extraction of natural vitamin E from wheat germ by supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4):685–689.
- Ghetti, F., Colombetti, G., Lenci, F., Campani, E., Polacco, E. und Quaglia, M. (1985). Fluorescence of *Euglena gracilis* photoreceptor pigment: an in vivo microspectrofluorometric study. *Photochemistry and Photobiology*, 42(1):29–33.
- Giasuddin, A. S. M. und Diplock, A. T. (1981). The influence of vitamin E on membrane lipids of mouse fibroblasts in culture. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 210(1):348–362.
- Golueke, C. G. und Oswald, W. J. (1959). Biological conversion of light energy to the chemical energy of methane. *Applied Microbiology*, 7:219–227.
- Golueke, C. G., Oswald, W. J. und Gotaas, H. B. (1957). Anaerobic digestion of algae. *Applied Microbiology*, 5(1):47–55.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N. und Steyer, J. (2012a). Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Bioresource Technology*, 110:610–616.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N. und Steyer, J. (2012b). Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass and Bioenergy*, 40:105–111.
- Gottlieb, J. (1850). Über eine neue, mit Stärkemehl isomere Substanz. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 75:51–61.
- Green, J. (1958). The distribution of tocopherols during the life-cycle of some plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 9(12):801–812.
- Green, J., Price, S. A. und Gare, L. (1959). Tocopherols in micro-organisms. *Nature*, 184(4695):1339–1339.
- Grimm, P., Risse, J.-M., Cholewa, D., Müller, J. M., Beshay, U., Friehs, K. und Flaschel, E. (2015). Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of α -tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion. *Journal of Biotechnology*, 215:72–79.
- Gronauer, A., Andrade, D., Bauer, C., Effenberger, M., Heuwinkel, H., Lebuhn, M. und Marinperez, C. (2009). Prozessoptimierung – Ein Zusammenspiel von Technik und

- Mikrobiologie. *Gülzower Fachgespräche, Tagungsband „Biogas in der Landwirtschaft – Stand und Perspektiven“*, 32:120–140.
- Gujer, W. und Zehnder, A. J. B. (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science & Technology*, 15(8–9):127–167.
- Hack, M. H., Yaeger, R. G. und McCaffery, T. D. (1962). Comparative lipid biochemistry – II. Lipids of plant and animal flagellates, a non-motile alga, an ameba and a ciliate. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 6(3):247–252.
- Hallick, R. B., Hong, L., Drager, R. G., Favreau, M. R., Monfort, A., Orsat, B., Spielmann, A. und Stutz, E. (1993). Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Research*, 21(15):3537–3544.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16(1):33–50.
- Hashimoto, A. G. (1982). Methane from cattle waste: effects of temperature, hydraulic retention time, and influent substrate concentration on kinetic parameter (K). *Biotechnology and Bioengineering*, 24(9):2039–2052.
- Hayashi, M., Toda, K., Yoneji, T., Sato, O. und Kitaoka, S. (1993). Dietary value of rotifers and *Artemia* enriched with *Euglena gracilis* for red sea bream. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*, 59(6):1051–1058.
- Healey, F. (1970). Hydrogen evolution by several algae. *Planta*, 91(3):220–226.
- Hill, D. T. (1982). A comprehensive dynamic model for animal waste methanogenesis. *Transactions of the ASAE*, 25(5):1374–1380.
- Hill, D. T. und Bolte, J. P. (1989). Digester stress as related to iso-butyric and iso-valeric acids. *Biological Wastes*, 28(1):33–37.
- Hill, D. T. und Holmberg, R. D. (1988). Long chain volatile fatty acid relationships in anaerobic digestion of swine waste. *Biological Wastes*, 23(3):195–214.
- Hill, D. T., Cobb, S. A. und Bolte, J. P. (1987). Using volatile fatty acid relationships to predict anaerobic digester failure. *Transactions of the ASAE*, 30:496–501.
- Hogarty, C. J., Ang, C. und Eitenmiller, R. R. (1989). Tocopherol content of selected foods by HPLC/fluorescence quantitation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2(3):200–209.
- Horwitt, M. K. (1990). Vitamin E abstracts. *Veris, La Grange*.

- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. und Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54:621–639.
- Hughes, P. E. und Tove, S. B. (1982). Occurrence of α -Tocopherolquinone and α -Tocopherolquinol in Microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 151(3):1397–1402.
- Hulanicka, D., Erwin, J. und Bloch, K. (1964). Lipid metabolism of *Euglena gracilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 239(9):2778–2787.
- Hunter, S. C. und Cahoon, E. B. (2007). Enhancing vitamin E in oilseeds: unraveling tocopherol and tocotrienol biosynthesis. *Lipids*, 42(2):97–108.
- Hurlbert, R. E. und Rittenberg, S. C. (1962). Glucose metabolism of *Euglena gracilis* var. *bacillaris*: growth and enzymatic studies. *Journal of Protozoology*, 9(2):170–182.
- Inglesby, A. E. und Fisher, A. C. (2012). Enhanced methane yields from anaerobic digestion of *Arthrospira maxima* biomass in an advanced flow-through reactor with an integrated recirculation loop microbial fuel cell. *Energy & Environmental Science*, 5(7):7996–8006.
- Izquierdo, M. S., Fernandez-Palacios, H. und Tacon, A. G. J. (2001). Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197(1):25–42.
- Jahn, T. L. (1946). The euglenoid flagellates. *The Quarterly Review of Biology*, 21(3):246–274.
- Jahn, T. L. und Bovee, E. C. (1968). Locomotive and motile response in *Euglena*. In: Buetow, D. E. (Hrsg.), *The Biology of Euglena*, Band I: General Biology and Ultrastructure, Seiten 45–108. *Academic Press, London & New York*.
- Johnson, L. P. (1968). The taxonomy, phylogeny and evolution of the genus *Euglena*. In: Buetow, D. E. (Hrsg.), *The Biology of Euglena*, Band I: General Biology and Ultrastructure, Seiten 1–24. *Academic Press, London & New York*.
- Jördening, H.-J. und Winter, J. (2006). Environmental biotechnology: concepts and applications. *John Wiley & Sons, Weinheim*.
- Jørgensen, J. B. und Robertsen, B. (1995). Yeast β -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. *Developmental & Comparative Immunology*, 19(1):43–57.
- Kadam, K. L. (1997). Power plant flue gas as a source of CO₂ for microalgae cultivation: economic impact of different process options. *Energy Conversion and Management*, 38:505–510.

- Kahlon, T. S., Chow, F. I., Knuckles, B. E. und Chiu, M. M. (1993). Cholesterol lowering effects in hamsters of β -glucan enriched barley fraction, dehulled whole barley, rice bran, and oat bran and their combinations. *Cereal Chemistry*, 70(4):435–440.
- Kaiser, S., Di Mascio, P., Murphy, M. E. und Sies, H. (1990). Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 277(1):101–108.
- Kaltschmitt, M., Hartmann, H. und Hofbauer, H. (2009). Energie aus Biomasse: Grundlagen, Techniken und Verfahren, Band 2. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg*.
- Kamal-Eldin, A. und Appelqvist, L.-Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7):671–701.
- Kamiya, A. und Kowallik, W. (1987). Photoinhibition of glucose uptake in *Chlorella*. *Plant and Cell Physiology*, 28(4):611–619.
- Karlsson, A., Einarsson, P., Schnürer, A., Sundberg, C., Ejlertsson, J. und Svensson, B. H. (2012). Impact of trace element addition on degradation efficiency of volatile fatty acids, oleic acid and phenyl acetate and on microbial populations in a biogas digester. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(4):446–452.
- Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S. und Takeshige, K. (2002). Activation of macrophages by linear (1→3)- β -D-glucans implications for the recognition of fungi by innate immunity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(39):36825–36831.
- Kayhanian, M. (1994). Performance of a high-solids anaerobic digestion process under various ammonia concentrations. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 59(4):349–352.
- Kelm, M. und Taube, F. (2007). Energiebilanz der Biogaserzeugung aus Gras- und Maissilage. *Mitteilungen der Arbeitsgemeinschaft Grünland und Futterbau*, 8.
- Kempner, E. S. (1982). Stimulation and inhibition of the metabolism and growth of *Euglena gracilis*. In: Buetow, D. E. (Hrsg.), *The Biology of Euglena*, Band III: Physiology, Seiten 197–252. *Academic Press, London & New York*.
- Khanal, S. K. (2008). Anaerobic biotechnology for bioenergy production. *Wiley-Blackwell, Oxford*.
- Khanh, N., Kitaya, Y., Xiao, L., Endo, R. und Shibuya, T. (2013). Selection of microalgae suitable for culturing with digestate from methane fermentation. *Environmental Technology*, 34(13–14):2039–2045.

- King, J. W., Favati, F. und Tayler, S. L. (1996). Production of tocopherol concentrates by supercritical fluid extraction and chromatography. *Separation Science and Technology*, 31(13):1843–1857.
- Kirschstein, M. (1969). Das rhythmische Verhalten einer farblosen Mutante von *Euglena gracilis*. *Planta*, 85(2):126–134.
- Kiss, J. Z., Vasconcelos, A. C. und Triemer, R. E. (1987). Structure of the euglenoid storage carbohydrate, paramylon. *American Journal of Botany*, 74(6):877–882.
- Kiss, J. Z., Vasconcelos, A. C. und Triemer, R. E. (1988). The intramembranous particle profile of the paramylon membrane during paramylon synthesis in *Euglena* (Euglenophyceae). *Journal of Phycology*, 24(2):152–157.
- Kitaya, Y., Kibe, S., Oguchi, M., Tanaka, H., Miyatake, K. und Nakano, Y. (1998). Effects of CO₂ and O₂ concentrations and light intensity on growth of microalgae (*Euglena gracilis*) in CELSS. *Life Support & Biosphere Science: International Journal of Earth Space*, 5(2):243–247.
- Kitaya, Y., Azuma, H. und Kiyota, M. (2005). Effects of temperature, CO₂/O₂ concentrations and light intensity on cellular multiplication of microalgae, *Euglena gracilis*. *Advances in Space Research*, 35(9):1584–1588.
- Klassen, V., Blifernez-Klassen, O., Hoekzema, Y., Mussgnug, J. H. und Kruse, O. (2015). A novel one-stage cultivation/fermentation strategy for improved biogas production with microalgal biomass. *Journal of Biotechnology*, 215:44–51.
- Klebs, G. A. (1883). Über die Organisation einiger Flagellatengruppen und ihre Beziehungen zu Algen und Infusorien. *Untersuchungen aus dem Botanischen Institut zu Tübingen*, 1:233–362.
- Klenk, H.-P. und Doolittle, W. F. (1994). Evolution: Archaea and eukaryotes versus bacteria? *Current Biology*, 4(10):920–922.
- Kloss, R. (1986). Planung von Biogasanlagen nach technisch-wirtschaftlichen Kriterien: Stand des Wissens, Stand der Technik in der Landwirtschaft; Planungsmodell; mit Hinweisen für die Planung abwassertechnischer Anlagen. *R. Oldenbourg-Verlag, Wien, München*.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Yamaguchi, K., Nishio, N. und Nagai, S. (1992). Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74(1):17–20.

- Koizumi, N., Sakagami, H., Utsumi, A., Fujinaga, S., Takeda, M., Asano, K., Sugawara, I., Ichikawa, Y., Nakashima, H., Murakami, T., Miyano, N. und Yamamoto, N. (1993). Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of sulfated paramylon. *Antiviral Research*, 21:1–14.
- Koll, M., Brandt, P. und Wiessner, W. (1980). Hemmung der lichtabhängigen Chloroplastenentwicklung etiologierter *Euglena gracilis* durch Glucose. *Protoplasma*, 105(1-2):121–128.
- Kondo, Y., Kato, A., Hojo, H., Nozoe, S., Takeuch, M. und Ochi, K. (1992). Cytokine-related immunopotentiating activities of paramylon, a β -(1-3)-D-glucan from *Euglena gracilis*. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, 15:617–621.
- Korn, E. D. (1964). The fatty acids of *Euglena gracilis*. *Journal of Lipid Research*, 5(3):352–362.
- Koster, I. W. und Koomen, E. (1988). Ammonia inhibition of the maximum growth rate (μ_m) of hydrogenotrophic methanogens at various pH-levels and temperatures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28(4-5):500–505.
- Koster, I. W. und Lettinga, G. (1988). Anaerobic digestion at extreme ammonia concentrations. *Biological Wastes*, 25(1):51–59.
- Krajčovič, J., Vesteg, M. und Schwartzbach, S. D. (2015). Euglenoid flagellates: a multifaceted biotechnology platform. *Journal of Biotechnology*, 202:135–145.
- Kroiss, H. (1985). Anaerobe Abwasserreinigung. *Technische Universität Wien, Institut für Wassergüte und Landschaftswasserbau*.
- Kruk, J. und Strzałka, K. (1995). Occurrence and function of α -tocopherol quinone in plants. *Journal of Plant Physiology*, 145(4):405–409.
- Kruse, O. und Hankamer, B. (2010). Microalgal hydrogen production. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3):238–243.
- Kruse, O., Rupprecht, J., Bader, K.-P., Thomas-Hall, S., Schenk, P. M., Finazzi, G. und Hankamer, B. (2005). Improved photobiological H₂ production in engineered green algal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40):34170–34177.
- Kusmic, C., Barsacchi, R., Barsanti, L., Gualtieri, P. und Passarelli, V. (1998). *Euglena gracilis* as source of the antioxidant vitamin E. Effects of culture conditions in the wild strain and in the natural mutant WZSL. *Journal of Applied Physiology*, 10(6):555–559.

- Lackey, J. B. (1938). A study of some ecologic factors affecting the distribution of protozoa. *Ecological Monographs*, 8(4):501–528.
- Lackey, J. B. (1968). Ecology of *Euglena*. In: Buetow, D. E. (Hrsg.), *The Biology of Euglena*, Band I: General Biology and Ultrastructure, Seiten 27–44. *Academic Press, London & New York*.
- Lane, J. (2013). Algenol hits 9K gallons/acre mark for algae-to-ethanol process. *Biofuels Digest*.
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P. und Zillig, W. (1995). Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(13):5768–5772.
- Lardon, L., Helias, A., Sialve, B., Steyer, J.-P. und Bernard, O. (2009). Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environmental Science & Technology*, 43(17):6475–6481.
- Latgé, J.-P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, 66(2):279–290.
- Laursen, W. (2005). Students take a green initiative. *Chemical Engineer*, 774(75):32–34.
- Lebuhn, M., Liu, F., Heuwinkel, H. und Gronauer, A. (2008). Biogas production from mono-digestion of maize silage – long-term process stability and requirements. *Water Science & Technology*, 58(8):1645–1651.
- Lee, S., Oh, Y., Kim, D., Kwon, D., Lee, C. und Lee, J. (2011). Converting carbohydrates extracted from marine algae into ethanol using various ethanolic *Escherichia coli* strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(6):878–888.
- Leedale, G. F. (1966). *Euglena*: a new look with the electron microscope. *Advanced Science*, 107:22–37.
- Leedale, G. F. (1967). Euglenida/Euglenophyta. *Annual Review of Microbiology*, 21:31–48.
- Leedale, G. F. (1982). Ultrastructure. In: Buetow, D. E. (Hrsg.), *The Biology of Euglena*, Band III: Physiology, Seiten 1–27. *Academic Press, New York & London*.
- Leedale, G., Meeuse, B. und Pringsheim, E. (1965). Structure and physiology of *Euglena spirogyra*. III–VI. *Archives of Microbiology*, 50(2):133–155.
- Lehmann, J., Martin, H., Lashley, E., Marshall, M. und Judd, J. (1986). Vitamin E in foods from high and low linoleic acid diets. *Journal of the American Dietetic Association*, 86(9):1208–1216.

- Lestari, S., Mäki-Arvela, P., Beltramini, J., Lu, G. und Murzin, D. Y. (2009). Transforming triglycerides and fatty acids into biofuels. *ChemSusChem*, 2(12):1109–1119.
- Lettinga, G., Rebac, S. und Zeeman, G. (2001). Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *Trends in Biotechnology*, 19(9):363–370.
- Lewin, J. C. und Guillard, R. R. L. (1963). Diatoms. *Annual Reviews in Microbiology*, 17(1):373–414.
- Lü, F., Ji, J., Shao, L. und He, P. (2013). Bacterial bioaugmentation for improving methane and hydrogen production from microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 6(92):1–11.
- Lucy, J. (1972). Functional and structural aspects of biological membranes: a suggested structural role for vitamin E in the control of membrane permeability and stability. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 203(1):4–11.
- Lyman, H., Epstein, H. T. und Schiff, J. A. (1961). Studies of chloroplast development in *Euglena* I. Inactivation of green colony formation by UV light. *Biochimica et Biophysica Acta*, 50(2):301–309.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M. und González-Fernández, C. (2015). Protease pretreated *Chlorella vulgaris* biomass bioconversion to methane via semi-continuous anaerobic digestion. *Fuel*, 158:35–41.
- Manners, D. J., Masson, A. J. und Patterson, J. C. (1973). The structure of a β -1,3-D-glucan from yeast cell walls. *Biochemical Journal*, 135:19–30.
- Manton, I. (1952). The fine structure of plant cilia. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 6:306.
- Marchaim, U. und Krause, C. (1993). Propionic to acetic acid ratios in overloaded anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 43(3):195–203.
- Marchessault, R. H. und Deslandes, Y. (1979). Fine structure of (1-3)- β -glucans: curdlan and paramylon. *Carbohydrate Research*, 75:231–242.
- Marquez, F. J., Sasaki, K., Kakizono, T., Nishio, N. und Nagai, S. (1993). Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(5):408–410.
- Marsolek, M. D., Kendall, E., Thompson, P. L. und Shuman, T. R. (2014). Thermal pretreatment of algae for anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 151:373–377.

- Martínez, F. und Orús, M. I. (1991). Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM 101. *Plant Physiology*, 95(4):1150–1155.
- McCarty, P. L. und McKinney, R. E. (1961a). Volatile acid toxicity in anaerobic digestion. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 33(3):223–232.
- McCarty, P. L. (1964). Anaerobic waste treatment fundamentals. *Public Works*, 95(9):107–112.
- McCarty, P. L. und McKinney, R. E. (1961b). Salt toxicity in anaerobic digestion. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 33:399–415.
- McIntosh, M., Stone, B. A. und Stanisich, V. A. (2005). Curdlan and other bacterial (1→3)- β -D-glucans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(2):163–173.
- McLaughlin, P. J. und Weihrauch, J. L. (1979). Vitamin E content of foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 75(6):647–665.
- McMurray, C. H. und Rice, D. A. (1982). Vitamin E and selenium deficiency diseases. *Irish Veterinary Journal*, 36:57–67.
- Melbinger, N. R., Donnellon, J. und Zablatzky, H. R. (1971). Toxic effects of ammonia nitrogen in high-rate digestion. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 43:1658–1670.
- Melis, A. und Happe, T. (2001). Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiology*, 127(3):740–748.
- Mendiola, J. A., García-Martínez, D., Rupérez, F. J., Martín-Álvarez, P. J., Reglero, G., Cifuentes, A., Barbas, C., Ibanez, E. und Señoráns, F. J. (2008). Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE. *The Journal of Supercritical Fluids*, 43(3):484–489.
- Miao, H., Lu, M., Zhao, M., Huang, Z., Ren, H., Yan, Q. und Ruan, W. (2013). Enhancement of Taihu blue algae anaerobic digestion efficiency by natural storage. *Bioresource Technology*, 149:359–366.
- Michel, H. (2012). Editorial: the nonsense of biofuels. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(11):2516–2518.
- Morweiser, M., Kruse, O., Hankamer, B. und Posten, C. (2010). Developments and perspectives of photobioreactors for biofuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(4):1291–1301.

- Mösche, M. und Jördening, H.-J. (1999). Comparison of different models of substrate and product inhibition in anaerobic digestion. *Water Research*, 33(11):2545–2554.
- Moya, M. J., Sánchez-Guardamino, M. L., Vilavella, A. und Barbera, E. (1997). Growth of *Haematococcus lacustris*: a contribution to kinetic modelling. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 68(3):303–309.
- Mudrack, K. und Kunst, S. (2003). Biologie der Abwasserreinigung, 5. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg & Berlin*.
- Murray, J. M. (1981). Control of cell shape by calcium in the Euglenophyceae. *Journal of Cell Science*, 49(1):99–117.
- Mussgnug, J. H., Klassen, V., Schlüter, A. und Kruse, O. (2010). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*, 150:51–56.
- Nagai, S. (1979). Mass and energy balances for microbial growth kinetics. *Advances in Biochemical Engineering*, 11:49–83.
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K. und Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2):578–597.
- Nakano, Y., Hamasaki, K., Takenaka, S., Miyatake, K., Tani, A. und Aiga, I. (1995). Adaptation and the mechanism of *Euglena gracilis* to high CO₂ conditions. *CELSS Journal*, 7(2):15–18.
- Neely, W. C., Martin, J. M. und Barker, S. A. (1988). Products and relative reaction rates of the oxidation of tocopherols with singlet molecular oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, 48(4):423–428.
- Nguyen, K., Yoshiaki, K., Xiao, L., Endo, R. und Shibuya, T. (2015). Microalgae culture with digestate from methane fermentation. *Eco-Engineering*, 27(1):7–11.
- Nicolas, P., Freyssinet, G. und Nigon, V. (1980). Effect of light on glucose utilization by *Euglena gracilis*. *Plant Physiology*, 65(4):631–634.
- Nigam, P. S. und Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1):52–68.
- Noma, Y. und Asakawa, Y. (1998). *Euglena gracilis* Z: Biotransformation of Terpenoids and Related Compounds. In: Bajaj, Y. (Hrsg.), Medicinal and Aromatic Plants X, Band 41, Seiten 194–237. *Springer-Verlag, Berlin & Heidelberg*.

- Oechsner, H., Lemmer, A. und Neuberger, C. (2003). Feldfrüchte als Gärsubstrat in Biogasanlagen. *Landtechnik*, 58(3):146–147.
- Ogawa, T. und Aiba, S. (1981). Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(5):1121–1132.
- Ogbonna, J. C. (2009). Microbiological production of tocopherols: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84:217–225.
- Ogbonna, J. C., Tomiyama, S. und Tanaka, H. (1998). Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* Z for efficient production of α -tocopherol. *Journal of Applied Physiology*, 10:67–74.
- Ogbonna, J. C., Tomiyama, S. und Tanaka, H. (1999). Production of α -tocopherol by sequential heterotrophic–photoautotrophic cultivation of *Euglena gracilis*. *Journal of Biotechnology*, 70:213–221.
- Ogbonna, J. C., Ichige, E. und Tanaka, H. (2002a). Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58:532–538.
- Ogbonna, J. C., Ichige, E. und Tanaka, H. (2002b). Regulating the ratio of photoautotrophic to heterotrophic metabolic activities in photoheterotrophic culture of *Euglena gracilis* and its application to α -tocopherol production. *Biotechnology Letters*, 24:953–958.
- Oleszkiewicz, J. A. und Sharma, V. K. (1990). Stimulation and inhibition of anaerobic processes by heavy metals – a review. *Biological Wastes*, 31(1):45–67.
- Olsen, G. J. und Woese, C. R. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *The FASEB Journal*, 7(1):113–123.
- Packer, L. und Kagan, V. E. (1993). Vitamin E: The antioxidant harvesting center of membranes and lipoproteins. In: Packer, L. und Fuchs, J. (Hrsg.), Vitamin E in health and disease, Seiten 179–192. *Marcel Dekker, New York*.
- Park, S. und Li, Y. (2012). Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae biomass residue and lipid waste. *Bioresource Technology*, 111:42–48.
- Parkin, G. F. und Miller, S. W. (1983). Response of methane fermentation to continuous addition of selected industrial toxicants. In: Proceedings of the 37th Purdue Industrial Wastes Conference, Ann Arbor.

- Passos, F., García, J. und Ferrer, I. (2013). Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. *Bioresource Technology*, 138:79–86.
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H. und Ferrer, I. (2014). Pretreatment of microalgae to improve biogas production: a review. *Bioresource Technology*, 172:403–412.
- Peschel, T. (2014). Biogas könnte fast die Hälfte russischer Gasimporte ersetzen. *Sonne, Wind & Wärme*, 7:12.
- Pfeffer, J. T. (1974). Temperature effects on anaerobic fermentation of domestic refuse. *Biotechnology and Bioengineering*, 16(6):771–787.
- Pitelka, D. R. (1963). Electron-microscopic structure of protozoa. *Pergamon Press, Ltd., Headington Hill Hall, London, New York, Paris, & Oxford*.
- Polakovičová, G., Kušnír, P., Nagyová, S. und Mikulec, J. (2012). Process integration of algae production and anaerobic digestion. *Chemical Engineering Transactions*, 29:1129–1134.
- Posten, C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*, 9(3):165–177.
- Powls, R. und Redfearn, E. R. (1967). The tocopherols of the blue-green algae. *Biochemical Journal*, 104(2):24–26.
- Prajapati, S. K., Kumar, P., Malik, A. und Vijay, V. K. (2014a). Bioconversion of algae to methane and subsequent utilization of digestate for algae cultivation: a closed loop bioenergy generation process. *Bioresource Technology*, 158:174–180.
- Prajapati, S. K., Malik, A. und Vijay, V. K. (2014b). Comparative evaluation of biomass production and bioenergy generation potential of *Chlorella* spp. through anaerobic digestion. *Applied Energy*, 114:790–797.
- Pringsheim, E. G. und Pringsheim, O. (1952). Experimental elimination of chromatophores and eye-spot in *Euglena gracilis*. *New Phytologist*, 51:65–76.
- Provasoli, L., Hutner, S. H. und Schatz, A. (1948). Streptomycin-induced chlorophyll-less races of *Euglena*. *Experimental Biology and Medicine*, 69(2):279–282.
- Pulz, O. und Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6):635–648.
- Quesada, L. A., De Lustig, E. S., Marechal, L. R. und Belocopitow, E. (1976). Antitumor activity of paramylon on sarcoma-180 in mice. *Gann=Gan*, 67(3):455–459.

- Qureshi, A. A., Bradlow, B. A., Brace, L., Manganello, J., Peterson, D. M., Pearce, B. C., Wright, J. J. K., Gapor, A. und Elson, C. E. (1995). Response of hypercholesterolemic subjects to administration of tocotrienols. *Lipids*, 30(12):1171–1177.
- Ramos-Suárez, J. L. und Carreras, N. (2014). Use of microalgae residues for biogas production. *Chemical Engineering Journal*, 242:86–95.
- Raschka, A. und Carus, M. (2012). Stoffliche Nutzung von Biomasse – Basisdaten für Deutschland, Europa und die Welt. *F+E-Projekt aus dem Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Hürth 2012*.
- Ratcliffe, H. L. (1927). Mitosis and cell division in *Euglena spirogyra* Ehrenberg. *The Biological Bulletin*, 53(2):109–122.
- Rice, D. und Kennedy, S. (1988). Vitamin E: function and effects of deficiency. *British Veterinary Journal*, 144(5):482–496.
- Rieger, C. und Weiland, P. (2006). Prozessstörungen frühzeitig erkennen. *Biogas Journal*, 4(6):18–20.
- Rimbach, G., Minihane, A. M., Majewicz, J., Fischer, A., Pallauf, J., Virgli, F. und Weinberg, P. D. (2002). Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61(4):415–425.
- Ripplinger, P. (2009). Energy efficiency and economics of the production of microalgae biomass with a flat panel-airlift photobioreactor. *Präsentation, Subitec GmbH*.
- Rock, C. L., Jacob, R. A. und Bowen, P. E. (1996). Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, 96(7):693–702.
- Rodríguez-Zavala, J. S., Ortiz-Cruz, M. A., Mendoza-Hernández, G. und Moreno-Sánchez, R. (2010). Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *Journal of Applied Microbiology*, 109:2160–2172.
- Rosello Sastre, R. und Posten, C. (2010). Die vielfältige Anwendung von Mikroalgen als nachwachsende Rohstoffe. *Chemie Ingenieur Technik*, 82(11):1925–1939.
- Rosenberg, A., Pecker, M. und Moschides, E. (1965). Fatty acids in the pellicles and plastids of light-grown and dark-grown cells of *Euglena gracilis*. *Biochemistry*, 4:680–685.
- Round, F. E. (1973). The Biology of the Algae. *St. Martin's Press, New York*.

- Ruggeri, B. A., Gray, R. J. H., Watkins, T. R. und Tomlins, R. I. (1985). Effects of low-temperature acclimation and oxygen stress on tocopherol production in *Euglena gracilis* Z. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(6):1404–1408.
- Sahm, H. (1981). Biologie der Methan-Bildung. *Chemie Ingenieur Technik*, 53(11):854–863.
- Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R. G., Klauber, M. R., Schafer, K., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, J., Cotman, C. W., Pfeiffer, E., Schneider, L. S. und Thal, L. J. (1997). A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 336(17):1216–1222.
- Šantek, B., Felski, M., Friehs, K., Lotz, M. und Flaschel, E. (2009). Production of paramylon, a β -1,3-glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on a synthetic medium. *Engineering in Life Sciences*, 9:23–28.
- Šantek, B., Felski, M., Friehs, K., Lotz, M. und Flaschel, E. (2010). Production of paramylon, a β -1,3-glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on potato liquor. *Engineering in Life Sciences*, 10:165–170.
- Schattauer, A., Abdoun, E., Weiland, P., Plöchl, M. und Heiermann, M. (2011). Abundance of trace elements in demonstration biogas plants. *Biosystems Engineering*, 108(1):57–65.
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussnug, J. H., Posten, C., Kruse, O. und Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*, 1(1):20–43.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2):262–280.
- Scholwin, F., Liebetrau, J. und Edelmann, W. (2009). Biogaserzeugung und -nutzung. In: Kaltschmitt, M., Hartmann, H. und Hofbauer, H. (Hrsg.), *Energie aus Biomasse*, Seiten 851–931. Springer-Verlag, Heidelberg, Dordrecht, London & New York.
- Schwartzbach, S. D., Schiff, J. A. und Goldstein, N. H. (1975). Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts - V. Control of paramylon degradation. *Plant Physiology*, 56:313–317.
- Schwarzans, J.-P., Cholewa, D., Grimm, P., Beshay, U., Risse, J.-M., Friehs, K. und Flaschel, E. (2014). Dependency of the fatty acid composition of *Euglena gracilis* on growth phase and culture conditions. *Journal of Applied Phycology*, 27(4):1389–1399.

- Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J. und Smith, A. G. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3):277–286.
- Seide, H. (2014). Stellungnahme des Fachverbandes Biogas e.V. zu den Fragen zur Anhörung im Ausschuss für Landwirtschaft und Ernährung des Deutschen Bundestages am 19. Mai 2014. *Fachverband Biogas e.V.*
- Sen, C. K., Khanna, S. und Roy, S. (2006). Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. *Life Sciences*, 78(18):2088–2098.
- Senn, T. (2003). Die Produktion von Bioethanol als Treibstoff unter dem Aspekt der Energie. Kosten- und Ökobilanz. FVS Fachtagung. *University of Hohenheim, Germany.*
- Senn, T. und Lucà, S. F. (2002). Studie zur Bioethanolproduktion aus Getreide in Anlagen mit einer Jahres-Produktionskapazität von 2,5 und 9 Mio. Litern. *Erstellt im Auftrag von: Bundesverband landwirtschaftliche Rohstoffe verarbeitende Brennereien e.V. unter Beteiligung des Bundesverbandes Deutscher Kartoffelbrenner e.V.*
- Seyfried, C. F., Bode, H., Austermann-Haun, U., Brunner, G., von Hagel, G. und Kroiss, H. (1990). Anaerobe Verfahren zur Behandlung von Industrieabwässern. *Korrespondenz Abwasser*, 37(10):1247–1251.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J. und Roessler, P. (1998). A look back at the US Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. *National Renewable Energy Laboratory, Golden.*
- Shen, C. F. und Guiot, S. R. (1996). Long-term impact of dissolved O₂ on the activity of anaerobic granules. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(6):611–620.
- Sheppard, A. J., Pennington, J. A. T. und Weihrauch, J. L. (1992). Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods. In: Packer, L. und Fuchs, J. (Hrsg.), *Vitamin E in Health and Disease*, Seiten 9–31. *Marcel Dekker, New York.*
- Shigeoka, S., Onishi, T., Nakano, Y. und Kitaoka, S. (1986). The contents and subcellular distribution of tocopherols in *Euglena gracilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(4):1063–1065.
- Shklar, G. und Schwartz, J. (1993). Effects of vitamin E on oral carcinogenesis and oral cancer. In: Packer, L. und Fuchs, J. (Hrsg.), *Vitamin E in Health and Disease*, Seiten 497–511. *Marcel Dekker, New York.*

- Sialve, B., Bernet, N. und Olivier, B. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27:409–416.
- Simpson-Holley, M., Higson, A. und Evans, G. (2007). Bring on the biorefinery. *Institution of Chemical Engineers*, (795):46–48.
- Singh, N. K. und Dhar, D. W. (2011). Microalgae as second generation biofuel. a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(4):605–629.
- Slade, R. und Bauen, A. (2013). Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and Bioenergy*, 53:29–38.
- Slover, H. T. (1971). Tocopherols in foods and fats. *Lipids*, 6(5):291–296.
- Smith, P. H. und Mah, R. A. (1966). Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Applied Microbiology*, 14(3):368–371.
- Soltanian, S., Stuyven, E., Cox, E., Sorgeloos, P. und Bossier, P. (2009). β -Glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(2):109–138.
- Sommer, J. R. (1965). The ultrastructure of the pellicle complex of *Euglena gracilis*. *The Journal of Cell Biology*, 24(2):253–257.
- Sprott, G. D. und Patel, G. B. (1986). Ammonia toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 7(2):358–363.
- Stephens, E., Ross, I. L., King, Z., Mussnug, J. H., Kruse, O., Posten, C., Borowitzka, M. A. und Hankamer, B. (2010). An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. *Nature Biotechnology*, 28(2):126–128.
- Sugawara, I., Lee, K. C. und Wong, M. (1984). Schizophyllan (SPG)-treated macrophages and anti-tumor activities against syngeneic and allogeneic tumor cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 16(3):137–144.
- Sugiyama, A., Hata, S., Suzuki, K., Yoshida, E., Nakano, R., Mitra, S., Arashida, R., Asayama, Y., Yabuta, Y. und Takeuchi, T. (2010). Oral administration of paramylon, a β -1,3-D-glucan isolated from *Euglena gracilis* Z inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72:755–763.
- Suzaki, T. und Williamson, R. E. (1985). Euglenoid movement in *Euglena fusca*: evidence for sliding between pellicular strips. *Protoplasma*, 124(1–2):137–146.

- Suzaki, T. und Williamson, R. E. (1986). Cell surface displacement during euglenoid movement and its computer simulation. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 6(2):186–192.
- Switzenbaum, M. S., Giraldo-Gomez, E. und Hickey, R. F. (1990). Monitoring of the anaerobic methane fermentation process. *Enzyme and Microbial Technology*, 12(10):722–730.
- Symons, G. E. und Buswell, A. M. (1933). The methane fermentation of carbohydrates. *Journal of the American Chemical Society*, 55(5):2028–2036.
- Takashima, M., Speece, R. E. und Parkin, G. F. (1990). Mineral requirements for methane fermentation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 19(5):465–479.
- Taketomi, H., Soda, K. und Katsui, G. (1983). Results of screening test in tocopherols in microbial realm. *Vitamins (Japan)*, 57:133–138.
- Takeyama, H., Kanamaru, A., Yoshino, Y., Kakuta, H., Kawamura, Y. und Matsunaga, T. (1997). Production of antioxidant vitamins, β -carotene, vitamin C, and vitamin E, by two-step culture of *Euglena gracilis* Z. *Biotechnology and Bioengineering*, 53:185–190.
- Tani, Y. und Tsumura, H. (1989). Screening for tocopherol-producing microorganisms and α -tocopherol production by *Euglena gracilis* Z. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53:305–312.
- Tchobanoglous, G., Theisen, H. und Vigil, S. (1993). Integrated solid waste management: engineering principles and management issues. *McGraw-Hill Inc., New York*.
- Thauer, R. K., Jungermann, K. und Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41(1):100–180.
- Threlfall, D. R. und Goodwin, T. W. (1967). Nature, intracellular distribution and formation of terpenoid quinones in *Euglena gracilis*. *Biochemical Journal*, 103:573–588.
- Turpin, D. H. (1991). Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal of Phycology*, 27(1):14–20.
- Varel, V. H., Hashimoto, A. G. und Chen, Y. R. (1980). Effect of temperature and retention time on methane production from beef cattle waste. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(2):217–222.
- Varel, V. H., Chen, T. H. und Hashimoto, A. G. (1988). Thermophilic and mesophilic methane production from anaerobic degradation of the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Resources, Conservation and Recycling*, 1(1):19–26.

- VDI (2004). VDI 4630 - Vergärung organischer Stoffe. *Beuth Verlag GmbH, Berlin*.
- VDI (2014). VDI 6310 - Klassifikation und Gütekriterien von Bioraffinerien. *Beuth Verlag GmbH, Berlin*.
- Vergara-Fernández, A., Vargas, G., Alarcón, N. und Velasco, A. (2008). Evaluation of marine algae as a source of biogas in a two-stage anaerobic reactor system. *Biomass and Bioenergy*, 32(4):338–344.
- Vismara, R., Vestri, S., Kusmic, C., Barsanti, L. und Gualtieri, P. (2003). Natural vitamin E enrichment of *Artemia salina* fed freshwater and marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 15(1):75–80.
- Vogel, K. und Barber, A. A. (1968). Degradation of paramylon by *Euglena gracilis*. *Journal of Protozoology*, 15:657–662.
- von der Heyden, S., Chao, E. E., Vickerman, K. und Cavalier-Smith, T. (2004). Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomemid flagellates and the evolution of Euglenozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51(4):402–416.
- Wandrey, C. und Aivasidis, A. (1983). Zur Reaktionstechnik der anaeroben Fermentation. *Chemie Ingenieur Technik*, 55(7):516–524.
- Wang, L., Behr, S. R., Newman, R. K. und Newman, C. W. (1997). Comparative cholesterol-lowering effects of barley β -glucan and barley oil in golden Syrian hamsters. *Nutrition Research*, 17(1):77–88.
- Wang, Q., Kuninobu, M., Ogawa, H. I. und Kato, Y. (1999). Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*, 16(6):407–416.
- Weiland, P. (2008). Wichtige Messdaten für den Prozessablauf und Stand der Technik in der Praxis. *Gülsower Fachgespräche*, 27:17–31.
- Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4):849–860.
- Weiland, P. (2001). Grundlagen der Methangärung – Biologie und Substrate. *VDI-Berichte*, 1620:19–32.
- Whitman, W. B., Bowen, T. L. und Boone, D. R. (2006). The Methanogenic Bacteria. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. und Stackebrandt, E. (Hrsg.), *Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria*, Band III: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes, Seiten 165–207. *Springer, New York*.

- Wiegel, J. (1990). Temperature spans for growth: hypothesis and discussion. *FEMS Microbiology Letters*, 75(2):155–169.
- Wijffels, R. H. und Barbosa, M. J. (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science*, 329:796–799.
- Wijffels, R. H. (2008). Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 26(1):26–31.
- Wijffels, R. H., Kruse, O. und Hellingwerf, K. J. (2013). Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(3):405–413.
- Wiley, P. E., Campbell, J. E. und McKuin, B. (2011). Production of biodiesel and biogas from algae: a review of process train options. *Water Environment Research*, 83(4):326–338.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2):221–271.
- Woese, C. R., Kandler, O. und Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12):4576–4579.
- Wolken, J. (1961). *Euglena*: an experimental organism for biochemical and biophysical studies. *The Rutgers University Press, New Brunswick & New Jersey*.
- Wood, P. J. (1994). Evaluation of oat bran as a soluble fibre source. Characterization of oat β -glucan and its effects on glycaemic response. *Carbohydrate Polymers*, 25(4):331–336.
- Yamane, Y.-i., Utsunomiya, T., Watanabe, M. und Sasaki, K. (2001). Biomass production in mixotrophic culture of *Euglena gracilis* under acidic condition and its growth energetics. *Biotechnology Letters*, 23(15):1223–1228.
- Yamauchi, R. und Matsushita, S. (1979). Products formed by photosensitized oxidation of tocopherols. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43(10):2151–2156.
- Yen, H.-W. und Brune, D. E. (2007). Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*, 98(1):130–134.
- Zeeman, G., Wiegant, W. M., Koster-Treffers, M. E. und Lettinga, G. (1985). The influence of the total-ammonia concentration on the thermophilic digestion of cow manure. *Agricultural Wastes*, 14(1):19–35.

- Zeikus, J. G. (1983). Metabolism of one-carbon compounds by chemotrophic anaerobes. *Advances in Microbial Physiology*, 24:215–299.
- Zhang, B., He, P.-J., Lü, F., Shao, L.-M. und Wang, P. (2007). Extracellular enzyme activities during regulated hydrolysis of high-solid organic wastes. *Water Research*, 41(19):4468–4478.
- Zhong, W., Zhang, Z., Luo, Y., Qiao, W., Xiao, M. und Zhang, M. (2012). Biogas productivity by co-digesting Taihu blue algae with corn straw as an external carbon source. *Bioresource Technology*, 114:281–286.
- Zinder, S. H. (1993). Physiological Ecology of Methanogens. In: Ferry, J. G. (Hrsg.), *Methanogenesis - Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*, Seite 128–206. *Springer, New York*.
- Zitomer, D. H. und Shrout, J. D. (1998). Feasibility and benefits of methanogenesis under oxygen-limited conditions. *Waste Management*, 18(2):107–116.
- Zitomer, D. H. (1998). Stoichiometry of combined aerobic and methanogenic COD transformation. *Water Research*, 32(3):669–676.
- Zubr, J. (1986). Methanogenic fermentation of fresh and ensiled plant materials. *Biomass*, 11(3):159–171.

Abkürzungen, Symbole & Indizes

ATP	Adenosintriphosphat
C/N	Massenverhältnis von Kohlenstoff und Stickstoff
C/N/P/S	Massenverhältnis von Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor und Schwefel
<i>ddH₂O</i>	zweifach deionisiertes Wasser; Seralpurwasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
FOS	Flüchtige organische Säuren
FRB	Faulraumbelastung
GC	Gaschromatographie
het	heterotroph
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> ; Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
k. A.	keine Angabe
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
oTS	organische Trockensubstanz
<i>p. A.</i>	<i>pro analysi</i> ; für die Analyse
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> ; negativer, dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenaktivität
photaut	photoautotroph
photohet	photoheterotroph
pK _S	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
pO ₂	relative Sauerstoffsättigung
ppm	<i>parts per million</i> ; Teile von einer Million
Pr/Ac	Massenverhältnis von Propionat und Acetat
PTM	Paramylontrockenmasse
sp.	Spezies
vvm	Volumen pro Volumen pro Minute
<i>(v/v)</i>	<i>volume per volume</i> ; Volumen pro Volumen
<i>(w/w)</i>	<i>weight per weight</i> ; Masse pro Masse
16S-rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure der kleinen Ribosomenuntereinheit der Prokaryoten
18S-rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure der kleinen Ribosomenuntereinheit der Eukaryoten

Symbole

<i>c</i>	volumetrische Konzentration
<i>D</i>	Raumgeschwindigkeit
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung; $9,81 \text{ m s}^{-2}$
<i>G</i>	Gibbs'sche freie Energie; freie Enthalpie
<i>L</i>	Leistung; Produktivität; Raum-Zeit-Ausbeute
<i>n</i>	Anzahl
<i>S</i>	Selektivität; spezifische Konzentration
<i>t</i>	Zeit
<i>T</i>	Temperatur
<i>U</i>	<i>unit</i> ; Einheiten der Enzymaktivität
<i>X</i>	Biotrockenmassekonzentration
<i>Y</i>	Ausbeutekoeffizient
τ	Verweilzeit
μ	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
χ	Stoffmengenanteil
ω	Massenanteil
–	dimensionslos

Indizes

<i>α-Toc</i>	α -tocopherolbezogen
<i>Glc</i>	glucosebezogen
<i>hyd.</i>	hydraulisch
<i>m</i>	massebezogen
<i>max</i>	maximal
<i>oTS</i>	bezogen auf organische Trockensubstanz
<i>PTM</i>	paramylontrockenmassebezogen
<i>S</i>	substratbezogen
<i>th.</i>	theoretisch
<i>undiss.</i>	undissoziiert
<i>V</i>	volumenbezogen
<i>X</i>	biotrockenmassebezogen

Abbildungsverzeichnis

2.1	Beispiel eines möglichen Bioraffineriekonzeptes mit photoautotroph gewonnener <i>E. gracilis</i> -Biomasse zur Gewinnung von α -Tocopherol und Biogas	8
3.1	Morphologie einer <i>E. gracilis</i> -Zelle und ihrer Organellen	13
3.2	Allgemeine Strukturformel der Tocopherole	17
3.3	Lage, Aufbau und Struktur eines Paramylongranulums	23
3.4	Fließdiagramm der vierstufigen Biogasbildung	26
3.5	Relative Wachstumsgeschwindigkeiten von psychrophilen, mesophilen und thermophilen Methanogenen	29
3.6	Einfluss der Temperatur auf die Prozessdauer bei mesophilen und thermophilen Mikroorganismen	30
3.7	Protonierungsgleichgewicht von Kohlendioxid	32
3.8	Zusammenhang zwischen pH-Wert und Dissoziationsgrad der Essigsäure und Propionsäure	37
3.9	Zusammenhang zwischen pH-Wert und Dissoziationsgrad von Ammoniak	38
3.10	Einfluss der Substratkonzentration auf die hydraulische Verweilzeit in Abhängigkeit der Faulraumbelastung	39
3.11	Verhältnis von Methan zu Kohlenstoffdioxid beim Einsatz verschiedener Substrate in Abhängigkeit der mittleren Oxidationszahl der Kohlenstoffe	43
4.1	Emmissionsspektrum der PowerSuperFlux-LEDs	54
4.2	Fotografische Darstellung des Schrägblattrührers	61
4.3	Schematischer Aufbau der quasikontinuierlichen, sequenziell heterotrophen und photoheterotrophen Kultivierung im Rührkessel- und Blasensäulenphotobioreaktor	64
4.4	Emmissionsspektrum der Hagen Aqua-Glo T8-Leuchtstoffröhre	65
4.5	Emmissionsspektrum des Decostar-Halogenstrahlers	66
4.6	Fotografische Aufnahme des 25 L-Blasensäulenphotobioreaktors mit einer Mikroalgenkultur im Betrieb	67
4.7	Versuchsaufbau der kontinuierlichen Gärtesteinheit	70

5.1	Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von photoautotroph, photoheterotroph und heterotroph gewonnenen <i>E. gracilis</i> -Zellen	76
5.2	Verlauf der Biotrockenmassekonzentration und der Glucosekonzentration bei heterotropher, photoheterotropher und photoautotropher Kultivierung von <i>E. gracilis</i> im Schüttelkolben	77
5.3	Entwicklung der Paramylontrockenmassekonzentration und -selektivität bei heterotropher, photoheterotropher und photoautotropher Kultivierung von <i>E. gracilis</i> im Schüttelkolben	80
5.4	Entwicklung der α -Tocopherolkonzentration und -selektivität bei heterotropher, photoheterotropher und photoautotropher Kultivierung von <i>E. gracilis</i> im Schüttelkolben	83
5.5	pH-Wert, relativer Sauerstoffpartialdruck sowie Biotrockenmasse- und Substratkonzentration bei heterotropher Satzkultivierung von <i>E. gracilis</i> im Rührkesselreaktor	88
5.6	Verlauf der Biotrockenmasse- und Paramylontrockenmassekonzentration, Paramylonselektivität sowie α -Tocopherolkonzentration und -selektivität bei heterotropher Satzkultivierung von <i>E. gracilis</i> im Rührkesselreaktor . .	89
5.7	pH-Wert und relativer Sauerstoffpartialdruck bei heterotropher, quasikontinuierlicher Kultivierung von <i>E. gracilis</i> im Rührkesselreaktor	96
5.8	Verlauf der Biotrockenmassekonzentration, Paramylontrockenmassekonzentration, Paramylonselektivität und Glucosekonzentration bei heterotropher, quasikontinuierlicher Kultivierung von <i>E. gracilis</i> im Rührkesselreaktor . .	97
5.9	Zusammenhang zwischen Biotrockenmassekonzentration und Raumgeschwindigkeit bzw. Substratkonzentration und Raumgeschwindigkeit	100
5.10	Zusammenhang zwischen Paramylontrockenmassekonzentration und Raumgeschwindigkeit bzw. Paramylonselektivität und Raumgeschwindigkeit . . .	101
5.11	Verlauf der α -Tocopherolkonzentration und -selektivität bei heterotropher, quasikontinuierlicher Kultivierung von <i>E. gracilis</i> im Rührkesselreaktor . .	102
5.12	Zusammenhang zwischen α -Tocopherolkonzentration und Raumgeschwindigkeit bzw. α -Tocopherolselektivität und Raumgeschwindigkeit	103
5.13	Ausbeutekoeffizienten in Bezug auf Biotrockenmasse und Paramylontrockenmasse bei heterotropher, quasikontinuierlicher Kultivierung von <i>E. gracilis</i> im Rührkesselreaktor	105

5.14	Verlauf der Raumgeschwindigkeit, des pH-Wertes, des relativen Sauerstoffpartialdrucks, der Glucose-, Biotrockenmasse- und Paramylontrockenmassekonzentration sowie der α -Tocopherolkonzentration und -selektivität bei quasikontinuierlicher, heterotropher Kultivierung von <i>E. gracilis</i> -Zellen im Rührkesselreaktor	111
5.15	Fotografische Aufnahme des Vierfach-Blasensäulenphotobioreaktors mit einer <i>E. gracilis</i> -Kultur im Betrieb	114
5.16	Zusammenhang zwischen Biotrockenmassekonzentration und mittlerer Verweilzeit bzw. Substratkonzentration und mittlerer Verweilzeit bei sequenziell heterotropher und photoheterotropher Kultivierung	115
5.17	Zusammenhang zwischen Paramylonselektivität und mittlerer Verweilzeit bzw. Paramylontrockenmassekonzentration und mittlerer Verweilzeit bei sequenziell heterotropher und photoheterotropher Kultivierung	116
5.18	Zusammenhang zwischen α -Tocopherolselektivität und mittlerer Verweilzeit bzw. α -Tocopherolkonzentration und mittlerer Verweilzeit bei sequenziell heterotropher und photoheterotropher Kultivierung	117
5.19	Verlauf der Biotrockenmassekonzentration bei photoautotropher, repetitiver Satzkultivierung von <i>E. gracilis</i> im Blasensäulenphotobioreaktor	123
5.20	Biogasbildung von photoheterotroph, heterotroph und photoautotroph gewonnener <i>E. gracilis</i> -Biomasse als Substrat für die Biogasgewinnung in Bezug auf den Erntezeitpunkt	129
5.21	pH- und Redoxprofil, kumulierter Biogas- sowie Methanertrag, Methan- gehalt und Gasvolumenstrom bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnener <i>E. gracilis</i> -Biomasse als Substrat	147
5.22	Volumenbezogene und spezifische Produktivität bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnener <i>E. gracilis</i> -Biomasse als Substrat	149
5.23	Verlauf der Konzentration der Essigsäureäquivalenz, der Ammoniumstickstoff- und der Ammoniakkonzentration bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnener <i>E. gracilis</i> -Biomasse als Substrat	150
5.24	Verläufe der Konzentrationen von Acetat, Propionat, Isobutyrat, n-Butyrat, Isovaleriat und n-Valeriat bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnener <i>E. gracilis</i> -Biomasse als Substrat	153
5.25	Verlauf des Propionat-zu-Acetat-Verhältnisses bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnener <i>E. gracilis</i> -Biomasse	154

5.26	pH- und Redoxprofil, kumulierter Biogas- sowie Methanertrag, Methan- gehalt und Gasvolumenstrom bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnenem <i>E. gracilis</i> -Lyophilisat nach α -Tocopherolex- traktion	157
5.27	Volumenbezogene Produktivität und spezifische Produktivität bei konti- nuierlicher Biogasgewinnung mit photoautotroph gewonnenem <i>E. gracilis</i> - Lyophilisat nach α -Tocopherolextraktion	160
5.28	Verlauf der Konzentration der Essigsäureäquivalenz sowie der Ammonium- stickstoff- und der Ammoniakkonzentration bei kontinuierlicher Biogas- gewinnung mit photoautotroph gewonnenem <i>E. gracilis</i> -Lyophilisat nach α -Tocopherolextraktion	162
5.29	Verläufe der Konzentrationen von Acetat, Propionat, Isobutyrat, n-Butyrat, Isovaleriat und n-Valeriat bei kontinuierlicher Biogasgewinnung mit photo- autotroph gewonnenem <i>E. gracilis</i> -Lyophilisat nach α -Tocopherolextraktion	164
5.30	Verlauf des Propionat-zu-Acetat-Verhältnisses bei kontinuierlicher Biogas- gewinnung mit photoautotroph gewonnenem <i>E. gracilis</i> -Lyophilisat nach α -Tocopherolextraktion	165

Tabellenverzeichnis

3.1	Relative Aktivitäten der Tocopherole und Tocotrienole	17
3.2	Spezifische α -Tocopherolkonzentrationen einiger Produkte	20
3.3	Standard Gibbs'sche freie Energien definierter Zustände im Abbau von Glucose zu Methan	28
3.4	Benötigte Konzentrationen an Spurenelementen für anaerobe Prozesse . . .	35
3.5	Theoretischer Biogasertrag und Gaszusammensetzung beim Einsatz von Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten als Substrat	42
3.6	Biogas- bzw. Methanerträge einiger Mikroalgenpezies	48
3.7	Elementare Zusammensetzungen und C/N-Verhältnisse einiger Mikroalgen- spezies	49
4.1	Zusammensetzung des Basalmediums nach Cramer & Myers (1952)	52
4.2	Zusammensetzung des EG5.1-Mediums	53
5.1	Tabellarische Darstellung der volumetrischen Produktivitäten in Bezug auf Biotrockenmasse bei heterotropher, photoheterotropher und photoautotro- pher satzweiser Kultivierung von <i>E. gracilis</i> im Schüttelkolben	79
5.2	Tabellarische Darstellung der volumetrischen Produktivitäten in Bezug auf Paramylontrockenmasse bei heterotropher, photoheterotropher und photoautotropher, satzweiser Kultivierung von <i>E. gracilis</i> im Schüttelkolben	82
5.3	Tabellarische Darstellung der volumetrischen Produktivitäten in Bezug auf α -Tocopherol bei heterotropher, photoheterotropher und photoautotropher satzweiser Kultivierung von <i>E. gracilis</i> im Schüttelkolben	85
5.4	Tabellarische Darstellung der volumetrischen Produktivitäten in Bezug auf Biotrockenmasse-, Paramylontrockenmasse- und α -Tocopherolkonzentration sowie der Ausbeutekoeffizienten bei heterotropher, satzweiser Kultivierung von <i>E. gracilis</i> im Rührkesselreaktor	91
5.5	Tabellarische Darstellung der Biotrockenmassekonzentration und -produkti- vität, der Glucosekonzentration sowie der Konzentrationen und Produkti- vitäten in Bezug auf die Produkte Paramylon und α -Tocopherol für ver- schiedene Raumgeschwindigkeiten	104

5.6	Tabellarische Gegenüberstellung der Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen sowie Produktivitäten in Bezug auf die Biotrockenmasse und die Produkte α -Tocopherol und Paramylon für die heterotrophe und die photoheterotrophe Stufe	118
5.7	Mittelwerte der Biotrockenmasse-, Substrat-, und Paramylonkonzentration sowie Ausbeutekoeffizienten in Bezug auf die Biotrockenmasse und das Produkt Paramylon für die heterotrophe und die photoheterotrophe Stufe .	119
5.8	Tabellarische Gegenüberstellung der Biotrockenmasseproduktivität sowie α -Tocopherolkonzentration, -selektivität und -produktivität für jeden Zyklus bei photoautotropher repetitiver Satzkultivierung	124
5.9	Vergleich des Biogasertrags, Methangehalts und Methanertrags von heterotroph, photoheterotroph und photoautotroph gewonnener <i>E. gracilis</i> -Biomasse als Substrat für die Biogasgewinnung	130
5.10	Vergleich der Biogaserträge, Methangehalte und Methanerträge der extrahierten und nicht extrahierten <i>E. gracilis</i> -Biomasse als Substrat für die Biogasgewinnung	134
5.11	Elementare Zusammensetzung von heterotroph, photoheterotroph und photoautotroph gewonnenen, sieben Tage alten, lyophilisierten <i>E. gracilis</i> -Biomassen in Bezug auf die Elemente C, H, O, N, P und S	139
5.12	Theoretische Methan- und Kohlenstoffdioxidgehalte, Methan- und Biogaserträge sowie C/N-Verhältnisse von heterotroph, photoheterotroph und photoautotroph gewonnenen, sieben Tage alten <i>E. gracilis</i> -Biomassen . . .	141
5.13	Spezifische Konzentrationen der Spurenelemente von heterotroph, photoheterotroph und photoautotroph gewonnenen, lyophilisierten <i>E. gracilis</i> -Biomassen	142
5.14	Täglich zugeführte Substratmasse in Bezug auf die organische Trockensubstanz, die Volumina des Klärschlammüberstands und die hydraulischen Verweilzeiten bei den jeweiligen Faulraumbelastungen	156

Publikationen

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Grimm, P., Risse, J.-M., Cholewa, D., Müller, J. M., Beshay, U., Friehs, K. und Flaschel, E. (2015). Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of α -Tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion. *Journal of Biotechnology*, 215:72–79.

Schwarzahns, J.-P., Cholewa, D., Grimm, P., Beshay, U., Risse, J.-M., Friehs, K. und Flaschel, E. (2014). Dependency of the fatty acid composition of *Euglena gracilis* on growth phase and culture conditions. *Journal of Applied Phycology*, 27(4):1389–1399.

Blifernez-Klassen, O., Klassen, V., Doebbe, D., Kersting, K., Grimm, P., Wobbe, L. und Kruse, O. (2012). Cellulose degradation and assimilation by the unicellular phototrophic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature Communications*, 3:1214.

Posterbeiträge

Grimm, P., Risse, J.-M., Cholewa, D. und Flaschel, E. (2013). Produktion von α -Tocopherol mit dem photosynthetisch aktiven Einzeller *Euglena gracilis* und Verwertung der Restbiomasse als Substrat für Biogasreaktoren. Präsentiert auf Himmelfahrtstagung der DECHEMA e.V. in Bad Wildungen.

Grimm, P., Mouileh, O., Risse, J.-M., Cholewa, D. und Flaschel, E. (2013). Kontinuierliche Biogasproduktion mit *Euglena gracilis* als Substrat und die Gewinnung des Hochwertproduktes α -Tocopherol. Präsentiert auf dem 6. Bundesalgenstammtisch der DECHEMA e.V. in Hamburg.

Grimm, P., Rositzka, L., Cholewa, D., Risse, J.-M., Beshay, U. und Flaschel, E. (2012). Gewinnung und Nutzung von Paramylon und α -Tocopherol aus *Euglena gracilis*. Präsentiert auf dem 5. Bundesalgenstammtisch der DECHEMA e.V. in München-Pullach.

Grimm, P., Homburg, V., Cholewa, D., Risse, J.-M. und Flaschel, E. (2012). Increase of α -Tocopherol production by illumination of previously heterotrophically grown *Euglena gracilis* cells and their use in biorefinery concepts. Präsentiert auf der 30. Jahrestagung der Biotechnologen in Karlsruhe.

Grimm, P. (2011). Making renewable energies economical: Producing biogas and vitamin E with phototrophic microorganisms. Präsentiert auf der [science fair] der Universität Bielefeld.

Grimm, P., Cholewa, D., Schwarzthans, J.-P., Beshay, U., Risse, J.-M. und Flaschel, E. (2011). Biogas production as a final step of a biorefinery concept using *Euglena gracilis* and *Arthrospira platensis* biomass. Präsentiert auf dem 1st European Congress of Applied Biotechnology (ECAB) in Berlin.

Grimm, P., Cholewa, D., Beshay, U., Risse, J.-M. und Flaschel, E. (2011). Biomasse des photosynthetisch aktiven Einzellers *Euglena gracilis* als Basis für Hochwertprodukte und Bioenergie: Ein Bioraffineriekonzept. Präsentiert auf dem 4. Bundesalgenstammtisch der DECHEMA e.V. in Hamburg

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und nur die aufgeführten Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Alle vollständig oder teilweise aus der Literatur entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet worden. Diese Arbeit wurde weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Bielefeld, den 8. Februar 2016

Unterschrift

