

Ein Bioraffineriekonzept mit
Euglena gracilis

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
doctor rerum naturalium
in der Wissenschaftsdisziplin Molekulare Biotechnologie

eingereicht an der
Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld

von
Dominik Cholewa
aus Hindenburg

Gutachter/in:

1. Professor Dr. Karl Friehs
2. Professor Dr. Anant Patel

Abgabedatum:

08.03.2016

*„Die Zukunft hat viele Namen:
Für Schwache ist sie das Unerreichbare, für die Furchtsamen das Unbekannte,
für die Mutigen die Chance“*

Victor Hugo (1802 - 1885)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Fermentationstechnik an der technischen Fakultät der Universität Bielefeld angefertigt.

Für die vielen Hilfestellungen und Unterstützungen möchte ich mich im Folgenden bedanken.

Zunächst hätte ich gern nochmal die Chance bekommen, mich bei Herrn Prof. Dr. Erwin Flaschel zu bedanken, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen. Ich konnte mich stets auf Seine Unterstützung und Beratung mit einem schier unendlichen Wissen verlassen, wobei der Humor niemals zu kurz kam. Ich kann leider nur mit großem Bedauern diese Danksagung als Nachruf an Ihn richten.

Professor Karl Friehs möchte ich herzlich dafür danken, dass er mich sowie unsere Arbeitsgruppe aufgefangen hat und mir nun als Erstgutachter dieser Arbeit die Ehre erweist. Er hat immer ein offenes Ohr für mich für alle Belange des Lebens – mit Herz und Verstand.

Herrn Professor Patel danke ich vielmals, dass Er als Zweitgutachter diese Arbeit bewertet.

Ganz besonderer Dank gilt Dr. Joe-Max Risse für die Betreuung in meiner Doktorandenzeit. Er hat mir bei allen Fragen und Problemen des täglichen Doktorandenlebens mit Index von A bis Z geholfen, mich bei der praktischen Durchführung immer hervorragend beraten sowie unterstützt und notfalls aus den wissenschaftlichen Wolken geholt. Von Joe durfte ich vieles lernen, was zwischen den Zeilen einer wissenschaftlichen Arbeit steckt und stecken soll. Durch die vorgefallenen Umstände während der Promotion wurde er zu meinem geheimen Doktorvater. Vielen lieben Dank Joe.

Ebenfalls danke ich dem Herr über die Geräte Dipl.-Ing. Thomas Schäffer für seine unermüdlige Hilfsbereitschaft in technischen Fragen, praktischen Umsetzungen und so vielen Details, die den Labortagesverlauf reibungsloser gestalten. Auch Lothar Fallak, Heinrich Klassen, Thorsten Cord und meinem Vater danke ich für die Hilfe bei der technischen Umsetzung.

Unseren technischen Assistenten Galina, Kirsten und Ebson danke ich für das angenehme „Extra“ und die Spitznamen zwischen dem „Stickstoff holen“ und dem Spüldienst.

Meinem wissenschaftlichen Mitstreiter, verlässlichen Kollegen und guten Freund Philipp Grimm danke ich für die vielen stets angenehmen Stunden durch dick und dünn. Bei dem gesamten Team der Fermentationstechnik sowie allen Doktoranden, Masteranden, Projektanden und Bacheloranden bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und jegliche Unterstützung.

Mein innigster Dank gilt meiner Frau Sibylle – einfach für Alles. Auch meinen Jungs, Eltern und meiner Schwester sowie Familie möchte ich danken, dass sie immer für mich da waren.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Zielsetzung.....	2
2. Theorie.....	3
2.1 Nachwachsende Rohstoff-Verwertung: derzeitiger Stand in Deutschland	3
2.2 Mikroalgen und potentielle Produkte	5
2.3 Produktionsanlagen für Mikroalgenbiomasse: Typ, Vor- und Nachteile.....	8
2.4 <i>Euglena gracilis</i>	11
2.5 Ein Bioraffineriekonzept mit <i>E. gracilis</i>	13
2.6 Potentielle Produkte aus <i>E. gracilis</i>	14
2.6.1. α -Tocopherol.....	15
2.6.2. α -Tocopherol aus <i>E. gracilis</i> und der potentielle Markt.....	16
2.6.3. Paramylon	18
2.6.4. Paramylon aus <i>E. gracilis</i> und der (potentielle) Markt	19
2.6.5. Lipide/Fettsäuren	21
2.6.6. Lipide/Fettsäuren aus <i>E. gracilis</i> und der (potentielle) Markt	21
2.6.7. Weitere potentielle Hochwertprodukte.....	24
2.7 Die Nutzung schwefelbelasteter Rauchgase als Kohlenstoffquelle mit Hilfe der extremophilen Mikroalge <i>Galdieria sulphuraria</i>	25
3. Material und Methoden	28
3.1 Stammhaltung.....	28
3.2 Schüttelkolbenkultivierung	29
3.3 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration.....	32
3.4 Extraktion und Bestimmung der Tocopherolkonzentration	32
3.5 Bestimmung der Biotinkonzentration.....	34
3.6 Qualitative und quantitative Bestimmung der Pigmente	34
3.7 Bestimmung von Stoffen/Substraten mittels des Hach-Lange Tests	35
3.8 Bestimmung von Zuckern, Alkoholen und org. Säuren.....	36
3.9 Bestimmung der Paramylonkonzentration.....	36
3.10 Bestimmung der Viabilität	37
3.11 Lipidextraktion und Fettsäuren-Derivatisierung zu FAME.....	37
3.11.1. Lipidextraktion.....	37
3.11.2. Derivatisierung von Fettsäuren zu FAME	39
3.12 Gaschromatographie: Quantifizierung von FAME	39
3.13 Zellaufschluss durch das Gefrier-Tau-Verfahren	43
3.14 Extraktion und Analytik von Phycocyanin	44
3.15 SDS-PAGE-Analytik und Gel-Färbung mit colloidalem Coomassie	45

3.16 Bestimmung des Biogasertrages	46
4. Ergebnisse und Diskussion	48
4.1 Konstruktion relevanter Geräte	48
4.1.1. Illumination von Schüttelkolbenkulturen	49
4.1.2. Illuminationsaufsätze für Orbitalschüttler.....	51
4.1.3. CO ₂ -Brutschrank.....	54
4.1.4. Intern illuminiertes Blasensäulenphotobioreaktor.....	55
4.1.5. Flachplatten- <i>airlift</i> Photobioreaktor.....	57
4.1.6. Lichtsensor	62
4.1.7. Zell-Absetzer	63
4.1.8. Studie zum Freiland-Bioreaktormodul	64
4.2 Die optische Beurteilung von <i>E. gracilis</i>	69
4.3 Grundlegende Wachstumseigenschaften von <i>E. gracilis</i>	74
4.3.1 Schichtdickenabhängige Zellkulturdichte von <i>E. gracilis</i>	74
4.3.2 Korrelation von Biotrockenmassekonzentration und der Lichtabsorption bei 540 nm	75
4.3.3 Charakterisierung des Wachstums von <i>E. gracilis</i> mit dem CRAMER- MYERS(CM)-Medium	76
4.3.4 Steigerung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit	79
4.4 Entwicklung eines Prozessmediums	81
4.4.1 Entwicklung des EG-Mediums für <i>E. gracilis</i>	82
4.4.2 Vergleich von EG2-, EG5.1- und CM-Medium mit verschiedenen Lichtquellen	85
4.4.3 Mathematische Optimierung des EG2-Mediums nach der <i>surface</i> <i>response</i> -Methode.....	87
4.4.4 Vergleich vom EG5.1- und EG6-Medium und Senkung der Vitamin B ₁₂ - Konzentration	93
4.5 Photoautotrophe Kultivierungen von <i>E. gracilis</i> in Schüttelkolben bei verschiedenen Lichtflüssen und konstanten Schichtdicken im EG5.1-Medium...	98
4.5.1 Biotrockenmassekonzentration	98
4.5.2 α -Tocopherol	100
4.5.3 Paramylon	103
4.5.4 Lipide und Fettsäuren	107
4.6 Partielle Charakterisierung von photoheterotroph und heterotroph gewachsenen <i>E. gracilis</i> -Kulturen.....	117
4.6.1 Photoheterotroph und heterotroph gewonnene Biomasse und Lipide	118
4.6.2 Fettsäurespektren von photoheterotrophen und heterotrophen <i>E.</i> <i>gracilis</i>	124

4.7	Photoautotrophe Satzkultivierungen mit <i>E. gracilis</i> im Flachplattenbioreaktor und der Einfluss des Gasvolumenstromes	131
4.8	Photoautotrophe kontinuierliche Kultivierungen im Flachplattenreaktor.....	137
4.9	Kultivierungen mit circadianem Rhythmus.....	143
4.9.1	Satzkultivierungen mit circadianem Rhythmus 14:10 h	144
4.9.2	Repetitive Satzkultivierungen von <i>E. gracilis</i> mit circadianem Rhythmus und angepassten Erntezyklen – <i>repeated batch</i>	152
4.10	<i>Upstream</i>	160
4.10.1	Sanitisierung von Photobioreaktoren	160
4.11	<i>Downstream</i>	166
4.11.1	Flotation.....	166
4.11.2	Flokkulation.....	167
4.11.3	Sedimentation.....	171
4.11.4	Sedimentationssäule.....	174
4.11.5	Zellabsetzer	177
4.12	Produkthomogenität und -heterogenität	180
4.13	Weitere potentielle Produkte aus <i>E. gracilis</i>	182
4.14	Kultivierungen von <i>Galdieria sulphuraria</i> und die Extraktion von Phycocyanin	184
4.15	Hochrechnungen für das Bioraffineriekonzeptes mit <i>E. gracilis</i>	194
5.	Zusammenfassung	199
5.1	Ausblick	200
6.	Quellen.....	202
7.	Anhang	227
7.1	Instationäre kontinuierliche Kultivierung von <i>E. gracilis</i> im Flachplatten- <i>airlift</i> – Photobioreaktor.....	227
7.2	Zusammensetzung der Rohglycerinqualitäten und des entsprechend modifizierten Ford-Mediums.....	228
7.3	Abmessungen konstruierter Geräte.....	232
7.3.1	Flachplatten- <i>airlift</i> -Photobioreaktor	232
7.3.2	Intern illuminiertes Blasensäulenreaktor	233
7.3.3	Zellabsetzer	236

Abkürzungen

AD	Außendurchmesser
ALA	α -Linolensäure, C18:3n3, eine ω 3-Fettsäure
ATPE	Wässrige Zweiphasen-Extraktion, <i>aqueous two phase extraction</i>
APC	Allophycocyanin
B-4-F	Biotin-4-Fluorescein
C-PC	C-Phycocyanin
CM	Cramer-Myers
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser (dH ₂ O gereinigt mit einer Reinstwasseranlage)
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser, auch Vollentmineralisiertes Wasser (VE)
DHA	Docosahexaensäure, C22:6n3, eine ω 3-Fettsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, ein Komplexbildner
EPA	Eicosapentaensäure, C20:5n3, eine ω 3-Fettsäure
FAME	Fettsäuremethylester, <i>fatty acid methyl ester/s</i>
GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose Monohydrat, auch: Glucose \times H ₂ O
GMP	<i>Good manufacturing practise</i> , Richtlinien zur pharmazeutischen Produktion
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie, <i>high performance liquid chromatography</i>
ID	Innendurchmesser
kDa	Kilo Dalton, atomare Masseneinheit Dalton mit Vorsatz, 1 kDa = 1000 Da
LED	Licht-emittierende Diode/n
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i> , Ausschlussgrenze einer Ultrafiltrationsmembran
N	Stichprobenmenge, Anzahl der Replikate
ω 3	Omega 3 Fettsäure/n, (eine) Fettsäure/n mit drei ungesättigten Bindungen
PAR	Photosynthetisch aktive Strahlung, <i>photosynthetically active radiation</i>
PES	Polyethersulfon, Kunststoff
PMMA	Polymethylmethacrylat, Kunststoff, auch: Plexiglas
PTFE	Polytetrafluorethylen, Kunststoff, bekannt unter dem Handelsnamen Teflon®
PVDF	Polyvinylidenfluorid, Kunststoff
PP	Proteosepepton
ppm	Teilchen je 1 Million Teilchen, <i>parts per million</i>
redVit	reduzierte Cyanocobalamin-Konzentration
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung, auch: rcf
RT	Raumtemperatur, hier: 22 bis 24 °C
scCO ₂	Überkritisches Kohlenstoffdioxide, <i>supercritical carbon dioxide</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
TAG	Triacylglyceride
TOC	Total organischer Kohlenstoff
TRF	Theoretischer Response Faktor
v/v	Volumen auf Volumen bei prozentualen Angaben
vvm	Volumen (Gas) je Volumen (Medium) und Minute in L L ⁻¹ min ⁻¹
w/w	Gewicht auf Gewicht bei prozentualen Angaben

Größen

X	Biomassekonzentration
I	Lichtfluss, ggf. wiedergegeben als Spannung der Photodiode
c	Konzentration
$c_{\text{spezif.}}$	Spezifische Konzentration, i.d.R. bezogen auf die Biotrockenmassekonzentration
D	Raumgeschwindigkeit bzw. Verdünnungsgeschwindigkeit
L	Produktivität
μ	Wachstumsgeschwindigkeit
P_{LV}	durchschnittliche volumetrische Lipidproduktivität
T	Temperatur
\dot{V}	Volumenfluss bzw Volumenstrom
Y	Ausbeute

Indices

abends	Meßzeit erfolgte im Tag/Nacht Rhythmus
APC	Allophycocyanin
BTM	Biotrockenmassekonzentration
C-PC	C-Phycocyanin
<i>offline</i>	Signal durch Sensor außerhalb des Reaktor, i.d.R. nach d. Probenahme
<i>online</i>	Signal durch Sensor am Reaktor verbaut
trans	Signal vom Licht, welches durch die Kulturbrühe zur Photodiode dringt
trans.mitte	Signal vom Licht, welches durch die Kulturbrühe zur Photodiode in der Mitte des Reaktors bezogen auf die Schichtdicke dringt

1. Einleitung

„Das Ölzeitalter wird ebenso wenig am Mangel von Öl scheitern, wie die Steinzeit aus Mangel an Steinen zu Ende gegangen sei“ [Altwater 2007]. Was auch immer die ursprüngliche Intention dieser Behauptung war, im gewissen Sinne wird diese Aussage zunehmend zur Realität. Denn obwohl die Prognosen von Marion King Hubbert vom *peak oil*, dem globalen Ölfördermaximum durch neue Fördertechnologien von 1995 auf das Jahr 2020 bis 2030 verschoben wurden [Hubbert 1974], ist in Zeiten von nachgewiesenem Klimawandel und einer zunehmend ablehnenden Haltung gegenüber Atomkraft eine Wandlung der Ökonomie notwendig geworden [Stephens *et al.*, 2010]. Dabei kommen auch immer wieder Bioraffineriekonzepte ins Gespräch [Taylor 2008]. Hierbei sollen nachwachsende Rohstoffe, möglichst umweltschonend, durch chemische Verfahren oder mit Hilfe von Mikroorganismen in hochwertigere Produkte umgewandelt werden. Damit wird das „Klimakiller-Gas“ CO₂ zum Substrat für den Biomasseaufbau und verhindert zugleich den Ausstoß weiteren Kohlenstoffs aus fossilen Quellen – es entsteht ein CO₂-Kreislauf. Die daraus gewonnenen Produkte sind sehr breiter Natur und erstrecken sich von Feinchemikalien über Brennstoffe, Düngemittel, Futtermittel oder auch Nahrungsergänzungsmittel für den menschlichen Verzehr [Rosello Sastre und Posten, 2010; Taylor 2008]. Allerdings gibt es bei der Verwendung von Pflanzen in solchen Bioraffineriesystemen einen großen Nachteil. Auf Grund der immer schneller wachsenden Erdbevölkerung nimmt der Anteil an Ackerfläche pro Kopf immer mehr ab. Weiterhin benötigen Pflanzen zum Wachsen relativ viel Wasser, z.B. benötigt man zur Produktion von 9 Tonnen Mais pro Hektar etwa 7 Millionen Liter Wasser [Pimentel *et al.*, 2009]. Unlängst ist jedoch auch klar, dass Wasser in Zukunft zum kostbaren Gut wird und sich der Umgang damit drastisch ändern muss [Schiermeier 2014]. Um den Wasserverbrauch zu begrenzen werden immer wieder Mikroalgen zur Nutzung in Bioraffineriekonzepten vorgeschlagen [Benemann 2013; Demirbas 2010; Morweiser *et al.*, 2010]. Vergleichsweise benötigt die Produktion von einem Liter Biodiesel aus ölhaltigen Pflanzen etwa 3000 Liter Wasser, wogegen für einen Liter Biodiesel aus Mikroalgen nur etwa 20 Liter Wasser benötigt werden. Hierbei wurden Verdunstungseffekte nicht einbezogen [Fraiture *et al.*, 2008; Schlagermann *et al.*, 2012]. Weiterhin können Mikroalgen zwischen 20 % - 80 % ihrer Trockenmasse an Lipiden enthalten [Schenk *et al.*, 2008], während Pflanzen maximal 5 % enthalten [Schlagermann *et al.*, 2012]. Allein in Hinsicht auf die Biodieselproduktion der Zukunft erscheinen Mikroalgen bei derzeitigem Stand der Technik ein alternativloses Substrat darzustellen [Chisti 2007]. Dabei werden derzeit von den weit über 25.000 existierenden Mikroalgenspezies nur etwa 15 Stämme industriell verwendet. Im Jahr 2004 lag die globale Algenbiotrockenmasseproduktion noch bei rund 5.000 Tonnen mit einem Umsatz von 1,2 Mrd. US\$ - für 2013 wurde die Gesamtproduktion auf 15.000 t beziffert. Ein Großteil der er-

zeugten Biomasse wird zur Herstellung von Hochwertprodukten im Bereich $>10.000 \text{ US\$ t}^{-1}$ eingesetzt. Es ist jedoch zu beobachten, dass der Anteil an Niedrigwertprodukten im Bereich $1.000 \text{ US\$ t}^{-1}$ zunehmend größer wird [Benemann 2013; Pulz und Gross, 2004; Raja *et al.*, 2008; Spolare *et al.*, 2006]. Bei den Produkten aus Algen sind Feinchemikalien wie Vitamine, Pigmente, Fettsäuren und Polysaccharide zu finden, wobei auch verschiedene Algenextrakte für die Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie Einsatz finden. Zunehmend finden bestimmte Stoffklassen auch Einzug in die Medizin mit Präparaten gegen *Herpes simplex*, AIDS und weitere Krankheitsbilder [Raja *et al.*, 2008; Spolare *et al.*, 2006]. In den letzten Dekaden fokussiert sich die Forschung auch auf die Herstellung von Plattformchemikalien wie Bioethanol, -methan, -diesel und -wasserstoff [Benemann 2013; Chisti 2007]. Den aktuellen Stand der Technik spiegelt beispielsweise die US-Firma Algenol LCA mit Produktionsstätten in Mexico gut wieder, wo im Jahr 2014 erstmalig eine Gallone ($\sim 3,8 \text{ L}$) Biokraftstoff für $1,27 \text{ US\$}$ produziert wurde, also rund $0,31 \text{ € L}^{-1}$ (Kurs vom 01.02.2016) [Perkins, 2014]. Allerdings erfolgt die Produktion mit Hilfe einer gentechnisch veränderten Mikroalge in Folien-Photobioreaktoren, welche in dieser technischen Ausführung aufgrund einer möglichen gentechnischen Gefährdung nicht in Europa praktikabel wären. Generell wäre es in vielerlei Hinsicht zielführend nicht unbedingt auf gentechnisch modifizierte Mikroalgen zurückzugreifen und eine ganzheitliche Nutzung der erzeugten Biomasse anzustreben. Dabei wäre es sinnvoll eine Mikroalge zu nutzen, die hauptsächlich aus wenigen verwendbaren Stoffgruppen in abundanten Mengen besteht. Eine klassische Zusammensetzung wären hierbei Lipide, Kohlenhydrate und Proteine [Becker 1994]. Durch eine solche Wertschöpfungskette ergäbe sich eine höhere Wirtschaftlichkeit. Unlängst haben verschiedene Regierungen und Institutionen diese Erfordernis erkannt und mit mehr oder weniger restriktiven Umweltauflagen *roadmaps* oder Positionspapiere wie die Strategie der BRD mit der BioÖkonomie 2030 veröffentlicht und dem Bereich Mikroalgen viel Potential zugesprochen [BMBF 2010; IEA 2011; USDOE 2010].

1.1 Zielsetzung

Es sollte ein Bioraffineriekonzept auf Basis von Mikroalgen entwickelt werden, mit dem möglichst flexibel mehrere derzeit aus Erdöl gewonnen Produkte simultan hergestellt werden könnten. Im Sinne einer nachhaltigen und ressourcenschonenden Herstellung wurde ein Gesamtkonzept angestrebt, dass mit Hilfe von Sonnenenergie und CO_2 als Kohlenstoffquelle umgesetzt werden kann, wobei das CO_2 in der späteren Umsetzung aus Rauchgasen genutzt werden soll. Die Umsetzungskriterien des Konzeptes orientierten sich dabei am Positionspapier BioÖkonomie 2030 der Bundesrepublik Deutschland [BMBF 2010]. Damit ergibt sich die Notwendigkeit, viele verschiedene Forschungsbereiche miteinander zu verknüpfen und etablierte sowie umweltschonende Techniken, Infrastrukturen und Ressourcen zu nutzen.

2. Theorie

2.1 Nachwachsende Rohstoff-Verwertung: derzeitiger Stand in Deutschland

Bereits im Jahr 2010 hat das Bundesministerium für Bildung und Forschung die zukünftige Forschungsstrategie Deutschlands unter dem Namen Bioökonomie 2030 veröffentlicht. Hierin ist das Ziel der kommenden Bioökonomie skizziert vorzufinden, dessen Quintessenz die Herstellung verschiedener Produkte in einer Wertschöpfungskette aus einer nachwachsenden Quelle beschreibt, wobei stoffliche Flüsse zu ressourcenschonenden Kreisläufen geschlossen werden und keine ungenutzten Abfälle entstehen sollen [BMBF 2010]. Dieses wünschenswerte Ziel soll möglichst unter der Auflage gelingen, dass für den Anbau entsprechender Nutzpflanzen keine fruchtbaren Ackerflächen verwendet werden, um eine Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion zu verhindern. Die Anbauflächen für nachwachsende Rohstoffe in der BRD erreichten seit 2001 eine stetige Zunahme, was in Abbildung 1 deutlich wird. Im Jahr 2013 ging der Wert leicht zurück und blieb dann 2014 und 2015 bei einer Fläche um 2,4 Mio. Hektar [FNR 2015b]. Die Nutzung nachwachsender Rohstoffe statt Rohöl für verschiedene Produkte ist nicht neu. Bereits im Jahr 1855 wurde die erste Kunststoffanwendung auf Basis von Cellulose mit Celluloid umgesetzt. Schnell folgten weitere Synthesen, wie z. B. die auf Soja und Weizen basierten Kunststoffe im 1915 Modell T von Henry Ford zeigen. Mit dem Aufkommen der Petrochemie sind diese biobasierten Produkte aufgrund der billigeren Rohstoffquelle Erdöl seit Jahrzehnten in den Hintergrund gerückt – nun erfahren diese Ideen, wie die stoffliche Anwendung von Milchcasein (damals Galalith) ein *come back* [FNR 2015a]. Die heutige Petrochemie ist seitdem enorm gewachsen und bildet die Grundsäule der Chemie. So werden jährlich von der deutschen Chemieindustrie ca. 15 Mio. Tonnen Rohbenzin (Naphtha) verarbeitet. Dabei erzielt die Branche zusammen mit Erdgas einen Umsatz von 190 Mrd. Euro [Ristau 2015a]. Unlängst wurde damit begonnen, mit finanzieller Unterstützung des BMBF diesen Ausgangsstoff durch den Rohstoff CO₂ partiell zu ersetzen, sodass im Jahr 2016 Kunststoffe hergestellt werden sollen, die entsprechend Kohlenstoff- und Sauerstoffatome aus CO₂ beinhalten. Dabei kann in den hergestellten Polyolen jedes fünfte bis achte Kohlenstoffatom aus dem Kohlenstoffdioxid stammen. Auch andere verschiedene Synthesen werden diskutiert und erprobt [Ahrens 2013; Covestro 2015]. Generell belief sich bei der chemischen Industrie die Einsatzmenge an organischen Rohstoffen in 2011 auf 21,6 Mio. Tonnen – hiervon entfielen 12,6 % auf biogene Stoffe. Ein Hauptteil der biogenen Stoffe mit 1,2 Mio. Tonnen wird durch Fette und Öle repräsentiert, während Zucker, Stärke und Chemiezellstoff zusammen einen geringen Teil mit 0,8 Mio. Tonnen bildeten. Vergleichbare Entwicklungen sind auch auf dem deutschen Energiemarkt zu verzeichnen, wo im Jahr 2012 die erneuerbaren Energien einen

Anteil von 12,6 % an allen Energieträgern eingenommen haben [FNR 2013; FNR 2014]. Somit befindet sich die deutsche Ökonomie bereits auf dem Weg zur Bioökonomie, steckt aber letztendlich noch in den Anfängen. Beispielweise wurden im Jahr 2015 0,9 Mio. Hektar Ackerland für Energiemais als Substrat für Biogasanlagen verwendet [FNR, 2015c].

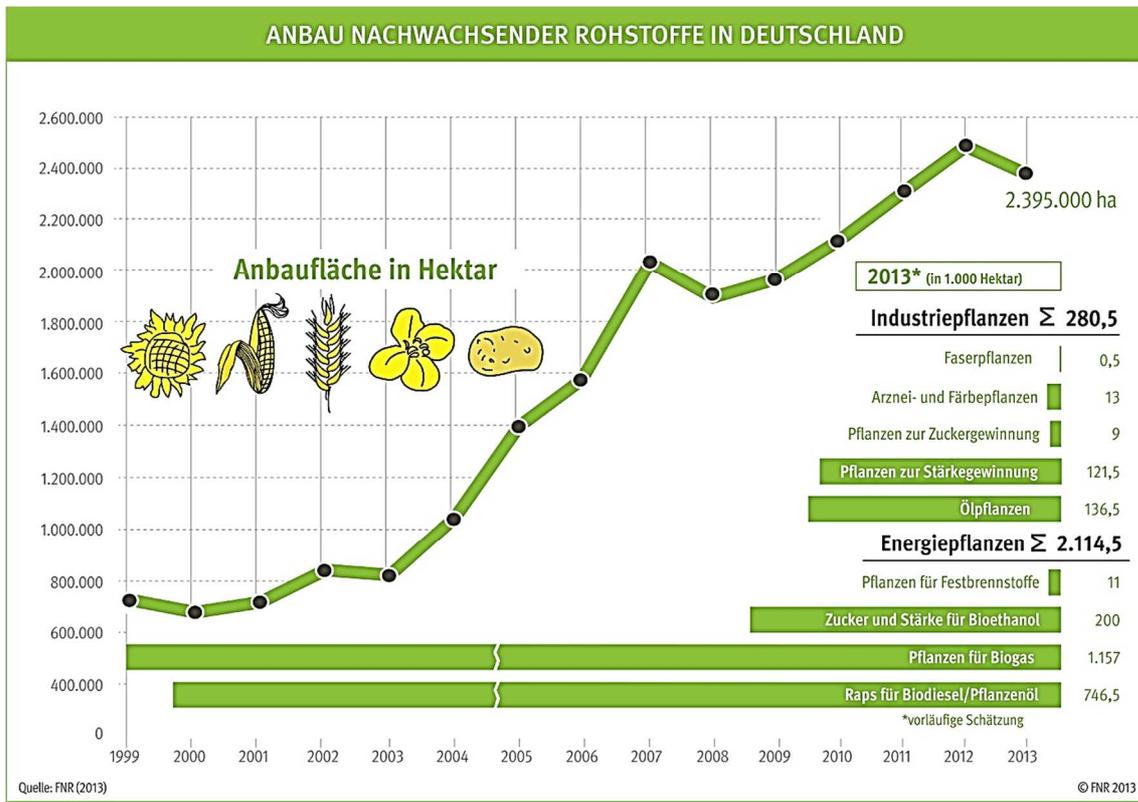


Abbildung 1: Entwicklung der Landnutzung zum Anbau nachwachsender Rohstoffe in Deutschland. Quelle: FNR, 2014.

In dieser Phase ist die Diskussion über Tank oder Teller bezüglich der Agrarflächennutzung noch sehr groß, zumal es noch kaum Alternativen gibt. Sorten wie Miscanthus oder Jatropha gedeihen zwar auf nicht fruchtbaren Böden, jedoch sind ihre stofflichen oder energetischen Einsatzmöglichkeiten begrenzt. Wird zudem nach den Kriterien und Vorstellungen des Positionspapiers BioÖkonomie 2030 argumentiert, so sollten wenig bis keine landwirtschaftlichen Flächen genutzt werden und auch keine Konkurrenz zu Nahrungsmitteln entstehen. Damit richtet sich der Blick in Richtung Holz, Mikroalgen, Abfall und Nebenprodukte aus verschiedenen industriellen Zweigen. Jedoch ist die Einsatzmöglichkeit von Holz als einen primären Lieferanten für verschiedene Rohstoffe in Anbetracht der Zukunftsszenarien zum Rohstoff Wasser bedenklich. Dieser Ansatz ist in Bezug auf die heute weltweit 800 Mio. Menschen ohne sicheren Trinkwasserzugang und weitere 2,5 Mrd. ohne ausreichend sanitisiertes Wasser kritisch zu betrachten, zumal die zukünftige Zunahme der Erdbevölkerung dieses Problem verschärfen wird [Schiermeier 2014]. Dieses Problem kann durch die Entwicklung von

Stoffkreisläufen in einem nachhaltigen Raffineriekonzept minimiert werden, bedingt aber auch den Einsatz geschlossener Anzuchtssysteme für die nachwachsenden Rohstoffe, um auch dem Wasserfingerabdruck derartiger Zukunftskonzepte entsprechend Rechnung zu tragen. Ein möglicher Ansatz wäre also die Anzucht von Mikroalgen in geschlossenen Photobioreaktoren, welche auch mit verschmutztem, nitrathaltigem Wasser oder Abwasser betrieben werden können, womit gleichzeitig zusätzliche Nährstoffe zur Biomasseerzeugung bereitgestellt werden [Wencker 2013].

2.2 Mikroalgen und potentielle Produkte

Ein Einsatz von Mikroalgen zur Produktion von Biomasse für die Herstellung industrierelevanter Produkte bietet in vielerlei Hinsicht großes Potential. Mögliche Produkte sind Grundchemikalien und Biokraftstoffe wie Biodiesel, Biowasserstoff, Bioethanol und Biomethan. Zusätzlich können wertvolle Makromoleküle wie Farbstoffe, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA), Lipide, Tenside, Glucane und Antioxidantien gebildet werden. Zu den möglichen Farbpigmenten zählen primär Phycocyanin, Phycoerythrin, Astaxanthin, Beta-Carotin, Xanthophyll und Canthaxanthin. Viele dieser Moleküle besitzen über die färbende Wirkung weitere funktionelle Eigenschaften. Viele Mikroalgen können mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) in großen Mengen synthetisieren. Weiterhin können Toxine, isotope markierte Zellprodukte und Antioxidantien wie Tocopherol und Superoxid-Dismutase gebildet werden [Brennan und Owende, 2009; Pulz 2004; Schenk *et al.*, 2008]. Sofern Mikroalgen als Nahrungsergänzung verwendet werden, müssen diese ähnlich wie Krebse, Fische oder Muscheln behandelt und nach EU-Verordnung auf Algtoxine geprüft werden [EG 53/2004]. Die Sinnhaftigkeit der Produktion von Rohstoffen aus Mikroalgen ergibt sich aus der anspruchslosen Kultivierung von Mikroalgen bei hohen Wachstumsgeschwindigkeiten und einer effektiveren Flächennutzung, was am Beispiel einer Hochrechnung der Biodieselproduktion durch Mikroalgen im Vergleich zu anderen konventionellen Kulturpflanzen in der folgenden Tabelle 1 verdeutlicht wird. Ein Hauptgrund für diese höheren Erträge liegt in der photosynthetischen Leistung von Mikroalgen. Pflanzen und Mikroalgen betreiben mit unterschiedlicher Energieeffizienz Photosynthese, wodurch mit Hilfe von Sonnenlicht und CO₂ unterschiedlich viele energiereiche Kohlenhydrate synthetisiert werden können. Die photosynthetische Effizienz (PE) wird als Quotient aus der in Biomasse akkumulierten Energie und der absorbierten Lichtenergie angegeben. Für Landpflanzen, die in moderaten Klimazonen wachsen, wurde eine photosynthetische Effizienz (PE) von unter 1 % berechnet [Posten und Schaub, 2009]. Dabei sind limitierende Faktoren für höhere Pflanzen die Bodenqualität, Temperatur, Intensität der Sonneneinstrahlung, circadiane Rhythmen, Art der Pflanze (C3, C4 oder CAM) und Wasserverfügbarkeit [Larcher 2003].

Tabelle 1: Vergleich der Biodieselproduktion mit konventionellen Nutzpflanzen und mit Mikroalgen gemäß der Hochrechnung aus Schenk *et al.* [2008]. Die Hochrechnungen basieren auf Daten aus Benemann und Oswald [1996] und Sheehan *et al.* [1998]. Die Datengrundlage der Algenszenarios basiert auf Produktionsdaten von Seabiotic Israel (in Ashkelon, Israel: 20 g m⁻² d⁻¹ Biotrockenmasse mit 8-40 % (w/w) TAG) als durchschnittlichen Fall und HR BioPetroleum Inc. Hawaii (jetzt Cellana, Inc., in Kailua-Kona, Hawaii mit maximal 50 g m⁻² d⁻¹ Biotrockenmasse und 50 % (w/w) TAG) als derzeit maximal erreichbaren Fall. Es wird verdeutlicht, wieviel biodieselfähiges Material (Liter) je Fläche (Hektar) und Zeitraum (Jahr) generiert werden kann und wieviel Anbaufläche in Anspruch genommen werden müsste, um den globalen Verbrauch zu decken bzw. welchen prozentualen Anteil die jeweils notwendigen Anbauflächen bezüglich der globalen Landflächen ausmachen würde.

Quelle	Biodiesel / L ha ⁻¹ a ⁻¹	Fläche für globalen Bedarf / 10 ⁶ ha	Flächenanteil an globaler Landfläche / %
Baumwolle	325	15'002	100,7
Sojabohne	446	10'932	73,4
Senfkorn	572	8'524	57,2
Sonnenblume	952	5'121	34,4
Raps/Canola	1,190	4'097	27,5
Jatropha	1,892	2'577	17,3
Ölpalme	5,950	819	5,5
Mikroalgen 10 g m ⁻² d ⁻¹ , 30 % TAG	12,000	406	2,7
Mikroalgen 50 g m ⁻² d ⁻¹ , 50 % TAG	98,500	49	0,3

Mikroalgen enthalten keine photosynthetisch-inaktiven Zellen oder Anteile, wie z.B. Wurzeln und Äste. Dies ist einer der Gründe, warum Mikroalgen das Sonnenlicht effizienter nutzen können, es wird ein PE von 5 % erreicht [Posten und Schaub, 2009; Rosello Sastre und Posten, 2010]. Mikroalgen haben demnach ein größeres Potential, da eine höhere Biomasseausbeute in Bezug auf Zeit und Fläche, sowie eine höhere chemische Energiedichte für die Photosynthese erzielt wird. Nachteile sind derzeit jedoch die höheren Kapitalkosten für die Infrastruktur und deren Betrieb [Demirbas 2010]. Um die Jahrtausendwende lagen die Produktionskosten für Mikroalgenbiomasse als Futter für die Aquakultur meist bei 50 bis 150 \$ kg⁻¹ [Pulz und Gross, 2004]. Aus diesem Grund ist die Gewinnung bzw. Extraktion mehrerer (Hochwert)-Produkte im Rahmen eines Bioraffineriekonzeptes mit einer Wertschöpfungskette sinnvoll und potentiell wirtschaftlicher. Hierdurch könnten die Produkte aus unterschiedlichen Preissegmenten das Gesamtkonzept in eine wirtschaftliche Gewinnzone tragen [Steiner 2008; Posten 2009; Stephens *et al.*, 2010]. In der Fachliteratur lassen sich meist die gleichen Produkte für verschiedene Spezies finden: Lipide, Proteine und Kohlenhydrate und gegebenenfalls Nukleinsäuren [Becker 1994]. Nichtsdestotrotz konzentrierte sich bislang ein Großteil der wissenschaftlichen Arbeiten und der kommerziellen Umsetzungen auf die Herstellung eines Produktes aus Mikroalgen [Chisti, 2007; Schenk *et al.*, 2008; Brennan und Owende, 2009;

Mata *et al.*, 2010; Rosello Sastre und Posten, 2010; Benemann 2013]. Abbildung 2 zeigt ein potenzielles Bioraffineriekonzept mit Mikroalgen, das sich am Positionspapier der BRD „BioÖkonomie 2030“ orientiert. Besondere Beachtung verdient dabei die zyklische

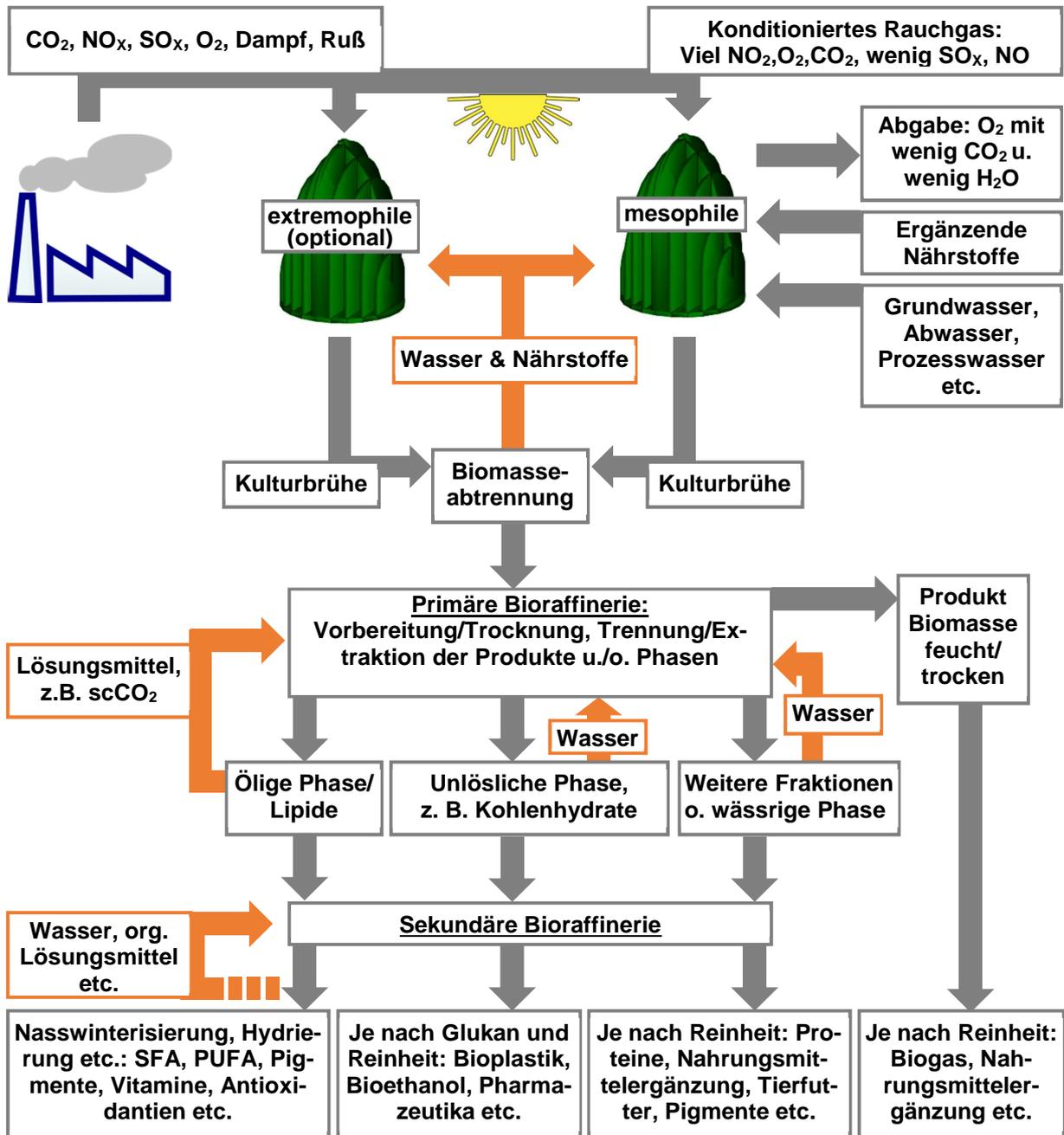


Abbildung 2: Mögliches Bioraffineriekonzept mit Algen. Optional kann bei beispielsweise stark schwefeloxidbelastetem Rauchgas eine extremophile Alge beim Gesamtkonzept separat kokultiviert werden. Die stofflichen Flüsse zu den Produkten sind durch Pfeile grau und Kreisläufe orange dargestellt. Das Konzept wurde mit den Informationen aus Davis *et al.* [2011] und Pulz und Gross [2004] orientiert am Positionspapier BioÖkonomie 2030 skizziert.

Verwendung von Lösungsmitteln in der Lipidextraktion oder auch die Wiederverwendung von Wasser aus diversen Prozessschritten. Gerade diese Stoffrückführungen und Kreisläufe sind

wichtig, um eine ausreichende Kosteneffizienz in einem Prozess mit Algen zu erreichen. Sofern stark belastete Rauchgase als Kohlenstoffquelle dienen, ist die Einbindung einer extremophilen Alge in das Konzept sinnvoll. Diese dient einerseits der thermischen und stofflichen Rauchgaskonditionierung für den Hauptproduktionsorganismus. Extremophile Mikroalgen tolerieren hohe Rauchgastemperaturen und Schwefeloxid- und Stickoxidkonzentrationen, da sie diese oftmals im eigenen Habitat vorfinden und somit optimal für solch einen Prozess angepasst sind. Andererseits können so die Ressourcen vollständig genutzt werden, ohne aufwendige physikalische/chemische Trennstufen für das Rauchgas integrieren zu müssen.

2.3 Produktionsanlagen für Mikroalgenbiomasse: Typ, Vor- und Nachteile

Die industrielle Herstellung von Mikroalgenbiomasse kann grundsätzlich in zwei verschiedenen Bioreaktoren erfolgen: den offenen und geschlossenen Systemen. Als offene Systeme werden mit Zement oder Plastikfolie ausgekleidete großflächige Becken geringer Tiefe verstanden, die als *open ponds* bezeichnet werden. Eine Durchmischung wird meist durch ein großes Schaufelrad gewährleistet, das die Kulturbrühe in einer zirkulären Bahn langsam umwälzt (*raceway ponds*). Gerne werden technische Anlagen in mariner Nähe betrieben, wodurch Wasser direkt verfügbar ist und der hohe Salzgehalt für manche Mikroalgen tolerierbar ist – nicht jedoch für andere um die Nährstoffe konkurrierende Organismen [Borowitzka 1999]. Es ergeben sich flächenbezogene Erträge der Biotrockenmassekonzentration von 10 bis 25 g m⁻² d⁻¹ je nach Standort, Algenspezies und weiteren Faktoren. Nachteilhaft bei diesen offenen Photobioreaktoren ist ein schlechter und einseitiger Lichteintrag bei den üblichen Wassertiefen von 15 bis 35 cm. Die offen gestaltete Architektur gewährt eine permanente Kontaminationsgefahr. Ebenfalls sind solche Anlagen nur bedingt in Stoffkreisläufe integrierbar, da eine hohe Wasserverdunstung und das Entweichen des in die Kulturbrühe eingetragenen CO₂ in die Atmosphäre dies unterbinden. Die Becken benötigen sehr viel Platz und sind sehr standortabhängig. Durch die ständige Kontamination sind das Aufrechterhalten der Algenpopulation und damit eine gleichbleibende Produktqualität erschwert. Die Produktion von Pharmazeutika ist aufgrund der GMP-Richtlinien unter konventionellen Bedingungen unmöglich [Pulz 2001]. Einige Beispiele sind in Abbildung 3 dargestellt. Trotz all dieser Nachteile sind *open ponds* derzeit Stand der Technik und im Großmaßstab dank der geringeren Kapital- und Betriebskosten sowie der einfacheren Handhabung am weitesten verbreitet [Zittelli *et al.*, 2013]. Ein Großteil der weltweit produzierten Mikroalgenbiomasse aus *Arthrospira (Spirulina)*, *Chlorella*, *Haematococcus* und *Dunaliella* Spezies erfolgt in *open ponds*. Damit werden sie als derzeit einzige rentable technische Umsetzung angesehen, wenn Produkte mit einem mittleren bis niedrigen Marktwert um US\$ 1000 t⁻¹ hergestellt werden sollen [Benemann 2013]. Die zweite Photobioreaktorvariante wird durch geschlossene Systeme repräsentiert, wobei es hier sehr

unterschiedliche geometrische Auslegungen gibt, mit denen flächenbezogene Erträge zwischen 25 und 50 g m⁻² d⁻¹ Biotrockenmasse erzielbar sind. Generell kann unterschieden werden zwischen Strömungsrohr- und Blasensäulenphotobioreaktoren – beide Varianten können



Abbildung 3: Verschiedene *open pond* Anlagen. **Links:** Cyanotech Corporation in Kailua-Kona auf Hawaii (USA) mit *Arthrospira platensis*-Produktion für Nahrungsergänzungsmittel in *raceway ponds* auf rund 0,3 ha. **Mitte:** Cognis (BASF) mit einer rund 500 ha Produktionsanlage für Betatene® Nahrungsergänzungsmittel in Hutt Lagoon, Port Gregory, West Australien mit statischen Becken und *Dunaliella*. **Rechts:** Chlorella Industry Co. Ltd. aus Tokio, Japan mit runden *raceway ponds* à 500 m². Quelle: Benemann, 2013.

je nach Auslegung des Typs bis zu 3 m in die Höhe gebaut werden, wodurch eventuelle Beschattungseffekte einzelner nebeneinander stehender Module die Flächeneffizienz einschränken können. Bei den Strömungsrohrsystemen wird die Kulturbrühe im Reservoir gesammelt und zirkulär über ein lichtdurchlässiges Rohrsystem gepumpt und durchmischt. Die Begasung erfolgt im Reservoir und/oder es werden Gasblasen durch das Rohrsystem gepumpt. Damit beschränken sich die hydraulisch umgewälzten Systeme auf Mikroalgen, welche die durch die Pumpe erzeugten Scherkräfte tolerieren. Bei den Blasensäulenphotobioreaktoren wird die Durchmischung und Begasung nach dem *air lift*-Prinzip pneumatisch umgesetzt, wo aufsteigende möglichst kleine Gasblasen die Kulturbrühe durchmischen. Durchgesetzt haben sich hierbei Flachplattenreaktoren und Rohr- oder Ringförmige Blasensäulen geringen Durchmessers. Die Wahl der jeweiligen Reaktorvariante und das Material des Reaktors, gewöhnlich Plastik oder Glas, orientiert sich nach den Produkten, die damit erzeugt werden sollen. So werden beispielsweise Strömungsrohrsysteme aus Glas von der Firma IGV (Institut für Getreideverarbeitung in Nuthetal bei Potsdam, BRD) – seit 2015 übernommen von der bbi-biotech GmbH (Berlin, BRD) – für Hochwertprodukte aus den Bereichen Lebensmittelergänzung, Kosmetika und Pharmazeutika eingesetzt, wo die hohen Investitions- und Betriebskosten durch die hohen Gewinne abgedeckt werden [Molina *et al.*, 2000; Pulz 2001; Weissman *et al.*, 1988; Wijffles und Barbosa, 2010]. Eine entsprechende Anlage mit Rohrreaktoren von der Firma Prof. Steinberg gehörend zu Roquette Frères SA (Lestrem, Frankreich) ist mit einem Volumen von 700 m³ bzw. einer Länge von 500 km in Klötze (bei Wolfsburg, BRD) zur Herstellung von

Chlorella-Biomasse für Nahrungsmittel im Einsatz [Schenk *et al.*, 2008]. Der Einsatz von geschlossenen Reaktorsystemen zur Herstellung von Niedrigwertprodukten beschränkt sich derzeit auf Flachplattensysteme aus Tiefziehplastik, wie sie von der Firma Subitec aus Stuttgart vertrieben werden oder Schläuche aus Folien, wie von der Firma Novagreen aus Vechta-Langförden (BRD). Exemplarische Beispiele sind in Abbildung 4 zu sehen. Die Entwicklungszeit eines Photobioreaktors mit Erprobung und Optimierung summiert sich schnell auf mehrere Jahre. Im Falle der Firma Subitec (Stuttgart, BRD) erfolgte die Erstvorstellung des strömungsoptimierten Flachplattenbioreaktors im Jahr 2000 - eine zunehmende industrielle Anwendung ist seit 2010 auch in der Presse zu vernehmen [Degen *et al.*, 2000; Bergmann *et al.*, 2013].



Abbildung 4: Geschlossene Photobioreaktorsysteme deutscher Firmen. **Links:** tubuläre Systeme aus Borosilikatglas von der Firma IGV/bbi-biotech GmbH (Nuthetal/Berlin, BRD). **Mitte:** Flachplattenreaktoren aus Tiefziehplastik von Subitec mit 180 L-Modulen und einer illuminierbaren Fläche von rund 5 m³ je Seite (Stuttgart, BRD). **Rechts:** Folienschlauchreaktoren von Novagreen mit 4,6 m³ je Standardmodul (Vechta-Langförden, BRD).

Alle geschlossenen Systeme, Strömungsrohr-, Flachplattenreaktoren und andere Reaktortypen haben verschiedene Vor- und Nachteile, jedoch ist die Optimierung derartiger Systeme zentraler Forschungsschwerpunkt derzeitiger Algenbiotechnologie und nicht finaler Stand der Technik. Andere Firmen wie Ecoduna (Bruck an der Leitha, Österreich) vertreiben 3 m hohe Module mit 0,44 m³ m⁻², die aus parallelen Platten bestehen, welche senkrecht der Sonne nachgeführt werden. Es ergibt sich ein guter Gasaustausch und hohe Flächenproduktivität, jedoch ist bei derart großen Anlagen eine Sonderlogistik beim Aufbau und Austausch nötig. Das Gewicht der Bioreaktoren samt Gerüst und Motor erfordert ein Betonfundament und das Temperaturmanagement ein Gewächshaus. Durch solch eine Infrastruktur für die Bioreaktoren aus Plastik fallen die Investitionskosten entsprechend höher aus. Da sich letztendlich das rentablere Geschäftsmodell in der freien Marktwirtschaft durchsetzt, sind Investitions- und Produktionskriterien nötig, um eine entsprechende Produktionsanlage zu gestalten. Generell wurden für geschlossene Bioreaktorsysteme Baukosten von 40 € m² Bioreaktorfläche postuliert, wenn eine ökonomische Produktion von Niedrigwertprodukten wie Biokraftstoffe ermöglicht

werden soll. Dabei sollten die Energiekosten im Betrieb 2 € m² oder 50 € m³ nicht überschreiten. Als drittes Kriterium sollte die Biotrockenmassekonzentration bei mindestens 20 g L⁻¹ liegen, um die Erntekosten im adäquaten Rahmen zu halten [Posten 2009]. Werden die Betriebskosten von offenen und geschlossenen Systemen verglichen, ergeben sich unterschiedliche Schwerpunkte. Bei *open ponds* sind diese bei der Ernte und dem Fördern der Brühe deutlich höher, da vergleichsweise geringere Biomassekonzentrationen in größerem Volumen aufgearbeitet werden müssen. Bei geschlossenen Systemen sind die Energiekosten für die Pumpleistung bzw. Begasung deutlich höher als für die Schaufelradumwälzung bei offenen Systemen. In beiden Fällen stellen die Kosten fürs Labor und Personal einen wesentlichen Punkt dar, was eine Weiterentwicklung der Automatisierung notwendig macht. Ebenfalls ist in beiden Fällen mit einer größeren Gewinnspanne bei steigender Größe einer technischen Anlage zu rechnen und wenn ein Standort mit besseren Lichtbedingungen gewählt wird [Norsker *et al.*, 2011].

2.4 *Euglena gracilis*

„At the same time I look't on a small Drop oft the Green Surface of some Puddle-water, which stood in my Yard, thi I found to be altogether composed of Animals of several Shapes and Magnitudes; But the most remarkable were those which I found gave Water that Green Colour, and were Oval Creatures whose middle part was of Grass Green, but each end Clear and Transparent [...]“ Diese erste Aufzeichnung (in original) über Eugleniden stammt von John Harris aus dem Jahre 1696, in der der Autor begeistert über die Eigenschaften der relativ großen „Tierchen“ mit einem neuen Mikroskop berichtet [Kempner und Miller, 2003]. Seither diente diese Spezies seit Dekaden als Modell und Versuchsobjekt der Grundlagenforschung in verschiedenen wissenschaftlichen Zweigen [Buetow 2005]. Die Klasse der Euglenoida entstand durch eine sekundäre Endosymbiose zwischen einem Einzeller und einer Grünalge. Die Klasse wird repräsentiert durch ca. 800 Arten in 43 Gattungen wobei der Süßwasserprotist *Euglena gracilis* der Gattung der Augentierchen zuzuordnen ist [Pulz und Gross, 2004]. Die genaue taxonomische Einteilung von *Euglena* war lange Zeit ein Problem. *Euglena* besitzt die Eigenschaft, wie Pflanzen rein photoautotroph zu wachsen oder aber ein heterotrophes Wachstum bei entsprechenden Bedingungen vorzuweisen. Erst Untersuchungen kleiner Untereinheiten der ribosomalen RNA führten schließlich dazu für *Euglena* einen eigenen Stamm *Euglenozoa* zu vergeben [Sogin *et al.*, 1985; Buetow 2005]. Taxonomisch ist *E. gracilis* somit keine Mikroalge. Da dies jedoch kein systematischer Taxonomiebegriff ist und im Wasser lebende, photosynthetisch aktive Mikroorganismen bezeichnet [Pulz und Gross, 2004], kann *E. gracilis* zu der Schnittmenge „Mikroalgen“ gezählt werden. Charakteristisch ist die spindelförmige Morphologie sowie Zellaufbau, welcher in Abbildung 5 deutlich wird. Die Zellmembran

der Einzeller besteht aus einer flexiblen Pellikula mit parallelen, spiralartigen Proteinanordnungen. Sie erlauben eine sehr flexible und fließende Zellverformung und -bewegung, welche im englischen Sprachraum als *euglenoid movement* beschrieben wird [Arroyo *et al.*, 2012]. Die zweite Bewegungsmöglichkeit ist ein propellerartiger Vortrieb, realisiert durch ein langes Flagellum. Zusätzlich bildet dieses rotierende Flagellum in Kombination mit einem Lichtsensor und einem statischen

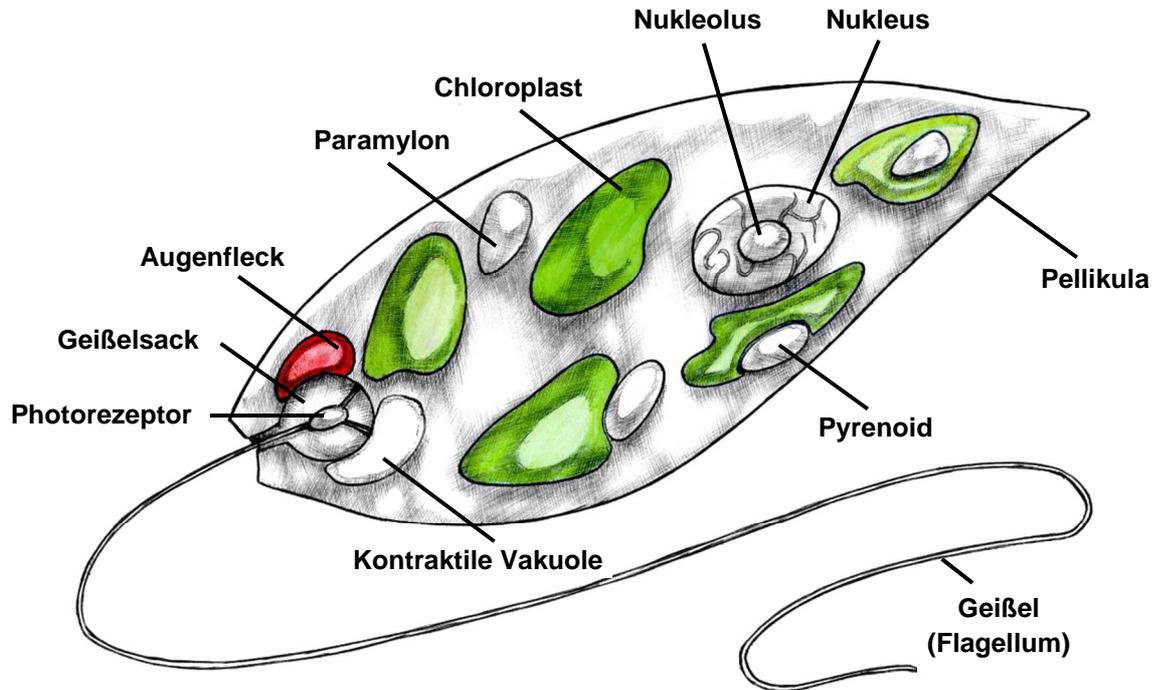


Abbildung 5: Schematische und vereinfachte Darstellung einer phototroph gewachsenen *Euglena gracilis*-Zelle mit einigen Merkmalen, die auch lichtmikroskopisch sichtbar sind. Weitere Details sind nicht abgebildet. Die Zeichnung wurde nach Vorlage mikroskopischer Bilder und Informationen von Buetow [2011] durch Jakob M. Müller angefertigt.

Augenfleck (Stigma) zusammen mit einem Paraflagellarkörper die licht-sensitive Organelle von *Euglena gracilis*. Hierdurch kann die Richtung des Lichts wahrgenommen werden. Mit Hilfe der Flagelle sind die Organismen zu positiver und negativer Phototaxis befähigt. Dabei ist der Einzeller in der Lage sich auf Dauerlicht oder unterschiedlichen Hell-/Dunkelphasen einzustellen und Zellteilungen so in einer Population zu synchronisieren [Brinkmann 1966; Cook 1966; Schnabel 1968a]. Auch auf den pH-Wert des umliegenden Milieus kann *E. gracilis* flexibel reagieren. Die Regulation des Wasserhaushaltes erfolgt durch eine kontraktile Vakuole, die sich ein- bis viermal pro Minute kontrahiert und überschüssiges Wasser aus der Zelle befördert. Hierdurch kann der Protist dynamisch auf den pH-Wert reagieren, wodurch sich ein Wachstum von Populationen zwischen pH 0,9 und 11,0 ergibt [Buetow 2005; Jones und Cook, 1978; Lee 2008]. In Bezug auf die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit zeigte *E. gracilis*

Optima bei pH 5,5 und bei Ausgangs-pH-Werten kleiner 3,5 bei Luftbegasung. Mit Luft und einem CO₂-Anteil von 5 % waren Optima bei pH kleiner 3,5 und größer 5,5 mit jeweils steigender Tendenz bis zu den Messgrenzen von pH 3,0 und 7,6 beobachtet worden [Jones und Cook, 1978]. Hinsichtlich der Temperatur ist ein Wachstum von 1 bis 38 °C [Buetow 2005] mit einem Optimum der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit bei 29 °C bekannt [Cook und Li, 1973; Jones und Cook, 1978; Kitaya *et al.*, 2005].

2.5 Ein Bioraffineriekonzept mit *E. gracilis*

Für die Verwendung von *E. gracilis* im Rahmen einer Bioraffinerie sprechen viele Gründe. Der Organismus wächst unter sehr flexiblen Bedingungen, was für eine generell robuste Biomasserzeugung von Vorteil ist. In Bezug auf die Energiegewinnung, die durch Photosynthese oder oxidative Assimilation organischer Kohlenstoffquellen möglich ist, ergeben sich Möglichkeiten der photoautotrophen, photoheterotrophen oder heterotrophen Kultivierung [Buetow 2005]. Der Organismus erreicht hohe spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten, hohe Endkonzentrationen der Zellen unter Einsatz recht anspruchslosen Nährmedien [Buetow 1968; Ogonna 2009]. Um axenische Bedingungen für *E. gracilis* im technischen Maßstab zu fördern, kann das Wachstum bei sehr niedrigem pH-Wert ein Fremdorganismenwachstum einschränken [Ogonna 2009]. Dabei kann unter verschiedenen Bedingungen eine weitere Ansäuerung des Nährmediums durch *Euglena gracilis* beobachtet werden [Yamane 2001], was eine Kultivierung zunehmend auf acidophile Organismen beschränkt und eine axenische Kultivierung fördert. Das Wachstum kann unter photoheterotrophen oder heterotrophen Bedingungen durch unterschiedliche Kohlenhydratquellen wie z.B. Zucker, Aminosäuren, Ethanol, diverse Fettsäuren und Alkohole unterstützt werden [Hosotani *et al.*, 1988; Tani und Tsumura, 1989]. Die Ernte der Biomasse durch eine energiearme Sedimentation wird letztendlich durch die Größe des Augentierchens begünstigt. Die Biomasse kann ganz oder aufgetrennt in Fraktionen verwertet werden. Als potentielle Hochwertprodukte kämen, Paramylon und α -Tocopherol, Lipide oder darin enthaltene Fettsäuren sowie Waxester und Proteine in Frage [Tani und Tsumura, 1989, Barsanti *et al.*, 2001, Šantek *et al.*, 2009, Schwarzhans und Cholewa *et al.*, 2015].

Bei einer Raffination könnten die Produkte α -Tocopherol, Pigmente und Lipide aus *E. gracilis* mittels Extraktion mit superkritischem CO₂ (scCO₂) oder organischen Lösungsmitteln gewonnen werden. Die Verwendung von scCO₂ ist im Vergleich zu anderen Standardverfahren umweltschonender und weist keine Nebenwirkungen wie Oxidationsprozesse oder Produktzerfall durch thermischen Einfluss auf [Birtigh *et al.* 1995; Leenheer, 2000; Li *et al.*, 2014; Zempleni *et al.*, 2007]. Mit Blick auf die Richtlinien und Vorstellungen im Positionspapier BioÖkonomie

2030 erfüllt die Extraktion der Lipide mit überkritischem CO₂ viele Kriterien deutlich besser, als konventionelle organische Lösungsmittel. Zudem ist scCO₂ ein wenig toxisches, kostengünstiges und schlecht entzündbares Fluid, das eine Vielzahl von hydrophoben Substanzen gut lösen kann [Friedrich und Pryde, 1984]. In Bezug auf Mikroalgen wurden bessere Ausbeuten erzielt als beim Einsatz von organischen Lösungsmitteln wie Hexan und Aceton. Andere Hochwertprodukte wie Polyene aus *Botryococcus braunii* oder γ -Linolensäure aus *A. platensis* konnten bereits erfolgreich mit scCO₂ extrahiert werden [Mendes *et al.*, 1995, 2003; Polak *et al.*, 1989]. Die Extraktion des lipophilen Vitamins α -Tocopherol ist ebenfalls dokumentiert [Herrero *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007]. Bei Drücken von 200 bar konnten aus verschiedenen Pflanzenrohstoffen mit scCO₂ höhere Konzentrationen an α -Tocopherol erzielt werden, als mit konventionellen Extraktionsmethoden [Hadolin *et al.*, 2001; Ge *et al.*, 2002a; Ge *et al.*, 2002b]. Ein Vorteil dieser Methode für die Lipidextraktion gegenüber solchen mit Lösungsmitteln ist auch, dass keine speziellen explosionsgeschützten Arbeitsbereiche notwendig sind – eine technische Anlage für Prozesse bei Drücken über 70 bar erfordert jedoch auch ein großes Investitionsvolumen. Nach einer Abtrennung der lipophilen Fraktion in *Euglena gracilis* verbliebe das hoch polymerisierte Paramylon als weiteres Hochwertprodukt in der Restbiomasse. In Form sehr widerstandsfähiger Granula und entsprechend resistent gegenüber physikalischen und einigen chemischen Angriffen [Vogel und Barber, 1968] kann das Paramylon in folgenden Schritten aus der Restbiomasse je nach notwendigen Reinheitsgrad bzw. Endapplikation aufgearbeitet werden.

2.6 Potentielle Produkte aus *E. gracilis*

Derzeit werden bereits viele Produkte aus Algenbiomasse industriell verarbeitet [Pulz und Gross, 2004; Rosello Sastre und Posten, 2010]. Traditionell werden Mikroalgen in der Nahrungsmittelindustrie wegen des hohen Gehaltes an Mineralien, Vitaminen und Antioxidantien eingesetzt. Produkte wie Fettsäuren, Sterole und Carotenoide können ebenfalls aus Algen hergestellt werden [Cardozo *et al.*, 2007]. Bezüglich *Euglena gracilis* wären in diesem Zusammenhang Fettsäuren [Korn, 1964], Sterole [Anding *et al.*, 1971; Brandt *et al.*, 1970], Carotenoide [Krinsky und Goldsmith, 1960] sowie Biotin und α -Tocopherol [Li *et al.*, 2008], aber auch das Speicherpolysaccharid Paramylon was vielfältig genutzt werden kann, mögliche Produkte [Šantek *et al.*, 2009; Ryll 2009; Sugiyama *et al.*, 2010]. Andere Antioxidantien wie Phyllochinon (Vitamin K), Plastochinone, Ubichinone 8, 9 und 10 (auch bekannt als Coenzym Q10), α -Tocopherylchinone und Tocotrienole wurden ebenfalls in *E. gracilis* nachgewiesen. Tocotrienole weisen zahlreiche weitere Funktionen auf, unter anderem eine hohe Schutzwirkung gegen UV- und γ -Strahlen und positive Effekte bei der Krebstherapien [Li *et al.*, 2010; Yamada *et al.*,

2008]. Insbesondere α -Tocotrienol konnte in hohen Konzentrationen von rund 3 mg g^{-1} Biotrockenmasse in *Euglena gracilis* nachgewiesen werden. Vergleicht man dieses mit kommerziellen Quellen, liegt der Gehalt in Hafer bei $56 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ Biotrockenmasse [Ruggeri *et al.*, 1985; Sen *et al.*, 2007]. Weitere Produkte wie die Aminosäure Tyrosin, allgemein Proteine oder andere Vitamine wie die Ascorbinsäure und Biotin könnten ebenfalls genutzt werden [Takeyama *et al.*, 1997; Rodriguez-Zavala *et al.*, 2010]. Durch diese reichhaltige Zusammensetzung des Pro-tisten ist generell auch eine direkte ganzheitliche Nutzung denkbar. Bezogen auf eine mögliche Futtermittelzusatz- oder Nahrungsergänzungsquelle beschreibt Becker [1994], dass phototrophe *Euglena gracilis*-Biotrockenmasse einen Proteinanteil von 39 bis 61 %, einen Kohlenhydratanteil (Paramylon) 14 bis 18 % und einen Lipidanteil von 14 bis 20 % aufweist. In der Kosmetikindustrie wird beispielsweise Rejuna als hydrolysiertes Extrakt von Euglena als Kosmetikzusatz von der Firma Euglena Co Ltd (Japan) vertrieben [Euglena, 2015].

2.6.1. α -Tocopherol

Die Existenz von Vitamin E wurde erstmals 1922 von Herbert Evans und Scott Bishop als Ernährungsfaktor beschrieben, welcher essentiell für die Reproduktion ist [Evans und Bishop, 1922]. α -Tocopherol ist ein fettlösliches Antioxidans mit der Molekülformel $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$. Strukturell wird es den Terpenoiden zugeordnet, die sich durch Kohlenwasserstoffe mit funktionellen Gruppen auszeichnen. Es gehört zur Vitamin E-Gruppe, die aus Tocopherolen und Tocotrienolen besteht. Ihr gemeinsames Strukturmerkmal ist ein Chroman-6-ol-Ring aus Homogentisat und einer Isoprenseitenkette. Je nach Methylierungsstatus des Chromanrings werden die Moleküle in die Formen α , β , γ oder δ unterteilt (siehe Abbildung 6). Durch den Sättigungszustand der Seitenkette werden die Tocopherole von den Tocotrienolen unterschieden [Zempleni *et al.*, 2007]. In der Natur kommen je vier Tocopherole und Tocotrienole vor. Aufgrund ihrer Chiralität an Position zwei des Chromanrings und den Kohlenstoffatomen $4'$ und $8'$ der Seitenkette

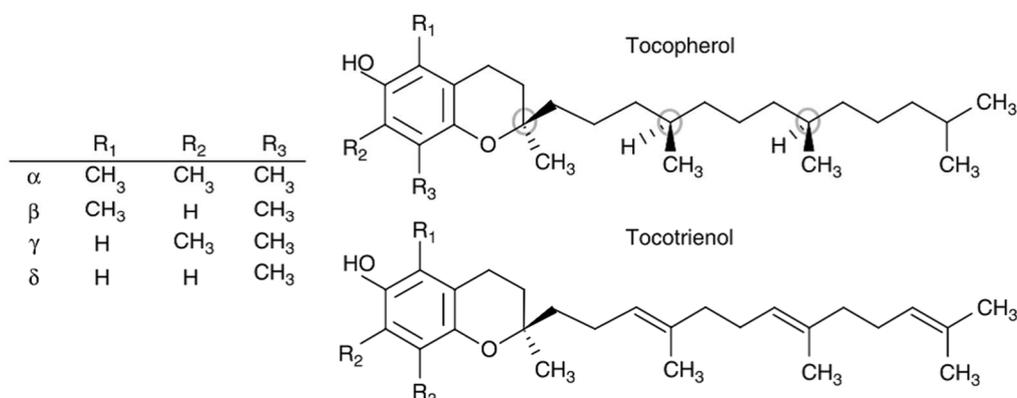


Abbildung 6: Darstellung der unterschiedlichen Vitamin E-Moleküle. Entnommen aus: Zempleni *et al.*, 2007.

ist jedes Vitamin E-Molekül theoretisch in der Lage in acht Stereoisomeren zu existieren. Das natürlich vorkommende α -Tocopherol weist die Konfiguration 2R, 4'R, 8'R auf und wird als RRR- α -Tocopherol bezeichnet [Leenheer *et al.*, 2000]. In der Vitamin E-Gruppe wurde diesem Molekül die höchste biologische Aktivität zugesprochen [Zempleni *et al.*, 2007, Kalman-Eldin und Appelqvist, 1996]. Erst vor einigen Jahren wurde ein weiteres sogenanntes MDT-Tocopherol (*marine derived tocopherol*) identifiziert, welches nur eine Doppelbindung zwischen den letzten beiden Kohlenstoffatomen der Seitenkette aufweist und eine um den Faktor 2,9 höhere antioxidative Wirkung bei 0 °C zeigte als α -Tocopherol. Diese Variante wurde bislang vornehmlich bei marinen Lebewesen vorgefunden [Yamamoto *et al.*, 2001]. Eine der wichtigsten natürlichen Aufgaben von α -Tocopherol besteht in der Zelle in Membranen. Dort kann es durch reaktive Sauerstoffspezies verursachte Reaktionen abbrechen, indem es die schädlichen Fettsäure-Peroxyradikale abfängt und dadurch die Zerstörung von Membranlipiden sowie weiteren Zellbestandteilen verhindert [Benzie 1996]. Danach wird das α -Tocopherolradikal durch Vitamin C regeneriert [Niki 1987].

2.6.2. α -Tocopherol aus *E. gracilis* und der potentielle Markt

α -Tocopherol kann ebenfalls durch chemische Synthese hergestellt werden, wobei eine Mischung der Stereoisomere des α -Tocopherols entsteht und als *all-rac*- α -Tocopherol kommerziell erhältlich ist [Zempleni *et al.*, 2007]. Abhängig von der Zusammensetzung des Ausgangsmaterials für die Synthese können unterschiedliche Isomergemische entstehen. Ausgangsstoffe sind hierbei beispielweise natürliche Produkte wie Phytol, Isophytol oder α -Tocotrienol. Das oxidationsanfällige α -Tocopherol wird üblicherweise mit Phosphat, Acetat, Nicotinat, Succinat oder anderen Esterformen formuliert. Hersteller von Vitamin E-Acetat sind unter anderem DSM Nutritional Products (Venlo, Niederlande), E. Merck (Darmstadt, BRD) oder BASF (Ludwigshafen am Rhein, BRD) [Leenheer *et al.*, 2000]. Synthetisch hergestelltes α -Tocopherol hat jedoch eine geringere biologische Aktivität als natürliches α -Tocopherol [Kalman-Eldin und Appelqvist, 1996; Wilburn *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2009], welches in photosynthetisch-aktiven Organismen gebildet werden kann. Derzeit wird α -Tocopherol hauptsächlich aus dem Öl von Oliven, Mais, Soja, Weizenkeimen, Früchten der Ölpalme und Sonnenblumen gewonnen [Tani und Tsumura, 1989, Hassapidou und Manoukas, 1993, Velasco *et al.*, 2002, Egesel *et al.*, 2003, Scherder *et al.*, 2006, Dong *et al.*, 2007, Zempleni *et al.*, 2007]. Die aus den genannten Quellen extrahierten Tocopherole bilden jedoch eine Mischung aus den weniger aktiven Isomeren. Erreicht werden maximale spezifische Konzentrationen in Pflanzen von 0,3 mg g⁻¹ α -Tocopherol in Bezug auf die Biotrockenmasse [Ogbonna 2009]. Die kommerzielle Herstellung weist einige ökologische Nachteile auf: Große Anbauflächen, eine massive Bewässerung und der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln. Eine weitere Aufarbeitung des Öls zum Erhalt des

reinen α -Tocopherols mit Öl-Extraktion, Vitamin E-Extraktion und Chromatographie zur Isomeren-Trennung gestaltet sich als sehr aufwändig [Rodríguez-Zavala *et al.*, 2010]. Ein Beispiel mit schlechter Ökobilanz bei der Extraktion von Tocopherol aus Pflanzenölen ist Palmöl, dessen Anbaufläche für die Gewinnung verschiedener Produkte im Jahre 2012 12 Millionen Hektar betrug. Neben der Rodung von Regenwäldern und den Konsequenzen für die vertriebene Bevölkerung sind der hohe Wasserverbrauch und Pestizideinsatz von Nachteil für Umwelt und Gesellschaft. Dabei plant allein Indonesien den Anbau bis 2020 auf 20 Millionen Hektar auszuweiten [WWF-Pressemitteilung, 2012]. Dieses natürliche α -Tocopherol erzielt jedoch mit 20 US\$ kg⁻¹ im Vergleich zu synthetisch hergestelltem α -Tocopherol mit 11 US\$ kg⁻¹ (in 2002) fast den doppelten Preis [Valentin und Qi, 2005]. Auch 2015 werden Großgebilde >50 kg über die Handelsplattform alibaba.com zu ähnlichen Konditionen angeboten. In 2002 wurden insgesamt 40000 t α -Tocopherol industriell verwendet, wovon etwa 10 % durch das natürliche α -Tocopherol repräsentiert waren [Valentin und Qi, 2005]. Einsatzgebiete finden sich hauptsächlich in der Nahrungsmittelergänzung, Pharmazie und Kosmetik [Sen *et al.*, 2007]. *Euglena gracilis* ist als phototropher Organismus in der Lage vergleichsweise hohe Mengen an Vitamin E zu produzieren [Green *et al.*, 1959]. In einer Studie mit 285 verschiedenen Organismen war *Euglena gracilis* der beste Produktionsorganismus für α -Tocopherol [Tani und Tsumura, 1989]. Tocopherole dienen *Euglena* hauptsächlich als Antioxidans, wo es durch Reaktion mit freien Radikalen die Folgen von oxidativem Stress minimiert [Graf 1980; Fryer 1992]. Weiterhin spielen Tocopherole eine Rolle beim Schutz von Thylakoidkomponenten in den Chloroplasten, bei den Reaktionen in Elektronentransportketten, in der Permeabilität der Zellmembran und wirken außerdem als Membranstabilisatoren [Ogbonna 2009]. Sehr zum Vorteil der Produkthomogenität macht das α -Isomer einen großen Anteil von 97 % (w/w) an den Gesamttocopherolen in *E. gracilis* aus, womit der Protist unter den Mikroalgen ein hohes Potential als α -Tocopherolproduzent besitzt [Litton und Gilbert, 1975; Takeyama *et al.*, 1997]. Bei photoautotropher Kultivierung produziert *E. gracilis* deutlich mehr α -Tocopherol als bei heterotrophem Wachstum [Shigeoka *et al.*, 1979; Hosotani und Kitaoka, 1984; Takeyama *et al.*, 1997; Grimm *et al.*, 2015]. Bei photoheterotroph gewachsenen Kulturen wird im Vergleich zu photoautotroph gewachsenen Kulturen eine etwas geringere α -Tocopherolkonzentration gebildet, jedoch eine höhere Biotrockenmassekonzentration erhalten wird, ergibt sich eine höhere α -Tocopherolkonzentration [Takeyama *et al.*, 1997; Ogbonna *et al.*, 2002].

Bei Kultivierungen mit *E. gracilis* wurden bisher Höchstkonzentrationen von bis zu 7,2 mg g⁻¹ erreicht [Ruggeri *et al.*, 1985, Tani und Tsumura, 1989]. Tani und Osuka [1989] beschreiben, dass α -Tocopherol Konzentrationen von 180,4 mg L⁻¹ und Selektivitäten von 6,3 mg g⁻¹ Biotrockenmasse in einer photoheterotrophen *Euglena gracilis* S-T1 Kultur mit Zulauf von Glucose

(35 g L⁻¹) und Pepton (15 g L⁻¹) erreicht wurden. Diese Resultate entsprechen sehr guten Werten einer α -Tocopherol Ausbeute, wobei man hier für 1 kg α -Tocopherol etwa 5,5 m³ Kultur benötigen würde. Mit den oben beschriebenen Preisen für α -Tocopherol und unter Berücksichtigung der Ausgaben für Medienbestandteile, Reaktor und Betriebskosten wird schnell ersichtlich, dass eine *E. gracilis*-Kultivierung ausschließlich zur Gewinnung dieses Produktes nicht rentabel wäre.

2.6.3. Paramylon

Das Polysaccharid Paramylon ist ein β -1,3-Glucan, welches als Speicherreserve granulär im Zytoplasma von *Euglena gracilis* vorliegt und zu *D*-Glucose hydrolysiert werden kann [Buetow 1968; Vogel und Barber, 1968; Monfils *et al.*, 2011]. Zum ersten Mal wurde es 1850 von Prof. Gottlieb als der Stärke isomer aufgebautes Kohlenhydrat beschrieben [Gottlieb 1850] und später als β -1,3-Glucan identifiziert [Kreger und Meeuse, 1952; Clarke und Stone, 1960]. Es ist hochpolymerisiert, unverzweigt und liegt in sehr widerstandsfähigen Granula vor, wodurch es sehr resistent gegenüber physikalischen und vielen chemischen Angriffen ist [Vogel und Barber, 1968]. Die Funktion von Paramylon ist dabei vergleichbar mit der Stärke in Pflanzen und dient ebenfalls als Reservestoff, besitzt allerdings eine höhere Kristallinität mit bis zu 90 %. Als wasserunlöslicher Partikel mit einer Dichte von 1,53 g cm⁻³ weist es gute Eigenschaften für eine einfache Reinigung des Polymers aus einem Zellgemisch auf [Marchessault und Deslandes, 1979]. Der Aufbau der Granula ist in Abbildung 7 dargestellt.

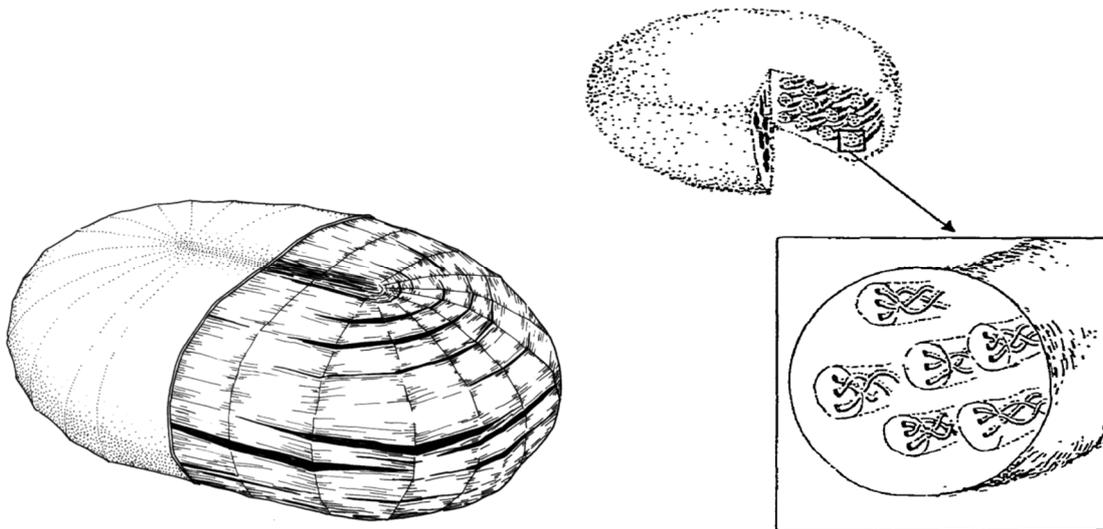


Abbildung 7: Schematischer Aufbau der Paramylongranula. **Links:** Darstellung der Membran sowie der dreieckigen und rechteckigen Segmente. Entnommen aus: Kiss *et al.*, 1987. **Rechts:** Darstellung der Ebenen, die aus Fasern und Mikrofibrillen aufgebaut sind. Näheres siehe Text. Entnommen aus: Marchessault und Deslandes, 1979.

Jedes Granula besteht aus zwei Arten von Segmenten: Rechteckigen, die sich an den Seiten befinden, und dreieckigen, die die Ecken der ovalen Granula ausfüllen. Üblicherweise setzen sich die Granula aus sechs bis acht dreieckigen und vier bis sechs rechteckigen Segmenten zusammen, welche in der Größe variieren können. In der Mitte existiert ein zentraler Bereich, in dem sich die Segmente treffen. Die Segmente sowie die Granula selbst sind aus Ebenen aufgebaut, die von Fasern in konzentrischen Mustern durchzogen werden. Diese Fasern bestehen aus einem Bündel aus Mikrofibrillen, welche 4 nm dick sind und den Cellulose-Mikrofibrillen ähneln. Umgeben sind die Granula von einer 6 nm dicken Membran [Kiss *et al.*, 1987].

2.6.4. Paramylon aus *E. gracilis* und der (potentielle) Markt

Die Paramylongranula sind im Zytoplasma verteilt [Buetow 1968] und können bei heterotroph kultivierten Zellen bis zu 90 % der Zelltrockenmasse ausmachen [Šantek *et al.*, 2009]. In einer heterotrophen repetitiven Satzkultivierung mit Kartoffelwasser konnten Biomassen von 20 g L⁻¹ mit einem Paramylonanteil von bis zu 75 % erreicht werden [Šantek *et al.* 2012]. In photoautotrophen Kultivierungen mit Minimalmedium werden spezifische Paramylonkonzentrationen von etwa 23 % nach zehn Tagen Kultivierung erreicht, [Bäumer *et al.* 2001] – in photoheterotroph kultivierten Zellen steigt der Anteil wiederum auf bis zu 77 % [Schwarzthans und Cholewa *et al.*, 2015]. Allgemein wurde von Bäumer *et al.* [2001] berichtet, dass bei photoautotrophen Kultivierungen etwa ein Sechstel des Paramylons gebildet wird, was bei heterotroph kultivierten Zellen entsteht. Insgesamt wird damit deutlich, dass der Organismus beträchtliche Mengen des β -1,3-Glucans akkumulieren kann. Das vielseitig einsetzbare Paramylon rückte deshalb stärker ins Rampenlicht zur Erforschung einer industriellen Anwendung. So beschreiben Shibakami *et al.* [2013], dass es möglich ist Nanofasern, aus dem Paramylon von *Euglena* zu produzieren. Ein weiteres interessantes Produkt sind abbaubare Folien für die Verpackungsindustrie [Koganemaru und Kawahara 2003]. Insgesamt zeigte Paramylon modifiziert als Paramylonester identische oder bessere thermoplastische Eigenschaften als andere nachwachsende oder fossile Rohstoffquellen und lieferte ein klares Material, wie in der folgenden Abbildung 8 links deutlich wird [Shibakami *et al.*, 2014]. Andere Varianten existieren mit Paramylon und dem Öl aus der Cashewnuss Schale, sichtbar in Abbildung 8 rechts [Voegele, 2013]. Beide Mischungen wurden am *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* in Japan entwickelt. Andere Einsatzgebiete wurden auch in der Medizin beschrieben, wo bei β -Glucanen immunstimulierende Eigenschaften nachgewiesen wurden [Brown und Gordon, 2001; Wismar *et al.*, 2010]. Unter anderem aus diesem Grund wird Paramylon in Japan als Nahrungsergänzungsmittel von der Firma *Euglena Co. Ltd.* angeboten. Auch konnte die orale Gabe von Paramylon bei Mäusen den Verlauf eines atopischen Ekzems (Neurodermitis) lindern [Sugiyama *et al.*, 2010]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass

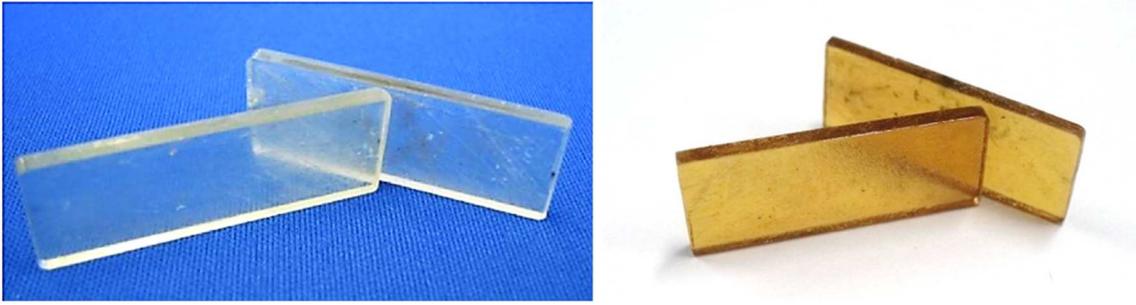


Abbildung 8: *Euglena*-Bioplastik, hergestellt aus modifiziertem Paramylon **Links:** Paramylon-Acetate-Myristat; entnommen aus: Shibakami *et al.*, 2014. **Rechts:** Paramylon quervernetzt mit modifiziertem Öl aus der Schale von Cashew Nüssen; entnommen aus: Voegele 2013.

mit Paramylon behandelte Makrophagen von Mäusen, unter Zugabe von Lipopolysacchariden, eine erhöhte Produktion von Interleukin-1 und Interleukin-6 aufwiesen [Kondo *et al.*, 1992]. Eine erhöhte Interleukin-1 Produktion für menschliche Makrophagen wurde ebenfalls nachgewiesen [Kankkunen *et al.*, 2010]. Außerdem konnte eine Antitumorwirkung in Mäusen belegt werden [Quesada *et al.*, 1976]. Als weiteres Einsatzgebiet ist die Kosmetikindustrie zu nennen, wo β -Glucane zur Viskositätssteuerung verwendet werden [Rosello Sastre und Posten 2010]. Auch wird es in zahlreichen Hautcremes eingesetzt, da β -Glucane verschiedene positive Effekte auf die Haut besitzen. So sind die Stimulation der Kollagensynthese oder eine Unterbindung allergischer Reaktionen wie auch viele andere positive Effekte für die Gesundheit bekannt [Castelli *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2002; Douwes 2005].

Neben diesen sehr unterschiedlichen Anwendungsbereichen lassen sich weitere potentielle Einsatzgebiete erörtern: so kann Paramylon als bioverträgliche und -abbaubare *peeling* Substanz eingesetzt werden oder als (Mikroplastik-) Partikelersatz in Zahnpasta. Zunehmend wird auch von Konzernen das Potenzial von Paramylon erkannt: so investiert Evonik Industries AG (Essen, BRD) in das amerikanische Unternehmen Algal Scientific Corporation (Galleon Ct, USA), um über das heterotrophe Wachstum von *E. gracilis* das Produkt Paramylon zu erhalten, welches wegen seinen positiven Effekten als Futtermittelzusatz vertrieben werden könnte [Evonik 2014]. Die Entwicklung von Bioplastik aus Paramylon durch mikrobielle Umwandlung in Milchsäure wird in Kooperation mit dem Konzern NEC Corporation (Tokio, Japan) und der Universität Miyazaki (Miyazaki, Japan) vorangetrieben [Voegele 2013]. Eine globale oder regionale Handelsbilanz zu β -1,3-Glucanen oder Paramylon ist nicht verfügbar. Das weltweite Marktvolumen für Hefeextrakt und β -Glucane wurde mit US\$ 677 Mio. für 2015 beziffert und wird voraussichtlich bis 2021 auf über US\$ 1 Mrd. steigen [TMR 2015].

2.6.5. Lipide/Fettsäuren

Weitere stofflich verwertbare Komponenten, welche große Massenanteile in *Euglena gracilis* ausmachen, sind Lipide und Wachsester [Koritala, 1989; Teerawanichpan und Qiu, 2010]. Ein Großteil der Lipide aus photoautotroph gewonnener Biomasse ist in Membranen als Phospholipidanteil und in Chloroplasten zu finden [Rosenberg 1963]. Dabei können Myristinsäure (C14:0) und Palmitinsäure (C16:0) einen großen Teil unter den Fettsäuren ausmachen, wobei der Anteil der Lipide an der Biotrockenmasse in der Fachliteratur sehr uneinheitlich mit 5 % bis 25 % angegeben wird [Hulanicka *et al.*, 1964; Mahapatra *et al.*, 2013]. Weiterhin werden verschiedene ungesättigte Fettsäuren gebildet, die einen Anteil von 9 bis 31 % wie α -Linolensäure (C18:3n3) aufweisen können, wobei die Schwankungen der Anteile der jeweils zugrunde liegenden Anzahl an untersuchten Fettsäurespezies der verschiedenen Studien unterliegt. Weitere abundante mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind verschiedene C20-Körper von Eicosatriensäure (C20:3n3) bis zur Eicosapentaensäure (C20:5n3) mit beschriebenen Anteilen bis zu 18 % (w/w) bezogen auf alle Fettsäuren. Im Gegensatz dazu werden in heterotrophen Kultivierungen vor allem Fettsäuren mit mehr als 20 Kohlenstoffatomen gebildet [Hulanicka *et al.*, 1964; Korn 1964; Regnault *et al.*, 1995]. Der Gehalt an Lipiden kann gesteigert werden, wenn die Zellen unter Stress mit Hilfe von Schwermetallen wie Kupfer, Zink und Kobalt gesetzt werden. Bereits Konzentrationen <1 mM führten zu einer Erhöhung des Lipidgehaltes bei phototroph kultivierten *E. gracilis*-Zellen um bis zu 150 % [Einicker-Lamas *et al.*, 1996, 2002; Rochetta *et al.*, 2006].

Wachsester als Teil der Lipidfraktion werden unter Verstoffwechslung von Paramylon unter anaerob-heterotrophen Bedingungen produziert. Dabei kann die Paramylonreserve nahezu vollständig aufgebraucht werden [Rosenberg und Pecker, 1964; Inui *et al.*, 1982]. Der Anteil von Wachsestern kann unter aeroben Bedingungen bis zu 8,9 % betragen – mit bestimmten *E. gracilis*-Stämmen sind bei anaeroben Kultivierungen etwa 60 % Masseanteil als Wachsester erreichbar [Tucci *et al.*, 2010]. Bei Kultivierungstemperaturen unterhalb des Bereichs von 26 bis 33 °C können die Wachsesteranteile im Vergleich noch höher ausfallen [Kawabata *et al.*, 1982; Kawabata und Kaneyama, 1989].

2.6.6. Lipide/Fettsäuren aus *E. gracilis* und der (potentielle) Markt

Im Bereich der kommerziellen und industriellen Anwendungen reicht das Spektrum des Einsatzes von Lipiden von Nahrungsmitteln über Biodiesel bis zu mit Lipiden beschichteten Mikroblassen für die gezielte Wirkstoffverabreichung [Gunstone und Padley, 1997; Unger *et al.*, 2004]. Generell ist der Markt für Öle seit Jahrhunderten etabliert und wird derzeit über entsprechende Ölpflanzen, wie Ölpalmen, Sojabohnen oder Keimöle versorgt [Chisti 2007]. Oftmals

ist das Fettsäurespektrum als große Fraktion aus den Lipiden entscheidend für den möglichen Verwendungszweck eines Lipidgemisches. Für die Nahrungsergänzung werden bevorzugt lange und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) eingesetzt. Besonders ω 3- oder n3- und ω 6- bzw. n6-Fettsäuren wie Docosahexaensäure (DHA, C22:6n3), Eicosapentaensäure (EPA, C20:5n3) und Arachidonsäure (C20:4n6) sind von großem Interesse. Sie werden etwa als Zusatz in Babynahrung, Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen oder Vorstufen von Pharmazeutika verwendet [Simopoulos, 1991; Ward und Singh, 2005; Bauch *et al.*, 2006; Varfolomeev und Wasserman, 2011].

Als Niedrigwertprodukt können Lipide bei der Produktion von Biogas als reichhaltige Energiequelle für methanogene Bakterien dienen [Grimm *et al.*, 2015]. Zugleich sind Triacylglyceride ein möglicher Ausgangsstoff der Biodieselproduktion, da dieser Biokraftstoff zum Großteil aus einem Gemisch von Fettsäuremethylestern besteht. Bei einem sehr hohen Lipidanteil an der Biomasse kann es energetisch sinnvoll sein die Lipide zu extrahieren und der Produktion von Biodiesel zuzuführen. Zudem fällt bei der Biodieselproduktion aus Acylglyceriden Rohglycerin als Nebenprodukt an, das als günstige Kohlenstoffquelle zur Gewinnung von Algenbiomasse genutzt werden kann. Bei solchen Bioraffineriekonzepten muss beachtet werden, ob der Verlust an produzierten Biogas durch Einsatz von Biomasse ohne Lipide durch den Gewinn an Biodiesel ökonomisch ist [Sialve *et al.*, 2009; Brennan und Owende, 2010; Mata *et al.*, 2010]. Eine solche Energiebilanz darf nicht den für die Lipidextraktion notwendigen Energieaufwand vernachlässigen, der oftmals das energieintensive Trocknen der Biomasse beinhaltet. Verschiedene Studien zeigen, dass gesättigte Fettsäuren der Länge C10 bis C18 gute Eigenschaften für den Einsatz in Biodiesel haben. Bei vergleichsweise kürzeren Fettsäuren liegen zu hohe Schmelztemperaturen ihrer Ester vor, während ungesättigte Fettsäuren eine zu geringe Cetanzahl für Diesel aufweisen. Mit der Cetanzahl wird die Zündwilligkeit eines Dieselmotors bezeichnet, sie ist als Kriterium vergleichbar mit der Oktanzahl für Ottomotoren. Das sehr zündwillige reine Cetan - eine alte Bezeichnung für Hexadecan - wird als Maßstab genommen und entspricht der Cetanzahl 100. Zugleich führt der Einsatz zu langer Fettsäuren zu einer höheren Viskosität des produzierten Biodiesels, was problematisch für den Einsatz in Verbrennungsmotoren ist. Eine vorige Abtrennung von ungesättigten Fettsäuren als eigenes Produkt erscheint sinnvoll, da diese die Cetanzahl des Biodiesels absenken und deren Verwendung mit einer erhöhten Entstehung von Stickoxiden bei der Verbrennung des Treibstoffes korreliert [McCormick *et al.*, 2001; Knothe und Steidley, 2005; Ban-Weiss *et al.*, 2007; Knothe 2008]. Zum anderen ergäbe sich hierdurch eine Wertsteigerung in der Wertschöpfungskette, da die abgetrennten Fettsäuren viele n3-Fettsäuren enthalten, die als potentielles Nahrungsergänzungsmittel zu vermarkten wären. Es ergäbe sich also durch eine einfache Auftrennung der Fettsäuren, welche beispielsweise durch Flüssigwinterisation erfolgen kann, eine Quali-

tätssteigerung beider Fettsäurefraktionen mit einem höheren Gewinn. Ein weiteres Anwendungsfeld von Fettsäuren ist durch ihre amphiphile Eigenschaft gegeben. Fettsäuren können zur Herstellung von Tensiden eingesetzt werden, welche als grenzflächenaktive Substanz zentraler Bestandteil von Waschmitteln sind [Lang 2002]. Als Ausgangssubstanz für die Tensidsynthese kämen bevorzugt Derivate gesättigter Fettsäuren mit Kettenlängen zwischen 12 und 16 C-Atomen aufgrund ihrer positiven Tensideigenschaften wie Schaum- und Emulgierfähigkeit zum Einsatz [Osipow *et al.*, 1956; Maag 1984]. Eine industrielle Anwendung finden Phospholipide, aber auch Fettsäuremethylester für VOC-freie (*volatile organic compounds*) Reinigungsmittel [Maag 1984; Bene *et al.*, 2008].

Auch mit *Euglena gracilis* werden Produktionsbeispiele und spezifische Anwendungen mit Lipiden beschrieben. Eine Studie befasst sich mit der Frage, inwiefern *Euglena* mit Abwässern heterotroph in offenen Systemen kultiviert werden kann. Mit einem hohen Anteil an C16- und C18-Fettsäuren konnten Lipidgehalte von etwa 25 % erreicht werden [Mahapatra *et al.*, 2013]. In der Studie wird vorgeschlagen, die gewonnenen Lipide durch Umesterung zu Fettsäuremethylester (FAME) als Biodiesel zu nutzen. Erste Versuche mit Biodieselmischungen aus Algen für Flugzeugtreibstoff gab es bereits [Schlagermann *et al.*, 2012]. Derzeit wird in einer Kooperation mit dem Automobilhersteller Isuzu und Euglena Co. Ltd. (beide Firmen mit Hauptsitz Tokio, Japan) der Biodiesel *blend* Deusel aus der Lipidfraktion von *E. gracilis* erprobt. In erster Stufe soll dieser Biodiesel dem fossilen Diesel beigemischt werden. Der Beginn der Großproduktion des Biodiesels wurde für 2018 angesetzt [Isuzu, 2014; Münder, 2014].

Wenn die Algenanzucht für Lipide auf dem Freiland erfolgt, stellt sich jedoch die Problematik einer Jahreszeiten abhängigen Variation in der Lipidzusammensetzung und dem Lipidgehalt [Olofsson *et al.*, 2012]. Diese Variation würde für manche Produkte nicht tolerierbar sein, sofern aktuelle Qualitätsstandards als Bemessungsgrundlage Anwendung finden. Speziell bei *E. gracilis* gäbe es zahlreiche Ansätze, um eine Variation zu kompensieren. Hulanicka *et al.*, [1964] demonstrierten durch Variation des CO₂ Anteils mit 0,5 und 5 % (v/v) in der Gasphase bei photoautotrophen Kultivierungen eine Änderung der Anteile von einigen Fettsäuren. Auch bei photoheterotrophen Kultivierungen zeigte die Variation der Medienbestandteile einen Einfluss auf bestimmte Fettsäuren [Schwarzhan und Cholewa *et al.*, 2015]. Verschiedene Stickstoffkonzentrationen im Medium beeinflussten ebenfalls die Ergebnisse der Lipide [Regnault *et al.*, 1995]. Insgesamt ergeben sich somit für *E. gracilis* viele Möglichkeiten, eine jahreszeitenunabhängige gewünschte Lipidzusammensetzung zu erhalten [Barsanti *et al.*, 2000].

2.6.7. Weitere potentielle Hochwertprodukte

Neben den bereits erwähnten Möglichkeiten existieren weitere Potentiale aus verschiedenen Stoffgruppen, die in der Regel ein größeres Investitionsvolumen oder apparativen Aufbau erfordern, wenn deren Isolierung angestrebt wird. Derzeit existieren verschiedene Produkte aus *E. gracilis* ausschließlich auf dem japanischen Markt. Eine Internet-Bildrecherche mit der Suchmaschine Google und dem Suchbegriff *midori mushi* als japanisches Synonym für *Euglena* lieferte die in Abbildung 9 gezeigten Ergebnisse. Es handelt sich dabei um Produkte primär aus den Bereichen Nahrungsmittel, -ergänzung und Kosmetik.

Wie bereits vorgestellt wurde, bilden Mikroalgen eine wirtschaftliche Quelle für eine industrielle Pigmentherstellung. Die Gruppe der Pigmente besteht unter anderem aus der großen Untergruppe der Carotinoide, einer Molekülgruppe mit antioxidativer Wirkung, dessen bekannter Vertreter das Xantophyll Astaxanthin ist. Auch *E. gracilis* besitzt ein gelbes Xantophyll, welches in ungewöhnlich hoher Menge in den Zellen vorliegt. Das Diadinoxanthin kann bis zu 76 % aller Carotinoide ausmachen [Schwenker 1971; Heelis *et al.*, 1979]. Die Pigmente reichern sich in der Regel in der lipophilen Phase an und müssten – sofern die Lipide ebenfalls wirtschaftlich genutzt werden sollen – durch Extraktion oder Chromatographie abgetrennt werden. Eine weitere Stoffgruppe als potentielles Produkt bilden die Wachsester, welche bei einer Extraktion in der Lipidfraktion akkumulieren. Diese Gruppe besteht aus C27 bis C30-Körpern und kann je nach Kultivierungsdauer und Bedingungen bis zu 50 % der Biotrockenmasse ausmachen [Becker 1994; Tucci *et al.*, 2010]. Andere Stoffe, wie in der Zellmasse akkumulierte wertvolle Metalle, wären als zukünftiges Produkt ebenfalls denkbar. Bereits heute wird das



Abbildung 9: Verschiedene auf dem japanischen Markt kommerziell erhältliche Produkte mit *Euglena gracilis*. Ergebnisse der Google-Bildersuchmaschine mit dem Suchbegriff: *Midorimushi*. **Von links nach rechts:** Tofuriegel mit Euglena-Biotrockenmasse als Lebensmittel namens euglena Bar der Firma Euglena Ltd (Japan); Kekse mit Euglena-Biomasse namens Euglena cookies: A billion bugs in every box hergestellt in Zusammenarbeit der Tokio Universität und Euglena Ltd. (Japan); Eine Kosmetik-Produktlinie mit Auszügen aus Euglena names B.C.A.D. euglena cosmetics von der Firma Euglena Ltd. (Japan); Nahrungsergänzungsmittel-Tabletten mit Euglena-Biotrockenmasse (600 mg je Kapsel) namens *euglena smile* der Firma Corvalimited aus Japan.

phytomining mit konventionellen Pflanzen, wie Raps erprobt. Hierbei wird Germanium aus Raps-Gärresten isoliert, wobei durch ein Extraktionsverfahren das Element als Tetrachlorid am Ende vorliegt [Ristau 2015b]. Auch hier könnte *E. gracilis* eine Alternative sein, die nicht mit Nahrungsmittelackerflächen und Nahrungsmitteln konkurrieren muss, wie bei Raps. Der Protist ist dafür bekannt, in Minenwasser oftmals als alleiniger Mikroorganismus zu überleben, da extreme pH-Wert oder hohe Metallkonzentrationen toleriert werden können [Buetow 2011]. Dabei akkumulieren die Zellen verschiedene Metalle wie Mangan, Cer oder Neodym intrazellulär [Shen *et al.*, 2002]. Auch sind Resistenzen beispielsweise gegen Cadmium bekannt, oder die Eigenschaft bestimmte Metalle wie Silber in Partikeln abzuscheiden [Li *et al.*, 2015; Santiago-Martínez *et al.*, 2015].

2.7 Die Nutzung schwefelbelasteter Rauchgase als Kohlenstoffquelle mit Hilfe der extremophilen Mikroalge *Galdieria sulphuraria*

Die zusätzliche Kultivierung einer extremophilen Mikroalge ergäbe die Möglichkeit auch stark schwefelbelastete und gegebenenfalls heiße Rauchgase als CO₂-Quelle für das neue Bioaffineriekonzept zu nutzen [Pulz und Gross, 2004]. Diese Rauchgase würden durch die extremophilen Mikroalge konditioniert werden, bevor das Restgas zum Hauptorganismus *E. gracilis* in den Reaktor gelangt, wie bereits in Abbildung 2 angedeutet wurde. Weiterhin kann die Wärme der Rauchgase genutzt werden, um die Wachstumsgeschwindigkeit einer thermophilen Mikroalge zu maximieren. Nach ausführlicher Recherche wurde hierfür *Galdieria sulphuraria* ausgewählt. Diese Rotalge besiedelt *in natura* wie *Cyanidium caldarium* und *Cyanidioschyzon merolae* umliegende Gebiete von heißen Schwefelquellen. In diesen Habitaten werden die durch vulkanische Aktivitäten emittierten Schwefelverbindungen oxidiert, weshalb extreme pH-Werte entstehen. Auf dem Meeresgrund in der Nähe von schwarzen Rauchern – *black smoker* – wird die angesiedelte Biomasse zu etwa 10 % von *C. caldarium* und *C. merolae* repräsentiert, während die restlichen 90 % *G. sulphuraria* ausmacht. *G. sulphuraria* ist extrem acido- und thermophil und wächst bei Temperaturen bis zu 56 °C mit einem Temperaturoptimum um 37 °C bei rein photoautotrophen Wachstumsbedingungen [Albertano *et al.*, 2000]. Heterotroph und photoheterotroph werden die Kulturen *in vitro* meist bei 42 °C kultiviert [Gra-verholt und Eriksen 2007; Schmidt *et al.*, 2005]. Das pH Optimum für das autotrophe Wachstum liegt im stark sauren Bereich bei pH 2,0 [Johnson 1998, Albertano *et al.*, 2000]. Die Mikroalge toleriert photoautotroph pH-Werte von 1,0 bis 5,0 mit der Konsequenz einer steigenden Verdopplungszeit bis auf 65 h bei zunehmend neutralen pH-Werten. Bei heterotroph wachsenden Zellen konnte ein Wachstum bis pH 8,0 mit Verdopplungszeiten bis zu 80 h beobachtet

werden. In der Regel säuert sich die Alge während der Kultivierung wie *E. gracilis* an [Oesterhelt *et al.*, 2007]. Weiterhin ist *G. sulphuraria* in der Lage starken osmotischen Stress mit Hilfe des Enzyms Florisidase zu tolerieren. Hohe Salzkonzentrationen induzieren eine Erhöhung der Florisidase-Konzentration, wodurch sich das Zellvolumen entsprechend anpasst und die Zelle schützt [Kauss 1968; Kerjean *et al.*, 2007]. Dadurch besitzt *G. sulphuraria* eine Salztoleranz von bis zu zehn Gewichtsprozent [Albertano *et al.*, 2000]. Bis auf die Zellgröße von 3 bis 11 µm [Luca *et al.*, 1978; Merola *et al.*, 2009] weist diese Mikroalge viele Vorteile für eine Mitnutzung im Rahmen eines Bioaffineriekonzeptes auf. *G. sulphuraria* kann über 50 verschiedene C-Quellen verwerten, wobei auch Glycerin verstoffwechselt werden kann [Gross und Schnarrenberger, 1995]. Wie der Name schon verrät, wächst dieser Organismus am besten bei hohen Schwefelkonzentrationen. Wie im Konzept von Pulz und Gross [2004] vorgeschlagen, würde sich *G. sulphuraria* optimal dazu eignen heiße schwefelhaltige Rauchgase beispielsweise aus Industrieabgasen für das Wachstum zu nutzen. Diese von *G. sulphuraria* konditionierten schwefelarmen Gase könnten dann weiter zu *E. gracilis*-Hauptkultur geleitet werden, um diese mit CO₂ zu versorgen. Die Einbindung einer zweiten Mikroalge in ein Bioaffineriekonzept erhöht die Investitions- und Betriebskosten erheblich, erscheint aber als logische Konsequenz, wenn ein neues Bioaffineriekonzept modular auch diesen Bereich abdecken soll [Pulz und Gross, 2004]. Insofern wäre ein hochpreisiges Endprodukt mit einem entsprechenden Endpreis und einem stabilen Marktbedarf notwendig, wie beispielsweise beim Endprodukt Pigmente. Wie bereits erwähnt sind Pigmente und insbesondere Phycobilliproteine Hochwertprodukte, die auch für Nahrungsergänzungsmittel- und die Kosmetikindustrie von großem Interesse sind und erzielen Preise von 3 bis 25 US\$ mg⁻¹ [Spolaore *et al.*, 2006]. Ein wichtiges Kriterium der Phycocyanine als Hochwertprodukt ist die Reinheit, denn je höher die Reinheit des Phycocyanins, desto höher der erzielbare Marktpreis [Soley Institute, 2016]. Insofern wurde die Aufarbeitung des Phycocyanins parallel mit der Etablierung der Kultivierungsprozesse von *G. sulphuraria* entwickelt, wobei Allophycocyanin (APC) und C-Phycocyanin (C-PC) von *G. sulphuraria* produziert werden. Zwar werden mit *Athrospira platensis* höhere Selektivitäten der wasserlöslichen blauen Pigmente erreicht [Tredici *et al.*, 1991; Marquez *et al.*, 1993] und die Produktion auch schon im technischen Maßstab durchgeführt [Gershwin und Belay, 2007; Vonshak 1997], jedoch ist durch eine deutlich höhere erreichbare Biotrockenmassekonzentration von *G. sulphuraria* auch eine deutlich höhere volumenbezogene Konzentration der Phycobilliproteine möglich. Dabei kann ein im Vergleich einfach zusammengesetztes Medium mit Glycerin, welches keine Vitaminzusätze erfordert, die Betriebskosten senken und die Produktion in technischen Anlagen vermutlich lohnenswerter machen [Schmidt *et al.*, 2005; Graverholt und Eriksen 2007]. Weiterhin besteht die Biomasse zu 26 bis 32 % aus Proteinen, 63 bis 69 % aus Polysacchariden und einem sehr geringen Fettanteil (Graziani *et al.*, 2013). Der Polysaccharidanteil wird zum Großteil durch Florideen-Stärke repräsentiert,

welches durch den Mikroorganismus u. a. als Kohlenhydratspeicher genutzt wird [Luca und Moretti 1983; Reed 1983; Fredrick 1987]. Jedoch hemmen für die Zellen verfügbare Kohlenstoffquellen beim (photo-)heterotrophen Wachstum die Synthese von Phycobiliproteinen [Rhie und Beale 1994; Sloth *et al.*, 2006].

Mit oder ohne der Notwendigkeit der Einbindung einer extremophilen Mikroalge in ein Bioraffineriekonzept stellt in beiden Fällen der Verbrauch von CO₂ für das Algenwachstum ein wichtiges Kriterium beim rein photoautotrophen Wachstum dar. Somit ist die Umsetzung eines solchen Konzeptes nur realisierbar, wenn eine entsprechende Kohlenstoffquelle, wie Abgase aus der Industrie, der Landwirtschaft oder von kommunalen Betrieben genutzt werden können. Gleichzeitig kann ein Handel mit CO₂-Emissionszertifikaten erfolgen. Auch wenn sich die Preise hierfür seit 2014 mit rund 5 € t⁻¹ laut Börsennotierung kaum geändert haben (börsennotierter Verlauf gesichtet am 20.02.2016), ergäben sich für technische Anlagen mit Flachplatten-*airlift*-Photobioreaktoren und der Sonneneinstrahlung in Eindhoven (Niederlande) mit einer maximal erreichbaren Photoeffizienz der Mikroalgen von 5 % 64 t ha⁻¹a⁻¹ Biotrockenmasse laut Norsker *et al.* [2011]. Mit der Angabe von Rosello Sastre und Posten [2010] für den Verbrauch von CO₂ zur Biomassesynthese von 1,83 kg kg⁻¹ CO₂ je Biotrockenmasse ergäben sich hiermit zusätzliche 589 € ha⁻¹ a⁻¹.

3. Material und Methoden

Sofern im Ergebnisteil keine anderen oder weiteren Angaben zu finden sind, wurden die Methoden wie im Folgenden dokumentiert durchgeführt. Alle verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt, BRD), J. T. Baker (Avantor Performance Materials, Center Valley, USA), Carl Roth GmbH & Co. KG, (Karlsruhe, BRD), Diagonal mbH & Co KG (Münster, BRD), Fluka (eine Marke von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), E. Merck KG (Darmstadt, BRD), Millipore (Merck-Millipore, Darmstadt, BRD), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und VWR (Randor, USA) in dem Reinheitsgrad *p.A.* oder HPLC grade bezogen. Alle Gase flüssiger Stickstoff und Kunsteis wurden von der Linde AG (Pullach, BRD) bezogen. Recyceltes Methanol für die HPLC wurde von der Sonderabfallentsorgung der Universität Bielefeld bezogen. Sofern eine besondere Relevanz vorlag, werden im Folgenden die Materialen- und Gerätehersteller explizit erwähnt.

3.1 Stammhaltung

Sicherungskulturen von *E. gracilis* und anderen wurden für 5 - 14 Tage bei 28 °C und 150 bis 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Lichtfluss auf Schüttlern bei 120 min^{-1} (Amplitude: 25 mm) kultiviert. Eine neue Sicherungskultur wurde mit 10 % (*v/v*) einer alten Kultur inokuliert. Vorkulturen wurden vor der Inokulation mikroskopisch auf mögliche Kontaminationen überprüft. Bei Arbeiten mit *E. gracilis* und dem CRAMER-MYERS-Medium (pH 6,8) mit 20 g L^{-1} Glucose \times H_2O wurden die Sicherungskulturen im heterotrophen Zustand auf einem Schüttler bei 120 min^{-1} (Amplitude: 25 mm) und 28 °C vorgehalten. Nach der Entwicklung des EG-Mediums konnten die Sicherungskulturen bis zu 1,5 Monate photoautotroph mit 95 % Luft und 5 % CO_2 (*v/v*) sowie einem Lichtfluss von 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kultiviert werden. Hier konnten auch fünf Tage alte Kulturen im Weiteren bei 4 °C, reiner Luft und einer periodischen Schwachlichtquelle ausgesetzt werden, wo die Kultur auch nach 5 Monaten wieder als Vorkultur dienlich sein konnte. Sicherungskulturen für *G. sulphuraria* erfolgten im Ford-Medium (pH 2,0) und 20 bis 55 g L^{-1} Glucose \times H_2O auf einem Schüttler bei 120 min^{-1} (Amplitude: 25 mm), 37-40 °C und 30 bis 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Vorkulturen für Versuchsanordnungen mit dem CM-Medium wurden unter heterotrophen Bedingungen angezogen, während für Versuchsanordnungen mit den EG-Medien photoautotroph gewachsene Kulturen aus der exponentiellen Phase entnommen wurden, wo gleiche Bedingungen wie oben beschrieben außer einen auf den Hauptversuch angepassten Lichtfluss vorherrschten.

3.2 Schüttelkolbenkultivierung

Kulturen wurden hetero-, photohetero- und photoautotroph in 300 mL Borosilikatglas-Weit-hals-Erlenmeyerkolben ohne Schikanen mit Silikonfilterstopfen kultiviert. Heterotrophe Kultivierungen fanden im Brutschrank Tri80Ü der Firma Memmert statt. Für photoautotrophe und photoheterotrophe Kultivierungen wurde ein Eigenbau-Brutschrank eingesetzt. In der ersten Phase dieser Arbeit wurden die Kulturen mit Leuchtstoffröhren (AquaGlo, Fa. Hagen, $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) illuminiert. In der späteren Phase dieser Arbeit fand die Illumination mittels Leuchtdioden (Firma Lumitronix, Typ LED-Matrix kaltweiß, einstellbar 130 bis $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bodenilluminert.

Bei vergleichenden phototrophen Experimenten ohne konstanter Kulturschichtdicke mit *E. gracilis* und dem CRAMER-MYERS-, als auch den PP-Medien wurden 100 mL Medium mit 10 mL heterotropher Vorkultur inokuliert. Die Vorkulturen wurden zuvor 5-10 Tage unter Lichtausschluss im CRAMER-MYERS-Medium mit 20 g L^{-1} Glucose $\times \text{H}_2\text{O}$ angezogen bis diese sich in der Stationärphase befanden. Die verwendeten Medien sind in Tabelle 3 dokumentiert. Vor der Inokulation erfolgte jeweils eine mikroskopische Untersuchung der heterotrophen Kulturen im Hinblick auf Kontaminationen sowie den Zustand der Zellen. Bei Versuchen mit konstanter Schichtdicke wurden die Kolben mit 50 mL Medium einschließlich der Kultur versehen, was der Kultur-Schichtdicke von 1 cm im Stillstand entsprach. Hierfür wurde ein Gesamtvolumen von 2 bis 5 L frischen Mediums mit einer photoautotrophen *E. gracilis*-Kultur entsprechend inokuliert, um eine OD bei 540 nm von 0,1 zu erhalten. Der Ansatz wurde anschließend auf die Schüttelkolben aliquotiert, wobei drei Schüttelkolben je Probenahmezeitpunkt entnommen wurden. Bei Versuchen mit konstanter Schichtdicke wurden die Kolben wegen der Wasserverdunstung aus der Kulturbrühe alle zwei Tage auf ihr Ausgangsgewicht zu Beginn der Kultivierung überprüft und ggf. mit sterilem ddH_2O wieder austariert. Weitere Kultivierungsparameter sind in der folgenden Tabelle 2 dokumentiert. Abweichungen wie z.B. bei Kultivierungen von *G. sulphuraria* sind dem jeweiligen Versuch im Ergebnisteil zu entnehmen. Je nach Versuchsansatz wurden die Kolben mit 50 bis 110 mL Medium inklusive Vorkultur versehen. Bei Arbeiten mit *E. gracilis* mit dem CRAMER-MYERS-, dem PP-Medium wurden 100 mL Medium mit 10 mL heterotropher Vorkultur inokuliert, welche zuvor 5-10 Tage unter Lichtausschluss in einem 20 g L^{-1} Glukose enthaltenden CRAMER-MYERS-Medium angezogen wurde und sich in der Stationärphase befand. Die Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 3 wiedergegeben. Vor der Inokulation erfolgte jeweils eine mikroskopische Untersuchung der heterotrophen Kulturen im Hinblick auf Kontaminationen sowie den Zustand der Zellen. Bei Arbeiten mit den EG-Medien erfolgen die Kultivierungen (wenn nicht anders angegeben).

Tabelle 2: Standardparameter bei Schüttelkolbenkultivierungen. Abweichungen hiervon sind im Ergebnisteil entsprechend dokumentiert. Bei heterotroph gewachsenen Kulturen lag der CO₂-Anteil der Luft bei 0,04 % (v/v).

Parameter	Wert
Inokulum	10 mL oder berechnet auf eine OD ₅₄₀ 0,1
Schüttelkolben-Volumen	300 mL
Arbeits-Volumen	50 oder 110 mL
pH	2 bis 8
Temperatur	28 ± 0,3 °C*
Schüttlerdrehfrequenz	120 min ⁻¹
Auslenkung	25 mm
Beleuchtungsstärke	130 bis 1000 µmol m ⁻² s ⁻¹
CO ₂ -Gehalt in der Gasphase (v/v)	5 % phototroph; ~0,04 % heterotroph
Relative Feuchte	Teilgeregelt über Abdampfschale

Phototrophe Kulturen mit 5 % CO₂ (und 95 % Luft) in der Gasphase wurden im entwickelten Photoinkubationsschrank auf Orbitalschüttlern mit speziellen Leuchtstoffröhren- oder LED-Illuminationsvorrichtungen inkubiert. Dieser Aufbau ermöglichte die Beleuchtung der großflächigen, planen Kolbenunterseite mit einer einstellbaren Lichtintensität von etwa 130 bis 1000 µmol m⁻² s⁻¹ bei einer horizontalen Rotation der Kolben bei einer Frequenz von 120 min⁻¹ und 25 mm Auslenkung. Der Gehalt vom CO₂ wurde in einem Hysteresebereich von 4,85 bis 5,15 % geregelt zugepumpt.

Die Hauptkomponenten wurden – wenn nicht anders angegeben – mit dH₂O angesetzt und bei 121 °C und 1 bar Überdruck 25 min lang dampfsterilisiert und anschließend mit sterilen Spurenelementen und ggf. Vitaminen ergänzt, womit das Endvolumen erreicht wurde.

Bei den Spurenelementen für die EG-Medien wurden die Salze in je 50 mL kochendem ddH₂O mit einem pH von 2,0 (1 M HCl) gelöst, auf die zuvor das EDTA × 2 H₂O × 2 Na gleichmäßig verteilt wurde. Anschließend wurden die Salze vereint und auf pH 1,0 (1 M HCl) eingestellt. Die Spurenelemente außer dem Eisensalz wurden als 2000x konzentrierte Lösung steril vorgehalten. Das Eisen wurde separat in ebenfalls saurem Wasser ohne EDTA als 10000x Lösung steril eingesetzt. Bei den Spurenelementen für das Ford-Medium wurde das Eisensalz zusammen mit dem EDTAx 2 H₂O × 2 Na als 750x Lösung steril vorgehalten. Die übrigen Spurenelemente wurden als 500x Lösung eingesetzt. Alle Spurenelemente wurden bei 121 °C und 1 bar Überdruck 25 min lang dampfsterilisiert. Die Vitaminlösung mit Thiaminhydrochlorid zu ≥99,0 % (w/w) rein und Cyanocobalamin ≥98,5 % (w/w) zu rein (beides von der Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in ddH₂O wurde mit einem 0,22 µm Sterilfilter (aus PES von Milipore) filtriert und steril bei 4 C in dunkeln gelagert.

Tabelle 3: Häufig in dieser Arbeit verwendete Medien aufgeteilt in Hauptkomponenten, Spurenelemente und ggf. Vitamine. Sofern beim CM-Medium der pH-Wert zur Kultivierung nicht verändert wurde, lag dieser bei pH 6,8. Relevante Vorgehensweisen sind unterhalb der Tabelle angegeben. Weitere Medienzusammensetzungen sind dem Text im jeweiligen Ergebnisteil zu entnehmen.

Medium	CM	EG2	EG5	EG5.1	EG6	PP	Ford
Komponente	g L ⁻¹						
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,23	0,20	0,50	0,50	0,20	0,02	0,30
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	0,50	0,50	0,50	0,34		1,50
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,03	0,10	0,10	0,03	0,10		0,02
EDTA × 2 H ₂ O × 2 Na	-	0,01	0,01	0,01	0,01		
KH ₂ PO ₄	1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,02	
K ₂ HPO ₄	-	-	-	-	-	-	0,30
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	-	-	-	-	-		
NaCl	-	-	-	-	-	-	0,02
NaC ₆ H ₅ O ₇ × 5,5 H ₂ O	0,36	-	-	-	-		
KNO ₃	-	-	-	-		0,20	
Proteosepepton	-	-	-	-		1,00/2,00	
Glucose × H ₂ O	22,0 ¹	-	-	-		5,5/11,0/22,0	55,0 ²
pH (HCl/NaOH)	3,5/5,0/7,0		2,0 bis 3,5			8,0	2,0
Spurenelemente	mg L ⁻¹						
EDTA × 2 H ₂ O × 2 Na	-			1,00		-	15,15
Co(NO ₃) ₂	1,30			1,30		-	
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	-			-		-	0,04
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	1,80			1,80		-	1,82
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,02			0,02		-	0,08
H ₂ MoO ₄	0,20			0,20		-	-
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O				-			0,03
H ₃ BO ₃	-			-		-	2,86
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,40			0,40		-	0,22
Fe ₂ (SO ₄) ₃ × 6 H ₂ O	3,00			-		-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃ × 7 H ₂ O				-			12,60
FeCl ₃	-			1,00		-	-
(NH ₄)VO ₃	-			-		-	0,04
pH (HCl/NaOH)	-			1,0		8,0	-
Vitamine	mg L ⁻¹						
Thiamin × HCl	0,01			0,01		-	-
Cyanocobalamin	0,05			0,05/0,0015 ³		-	-

¹ Nur bei heterotropher oder photoheterotropher Anzucht.

² Glucose × H₂O wurde bei den Sicherungskulturen eingesetzt – dargestellte Ergebnisse wurden mit Glycerin in den jeweils angegebenen Konzentrationen durchgeführt.

³ Die Mediumvariante mit reduzierter Cyanocobalaminkonzentration wird im Text deutlich hervorgehoben als reduzierter Vitamingehalt.

3.3 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Zur Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration wurde je nach Kultivierungsphase mit Probenvolumina der Kulturbrühe zwischen 10 und 250 mL durchgeführt. Die Proben wurden bei 7500 RZB (6K-15 von SIGMA, Osterode am Harz, BRD), 15 min und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Dekantieren wurde das Pellet in 1 mL einer 3 g L⁻¹ NaCl- Lösung resuspendiert und dabei in zuvor getrocknete und gewogene 2 mL Mikroreaktionsgefäße überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (16000 RZB, 3 min, RT mit der 5415D-Zentrifuge von Eppendorf, Hamburg, BRD) und Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 500 µL Leitungswasser resuspendiert und nach schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden 24 h lang lyophilisiert (BETA 1-8K, Typ 100802 von Christ, Osterode am Harz, BRD) und erneut gewogen, um über eine Differenzwägung die Biotrockenmassekonzentration zu bestimmen.

3.4 Extraktion und Bestimmung der Tocopherolkonzentration

Die getrockneten Proben aus der Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration wurden mit 1,0 mL Methanol versetzt und zwei Stunden bei 37 °C mit 15 min⁻¹ im dunklen invertiert. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert (16000 RZB, 10 min, RT) und 800 µL des Extrakts in HPLC-Gläschen überführt. Zusätzlich zu den Proben wurden in der HPLC α -Tocopherol-Standards mit 1 mg mL⁻¹, 5 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹ (DL- α -Tocopherol, \geq 97 % rein von Alfa-Aesar/Thermo Fisher, Karlsruhe, BRD) und (\pm)- α -Tocopherol, \geq 97 % rein von Fluka/Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in mindestens dreifacher Ausführung mitgeführt. Bei Untersuchungen aller Isoformen wurden zusätzlich δ - und γ -Tocopherol-Standards (jeweils \geq 95,5 % rein, beides von Supelco, Bellefonte, USA) mit jeweils 10 und 20 mg L⁻¹ verwendet. Als Laufmittel wurde 100 % (v/v) Methanol mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL min⁻¹ verwendet und als stationäre Phase eine C18-Umkehrphasen-Säule. Die Detektion erfolgte über einen Fluoreszenz Detektor bei einer Anregung von 286 nm und einer Emission von 330 nm. Ressourcenschonend wurde das von der HPLC verwendete Methanol aufgefangen (zu Beginn Methanol HPLC *grade*) und von der hauseigenen Destillation wieder für den HPLC gebrauch destilliert. Der Wassergehalt der Destillate lag zwischen 50 und 400 ppm. Für alle HPLC und GC-Analysen wurden HPLC Gefäße (1,5 mL farblos mit Schraubgewinde, Mikroglasssätze (μ -Einsätze, 250 µL, farblos), Septen mit einseitiger PTFE-Beschichtung und Schraubverschlüsse von der Techlab GmbH (Braunschweig, BRD) verwendet. Die Standards für α -, δ - und γ -Tocopherol und ein Tocopherolmix wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Bei der quantitativen Tocopherol-Analytik wurden in Laufe der Arbeit zwei verschiedene Systeme verwendet:

Chromstar-Anlage

Zu Beginn dieser Arbeit (Kultivierungen im CM-Medium) wurde für die Auftrennung des Probengemisches eine VertexPlus Column 150 × 4,6 mm Eurospher II 100-5 C18P Säule (mit Vorsäule, 15VE182E2J, Knauer, Berlin) verwendet. Als Laufmittel diente 100 % Methanol, welches mit der Pumpe (Pump Σ 871, Irica, Tokio) mit einem Volumenstrom von 1 mL min⁻¹ durch die Anlage gepumpt wurde. Das Laufmittel wurde zunächst entgast (Degasser 1, Techlab, Braunschweig) und gelangte daraufhin auf die Säule, welche in einen Säulenofen (T-6300, E. Merck, Darmstadt) auf 30 °C temperiert wurde. Ein Probevolumen von 20 oder 50 μ L wurde durch den Autosampler (Midas K-4052, Spark Holland B. V., Emmen, NL) auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Nach Auftrennung durch die Säule erfolgte die Detektion mittels Fluoreszenzdetektor (RF-551, Shimadzu, Duisburg). Dabei wurde die Fluoreszenz mit 286 nm angeregt, die Aufnahme der Emission fand bei 330 nm statt. Nach Messung eines α -Tocopherolstandards konnte die α -Tocopherolkonzentration in den Proben durch Zuordnung der Retentionszeit und Integration der Signalflächen der Standards für eine Kalibriergerade ermittelt werden. Die Steuerung der Chromatographie sowie die Datenaufnahme und Auswertung erfolgten mit der Steuerungssoftware ChromStar Light (Version 6.3, Software für Chromatographie und Prozessanalytik GmbH).

Clairty-Anlage

Zum späteren Zeitpunkt dieser Arbeit wurden alle Messungen (Kultivierungen in allen übrigen Medien) mit einem anderen HPLC-System durchgeführt. Der oben beschriebenen Ablauf der Analytik entspricht dem der „Chromstar“-Anlage – für die „Clairty“-Anlage wurde eine andere Pumpe (Hitachi L-6200 A, E. Merck, Darmstadt), ein anderer Autosampler (Marathon, Spark Holland B. V., Emmen, NL) und eine andere Steuerungssoftware (Clairty, Version 3.0.5.505, Laserchrom HPLC Laboratories Ltd) eingesetzt. Als Säule diente eine Nucleodur 100-5 C 18 ec 125 × 4 mm (Macherey Nagel) und als Laufmittel 97 % (v/v) Methanol und 3 % (v/v) ddH₂O, wobei der Wassergehalt vom destillierten Methanol einbezogen wurde. Die Proben wurden in einen Mikroglyseinsatz (250 μ L) für HPLC Gefäße (1,5 mL) aufgegeben, wodurch etwa 250 μ L Probevolumen das Gefäß bis zum Septum füllten. Hierdurch zeigten die Ergebnisse eine geringere Standardabweichung von technischen Replikaten als zum Teil befüllte HPLC Gläschen ohne Mikroglyseinsatz. Durch eine volle Auftrennung aller Komponenten/Signale mit dieser Säule im gewählten Wellenlängenbereich konnten auch die Tocopherol-Isomere quantifiziert werden.

3.5 Bestimmung der Biotinkonzentration

Für die quantitative Bestimmung der Biotinkonzentration im Medium wurden zellfreie Überstände aus der Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration verwendet.

Zum einen wurde eine chromatographische Methode verwendet, bei der die „Clairity“-Anlage, wie unter Punkt 3.4 mit einer VertexPlus Column 150 × 4,6 mm Eurospher II 100-5 C18P Säule mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 mL min⁻¹ mit 4,3 mmol Hexansulfonsäure / Methanol (85:15) zur Analyse diente. Das Laufmittel wurde mit Phosphorsäure auf pH 3,0 eingestellt und die Säulentemperatur auf 40 °C. Die Detektion wasserlöslicher Vitamine erfolgte über einen UV-Detektor bei 217 nm.

Eine weitere sehr sensitive und selektive Methode bietet ein indirekter Nachweis über Streptavidin und fluoreszenzmarkiertes Biotin B-4-F (GERBU, Heidelberg, BRD). Hierfür wurden 985 µL Probe mit einem zellfreien Überstand von *Streptomyces avidinii* auf 1 mL komplettiert. Es folgte eine Inkubation von 15 Minuten, in denen vorhandenes Biotin an Streptavidin gebunden hat. Anschließend wurden 20 µL der Proben-Streptavidin-Lösung mit 980 µL B-4-F Puffer (50 nM biotin-4-Fluorescein, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA und 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,5) vereint. Während einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten band an die noch freien Stellen der Streptavidin-Tetramere fluoreszenzmarkiertes Biotin. Anschließend erfolgte die Anregung des fluoreszenzmarkierten Biotins bei 495 nm und die Aufnahme der Emissionswellen bei 525 nm im Shimadzu RF 5301PC Fluoreszenzphotometer (Kyoto, Japan). Generell erfolgte hierbei die Quantifizierung des Biotins in PS-Küvetten (Brand GmbH, Wertheim, BRD) durch die Fluoreszenzlöschung (*quenching*) des markierten Biotins B-4-F. Sofern viel Biotin in der Probe vorlag, konnte wenig B-4-F gebunden und somit gequenchet werden. Damit ergab sich ein starkes Fluoreszenzsignal. Als Kalibriergerade dienten bekannte Biotinkonzentrationen und eine Referenzprobe mit Wasser statt Probe [Müller *et al.*, 2013].

3.6 Qualitative und quantitative Bestimmung der Pigmente

Die Analyse der Pigmente erfolgte mit Hilfe der HPLC. Die in Mikroalgen vorliegenden Pigmente mussten hierzu zunächst extrahiert werden. Hierzu wurden 5 mg Trockenbiomasse in 1,0 mL 90 % Aceton mit CaCO₃ gesättigt resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte im Ribolyzer (Precellys 24 von Precellys/Bertin, Villeurbanne, Frankreich) in verschraubbaren Reaktionsgefäßen (Precellys/Bertin, Villeurbanne, Frankreich) und 0,5 mL Schüttvolumen Silica Kugeln (Durchmesser 0,1 mm, Carl Roth) bei 6500 min⁻¹ mit 3 × 45 s Intervallen und je 15 s Intervallpausen. Nach einer Stunde Inkubation/Extraktion im Dunkeln bei RT wurde der Zelldebris durch Zentrifugation bei 16000 RZB für 2 min bei RT abgetrennt. Der partikelfreie Überstand

wurde un-/verdünnt für die HPLC eingesetzt. Zur Auftrennung der Pigmente diente eine Accucore™ Polar Premium Säule (RP-C18: 150mm × 4,6mm, mit Vorsäulenfilter von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in HPLC-Anlage der Firma Thermo Finnigan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit einem TSP Degasser, einem TSP AS 3000 Autosampler, der Pumpe TSP P4000 Pump, einem Säulenofen TSP und dem TSP UV6000 Detektor. Als Laufmittel dienten A: 0,1 M Ammoniumacetat/Methanol (15:85) und B: Methanol/Acetonitril/Aceton (44:43:13) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL min⁻¹. Die Injektionsspritze wurde vor jeder Injektion mit Methanol gereinigt. Der Laufmittelgradient wurde, wie in Tabelle 4 wiedergegeben, eingestellt.

Tabelle 4: Profil des Gradienten der zwei Laufmittel A und B für die Pigment-HPLC-Bestimmung. Nach 75 min wurde die Anlage 5 min äquilibriert. Weitere Details siehe Text.

Zeit / min	Fließgeschwindigkeit / mL min ⁻¹	Laufmittel A / %	Laufmittel B / %
0	0,2	100	0
31	0,2	75	25
47	0,2	0	100
70	0,2	0	100
75	0,2	100	0

Die Detektion erfolgte von 190 bis 800 nm in 1 nm Schritten bei 1 Hz Abtastgeschwindigkeit. Diskreter Kanal: 440 nm. Zur Quantifizierung dienten folgende Pigmente-Standards: Chlorophyll c3, Chlorophyll c2, Peridinin, 19-but-Fucoxanthin, Fucoxanthin, 19-hexanoyloxy-4keto-fucoxanthin, 19-hex-fucoxanthin, Neoxanthin, Violaxanthin, Diadinoxanthin ddx, Antheraxanthin, Diatoxanthin dtx, Canthaxanthin, Lutein, Zeaxanthin, Chlorophyll b, Echinenon, Chlorophyll a, Chlorophyll c2-MGDG, Lycopene, α -Carotin, β -Carotin und Pheophytin.

3.7 Bestimmung von Stoffen/Substraten mittels des Hach-Lange Tests

Verschiedene Untersuchungen zum Substratverbrauch wurden quantitativ mit Hilfe von Hach-Lange Test-Kits und den entsprechenden Geräten (DR 2800 und HAT 200S von Hach-Lange GmbH, Düsseldorf, BRD) unter Einhaltung der Methodenvorschrift durchgeführt. Quantifiziert wurden mit Küvettentests folgende Stoffe: Ammonium mit LCK 302, Gesamtstickstoff mit LCK 338, Phosphat mit LCK 350 und LCK 049, Kalium mit LCK 328, Magnesium mit LCK 326, Sulfat mit LCK 153 und TOC (*total organic carbon*) mit LCK 386 (alle von Hach-Lange, Düsseldorf, BRD). Da sich Mischungen von Salzen auf die Test-Ergebnisse auswirken können,

wurde stets auch das Frischmedium zur Einschätzung des Fehlers untersucht, wo die Einwaage aller Stoffe bekannt gewesen ist.

3.8 Bestimmung von Zuckern, Alkoholen und org. Säuren

Die quantitative Bestimmung von Glucose, Fruktose, Glycerin, Acetat, Ethanol, Methanol erfolgte mittels HPLC.

Für die Konzentrationsbestimmung der Substrate wurden 800 μL der Probe mit 2 μL einer 100 g L^{-1} Natriumazidlösung versetzt und mittels HPLC analysiert. Die Durchführung der Methode erfolgte mit einem automatischen Probengeber (Marathon der Firma Spark Holland, Emmen, Niederlande), einem Injektionsventil (Modell 7010 von Rheodyne, IDEX Health & Science, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) mit einer 20 μL Probenschleife, einer IRICA Pumpe (Modell $\Sigma 871$, Kyoto, Japan), einer Nucleogel ION300 OA Säule (300 mm \times 7,8 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) sowie einem Brechungsindex-Detektor ERC-7515 A, einem Säulenofen (Gecko 2000) und einem Entgaser ERC-3612(ERMA CR. INC., Tokio, Japan) für das Laufmittel. Als mobile Phase diente 2,5 mM Schwefelsäure, die mit einem Volumenstrom von 0,8 mL min^{-1} durch die bei 70 $^{\circ}\text{C}$ temperierte Säule gefördert wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Chromstar Light (Version 6.3, Software für Chromatographie und Prozessanalytik GmbH, Weyhe-Leeste, Deutschland). Die Berechnung der Konzentrationen des jeweiligen Stoffes wurde mittels einer Kalibriergerade bewerkstelligt, wobei hierzu die Signalfächen der eingesetzten Standards mit jeweils 5, 10 und 20 g L^{-1} verwendet wurden.

3.9 Bestimmung der Paramylonkonzentration

Zur Bestimmung des Paramylongehaltes wurden die Proben aus der Bestimmung des Gehalts an α -Tocopherol weiterverwendet. Das Pellet wurde in 1 mL Ethanol mit Hilfe eines Mikrospatels resuspendiert und zentrifugiert (16000 RZB, 4 min, RT), wobei hier und im Folgenden die 5415D Zentrifuge von Eppendorf (Hamburg, BRD) verwendet wurde. Dieser Ethanolwaschschritt wurde solange wiederholt bis der Überstand nach dem Zentrifugieren farblos und das Pellet gelblich-weiß erschien. Das Pellet wurde in 1 mL 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,6) resuspendiert in welchem zuvor 1 g L^{-1} Trypsin (T4799 von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) resuspendiert wurde. Nach einer Inkubation über Nacht auf einem Vertikalrotator bei 37 $^{\circ}\text{C}$ wurden die Proben zentrifugiert (16000 RZB, 4 min, RT) und der Überstand verworfen. Mit Hilfe eines Mikrospatels wurde das Pellet in 1 mL 500 g L^{-1} Harnstofflösung resuspendiert und zentrifugiert (16000 RZB, 4 min, RT). Sofern noch eine gräuliche Schicht nicht vollständig verdauter Proteine auf dem weißen Pellet vorlag, wurde dieser Schritt wiederholt bis nur noch

ein weißes Pellet nach der Zentrifugation sichtbar war. Der Überstand wurde jedes Mal verworfen und das Pellet im Anschluss zweimal in 1 mL ddH₂O resuspendiert und wieder zentrifugiert (16000 RZB, 4 min, RT). Im Anschluss wurden die Proben getrocknet und gewogen, wobei aus der Gewichts Differenz und dem Probevolumen der Gehalt an Paramylon in der Probe bestimmt wurde.

3.10 Bestimmung der Viabilität

Zur Bestimmung der Viabilität wurden 900 µL aus einer Kultur entnommen und mit 100 µL Trypanblaulösung versetzt. War die Kultur in einer fortgeschrittenen Phase wurde auf Grund der zu erwartenden Zellzahl eine Verdünnung angesetzt, indem 450 µL Kultur mit 450 µL 0,9 % (w/w) NaCl Lösung und 100 µL Trypanblaulösung versetzt wurden. Die Zellzahl in diesen Gemischen wurde mit Hilfe einer Neubauer *improved* Zählkammer ermittelt. Dabei erschienen tote Zellen im Mikroskop blau. Für jede Probe wurden zwei Großquadrate (Fläche 1 mm²) ausgezählt und durch die Höhe der Kammer (0,100 mm) die Zellzahl an lebenden und toten Zellen pro Milliliter errechnet. Daraus wurde das Verhältnis von lebenden und toten Zellen gebildet.

3.11 Lipidextraktion und Fettsäuren-Derivatisierung zu FAME

Das im Jahre 1987 von der internationalen Gemeinschaft beschlossene Montreal Protokoll für den Schutz der Ozonschicht spricht gegen den Einsatz der Methode der Lipidextraktion von Blich und Dyer und der Verwendung von Chloroform [Blich und Dyer 1959]. Im Sinne der Nachhaltigkeit wurde deshalb eine alternative Methode nach Smedes [1999] verwendet, welche im Folgenden kurz beschrieben wird. Die Wahl der Derivatisierungsmethode nach Xu *et al.* [2010] im Abschnitt 3.7.2. wurde verwendet, um ein möglichst unverfälschtes Fettsäurespektrum insbesondere der langen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu erhalten.

3.11.1. Lipidextraktion

Für die Extraktion von Lipiden aus Makroalgen werden oft unpolare Lösungsmittel ohne einen vorigen Zellaufschluss genutzt [Manirakiza *et al.*, 2001]. Bei der verwendeten Methode nach Smedes [1999] werden die ungefährlicheren Chemikalien Cyclohexan und 2-Propanol zusammen mit Wasser in einem 8:10:11 (v/v/v) Verhältnis verwendet. Cyclohexan dient als unpolare Phase, in die die Lipide extrahiert werden, während das polare 2-Propanol für die Bildung des Zweiphasensystems sorgt. Zwar werden mit dieser Methode vergleichsweise weniger Lipide

extrahiert, wie in Abbildung 10 beim Ansatz D3 zu erkennen ist, jedoch überwiegen die Vorteile einer risikoarmen, umweltschonenden Durchführung im Hinblick auf die Praxistauglichkeit.

Für die Lipidextraktion wurden lyophilisierte Proben verwendet, welche mit 1,0 mL ddH₂O, 1,6 mL 2-Propanol und 2,0 mL Cyclohexan versetzt und 3 min gerührt wurden. Nach der Zugabe von 1,2 mL ddH₂O wurden die Proben für eine schnelle Phasentrennung bei 900 RZB, 10 min bei RT zentrifugiert. Danach wurde die obere Phase in zuvor getrocknete und gewogene Glasbecher überführt und 1,5 h bei 60 °C in einem Vakuumtrockenschrank getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Glasbecher erneut abgekühlt gewogen. Aus der Gewichtsdiﬀerenz wurde die Lipidkonzentration und mit der Biotrockenmassekonzentration der Lipidanteil in der Probe bestimmt.

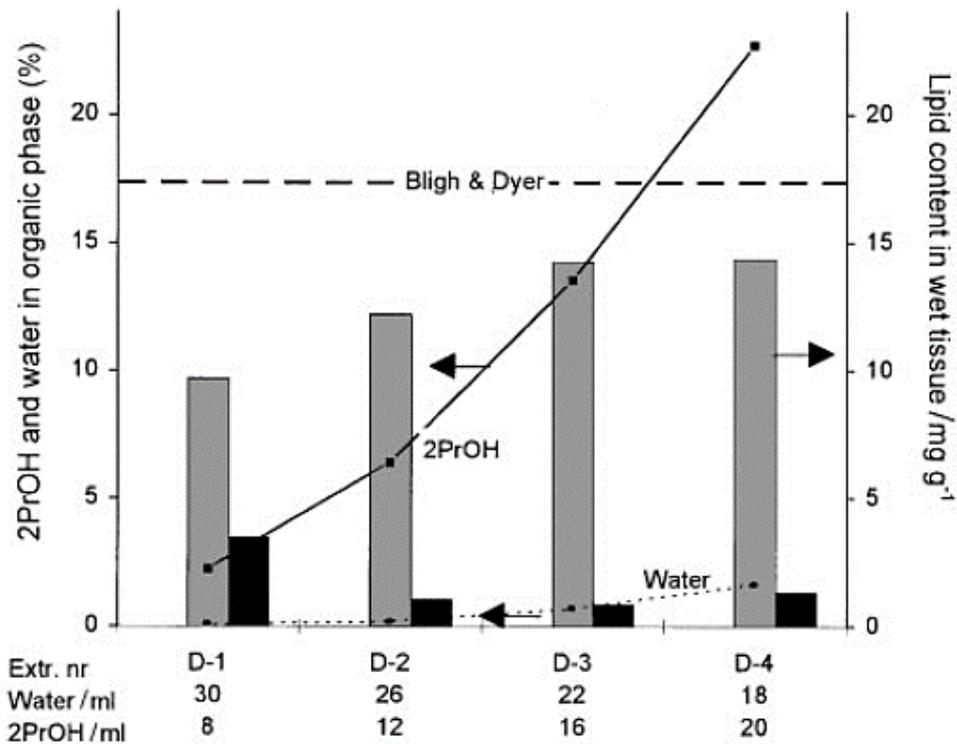


Abbildung 10: Wiedergabe der Ergebnisse der Lipidextraktion von Smedes [1999]. Zu sehen sind Resultate verschiedener Mischungsverhältnisse verglichen mit der Lipidextraktion nach Bligh und Dyer [1959]. Graue Balken: Lipidselektivität in mg g⁻¹ in der Cyclohexanphase; schwarze Balken: Lipidselektivität bei Rückextraktion der Propan-2-ol-Phase in mg g⁻¹; gestrichelte Linie: Lipidselektivität in der Chloroformphase mit der Bligh und Dyer-Methode in mg g⁻¹. Linie bzw. Punkt-Linie: Anteil von Propan-2-ol respektive Wasser in der Cyclohexanphase. D-1 bis D-4 beziehen sich auf verschiedene Cyclohexan-Propan-2-ol-Wasser-Gemische bei der Extraktion, wobei D-3 dem im Rahmen dieser Arbeit gewählten Gemisch entspricht [Smedes 1999].

3.11.2. Derivatisierung von Fettsäuren zu FAME

Um eine gaschromatografische Untersuchung des Lipidgemisches hinsichtlich der Fettsäuren zu erleichtern wurden die Fettsäuren zu Fettsäuremethylestern derivatisiert. Gebundene Fettsäuren werden von ihren Liganden getrennt und zugleich wird eine Methylgruppe angehängt, wodurch der Siedepunkt verringert wird. Je nach Wahl der Derivatisierungsmethode können auch extreme Bedingungen (Temperatur) bei der Reaktion vorliegen, die langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu kürzeren Fettsäuren zerfallen lassen [Fournier *et al.*, 2006]. Alternativ bietet sich eine säurekatalysierte Derivatisierung nach Xu *et al.* [2010]. Bei dieser Methylierung werden Fettsäuren in einem einzigen Schritt extrahiert und zu FAME verestert. Die Reaktion findet mit einem 1:4 (v/v) Benzol-Methanol-Gemisch statt, bei der Acetylchlorid als Säuredonor dient. Die Reaktion von Acetylchlorid mit Methanol zu Methylacetat und Salzsäure liefert den Katalysator. Da es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, wird Methanol im Überschuss zugegeben. Nach der Methylierung wird überschüssige Salzsäure durch die Zugabe einer wässrigen Kaliumcarbonatlösung neutralisiert und präzipitiert als Kaliumchlorid. Zugleich sorgt die Zugabe von Wasser dafür, dass sich ein Zweiphasensystem ausbildet. Methanol und Wasser bilden eine polare Phase während die FAME in die unpolare Benzolphase extrahiert werden.

Zur FAME-Derivatisierung wurden die getrockneten Proben in 500 µL Benzol aufgenommen. Hiervon wurden 50 µL Probe und 40 µL interner GC-Standard (1 g L⁻¹ C17:0 in Benzol) in 2 mL MeOH/Benzol-Gemisch (4:1 (v/v)) aufgenommen. Nachdem die Ansätze in flüssigem Stickstoff abgekühlt worden waren, ist durch langsame Zugabe von 200 µL Acetylchlorid die Derivatisierungsreaktion gestartet und über Nacht bei RT fortgeführt worden. Am Folgetag wurden langsam 5 mL einer 60 g L⁻¹ K₂CO₃-Lösung zugefügt. Nach Zentrifugation (450 RZB, 10 min, RT) wurden 200 µL der oberen Phase in HPLC Gläschen mit Mikroglaseinsatz überführt und analysiert oder bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

3.12 Gaschromatographie: Quantifizierung von FAME

Zur Ermittlung der einzelnen Fettsäuren, wurden die derivatisierten Proben mittels Gaschromatographie untersucht. Die Laufzeit einer Analyse betrug 50 bis 56 min, mit einem Temperaturgradient von 50 - 250 °C. Die Maximaltemperatur wurde nach 32,5 min erreicht. Die Parameter der verwendeten Säule und Methode sind in den Tabellen 5 und 6 angeführt. Bei jeder Messung wurde ein interner Standard eingesetzt, der zur genauen Berechnung aller anderen Fettsäurekonzentration dienlich war. Als am weitesten verbreitete Methode der FAME-Quantifizierung beruht sie auf dem Einsatz eines internen Standards, wobei die Wahl auf eine Fett-

säure fällt, die in den zu untersuchenden Proben nicht vorzufinden seien sollte. Dementsprechend bieten sich seltene Fettsäuren wie C17:0 und C23:0 an. Vom internen Standard wird ein Gemisch mit bekannter Konzentration angelegt. Bei der Derivatisierung der unbekanntenen Proben kann nun eine definierte Menge des internen Standards zugegeben werden. Nach der gaschromatographischen Analyse wird dann aus dem Chromatogramm die Signalfäche des internen Standards seiner Konzentration gleichgesetzt. Die Konzentration anderer FAME kann

Tabelle 5: Spezifikationen der für die FAME-Analytik eingesetzten Säule.

Vorsäule	
Name, Hersteller	Desaktivierte Kapillarsäule (Vorsäule), Macherey-Nagel
Stationäre Phase	CW-desaktiviert
Länge / m	10,0
Innendurchmesser / mm	0,25
Außendurchmesser / mm	0,40
Trennsäule	
Name, Hersteller	OPTIMA FFAPplus, Macherey-Nagel
Stationäre Phase	Polyethylenglycol-2-nitroterephthalsäureester (USP G35)
Länge / m	30,0
Innendurchmesser / mm	0,25
Außendurchmesser / mm	0,40
Filmdicke / μm	0,50

Tabelle 6: Verwendete Methodenparameter bei der Analyse von FAME in der GC.

Parameter/Gase	Wert/Name
Injektionsvolumen	1,0 μL
Split	10
Injektionsmodus	Probe
Anzahl Spülungen mit Probe	1
Anzahl Spülungen <i>Pre-Run</i>	5
Anzahl Spülungen <i>Post-Run</i>	5
Spülmittel	Benzol
Betriebsmodus der GC	Konstanter Druck bei 160,0 kPa (<i>pressure mode</i>)
Säulentemperatur	55 °C - 250 °C @ 6 °C min^{-1} , für 37,5 min halten
Detektortemperatur	250 °C
Injektortemperatur	250 °C
Trägergas	Helium
Zünd- und Brenngas für FID	Wasserstoff, synthetische Luft

dann aus dem Verhältnis ihrer Signalfäche zu der des internen Standards ermittelt werden [Eder, 1995]. Neben diesem internen C17:0 Standard wurde eine Kalibrierung mit Hilfe des Standards Supelco 37 FAME-Mix und Supelco *Menhaden fish oil* 4-7116 (beides von Supelco, Bellefonte, USA) durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung vom definierten Standard 37 FAME-Mix ist in Tabelle 7 wiedergegeben. Durch diese Kalibrierung war nur eine qualitative

Aussage möglich und konnte anschließend nur über eine Berechnung mit dem internen Standard anteilig quantifiziert werden. Zur Berechnung der jeweiligen Fettsäurekonzentration C_{FAME} aus der Kalibrierung mit dem Supelco 37 FAME Standard wurde Gleichung 1 verwendet.

Tabelle 7: Komponenten (IUPAC-Name) des GC-Standards Supelco 37 FAME Mix.

Komponente	Gewichtsanteil / %
C4:0 – Butansäuremethylester	4
C6:0 – Hexansäuremethylester	4
C8:0 – Oktansäuremethylester	4
C10:0 – Decansäuremethylester	4
C11:0 – Undecansäuremethylester	2
C12:0 – Dodecansäuremethylester	4
C13:0 – Tridecansäuremethylester	2
C14:0 – Tetradecansäuremethylester	4
C14:1 – 9-Tetradecaensäure methylester	2
C15:0 – Pentadecansäuremethylester	2
C15:1 – <i>cis</i> -10-Pentadecaensäuremethylester	2
C16:0 – Hexadecansäuremethylester	6
C16:1 – 9-Hexadecaensäuremethylester	2
C17:0 – Heptadecansäuremethylester	2
C17:1 – <i>cis</i> -10-Heptadecaensäuremethylester	2
C18:0 – Octadecansäuremethylester	4
C18:1n9c – <i>cis</i> -9-Octadecaensäuremethylester	4
C18:1n9t – <i>trans</i> -9-Octadecaensäuremethylester	2
C18:2n6c – <i>cis</i> -9,12-Octadecadiensäuremethylester	2
C18:2n6t – <i>trans</i> - <i>cis</i> -9,12-Octadecadiensäuremethylester	2
C18:3n6 – (γ)- <i>cis</i> -6,9,12-Octadecatriensäuremethylester	2
C18:3n3 – (α)- <i>cis</i> -9,12,15-Octadecatriensäuremethylester (ALA)	2
C20:0 – Eicosansäuremethylester	4
C20:1n9 – <i>cis</i> -11-Eicosensäuremethylester	2
C20:2 – <i>cis</i> -11,14-Eicosadiensäuremethylester	2
C20:3n6 – <i>cis</i> -8,11,14-Eicosatriensäuremethylester	2
C20:3n3 – <i>cis</i> -11,14,17-Eicosatriensäuremethylester	2
C20:4n6 – <i>cis</i> -5,8,11,14-Eicosatetraensäuremethylester	2
C20:5n3 – <i>cis</i> -8,11,14,17-Eicosapentaensäuremethylester (EPA)	2
C21:0 – Uncosansäuremethylester	2
C22:0 – Docosansäuremethylester	4
C22:1n9 – <i>cis</i> -13-Docosensäuremethylester	2
C22:2 – <i>cis</i> -13,16-Docosadiensäuremethylester	2
C22:6n3 – <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäuremethylester (DHA)	2
C23:0 – Tricosansäuremethylester	2
C24:0 – Tetracosansäuremethylester	4
C24:1n9 – <i>cis</i> -15-Tetracosensäuremethylester	2

Dabei werden die vom Gerät aufgenommenen Signalflächen der jeweiligen Fettsäure als FAME (Signalfläche_{FAME}) und des internen Standards (Signalfläche_{IS}), wobei die Konzentration des internen Standards c_{IS} und der folgend erklärte TRF_{FAME} bekannt sein müssen.

$$c_{FAME} \text{ [g L}^{-1}\text{]} = \frac{\text{Signalfläche}_{FAME} \cdot \text{TRF}_{FAME}}{\text{Signalfläche}_{IS}} \cdot c_{IS} \quad (\text{Gl. 1})$$

Der TRF_{FAME} (*theoretical response factor*) der jeweiligen Fettsäure ergibt sich wie folgt:

$$\text{TRF}_{FAME} [-] = 1 + \left(1 - \frac{C_{\text{aktiv}}}{C_{IS}}\right) \quad (\text{Gl. 2})$$

Der Faktor kann aus der Struktur einer Fettsäure abgeleitet werden, da nur sogenannte aktive Kohlenstoffatome in der Fettsäure ein Signal in der Detektion der Gaschromatographie erzeugen. Somit ist C_{aktiv} der Gewichtsanteil der aktiven Atome am jeweiligen FAME und C_{IS} der Gewichtsanteil der aktiven Atome im internen Standard C17:0. Die für diese Arbeit ermittelten Werte sind in Tabelle 8 wiedergegeben.

Tabelle 8: Berechnete TRF für die in dieser Arbeit detektierten Fettsäuren.

Fettsäure	TRF	Fettsäure	TRF
C17:0	1,00	C18:1	0,98
C4:0	1,34	C18:2	0,98
C5:0	1,28	C18:3n6	0,97
C6:0	1,23	C18:3n3	0,97
C7:0	1,19	C20:0	0,98
C8:0	1,15	C20:1n9	0,97
C9:0	1,13	C20:2	0,96
C10:0	1,10	C20:3n6	0,96
C11:0	1,08	C20:3n3	0,96
C12:0	1,06	C20:4n6	0,95
C13:0	1,05	C20:4n3	0,95
C14:0	1,03	C20:5n3	0,94
C14:1	1,03	C22:0	0,96
C15:0	1,02	C22:1n9	0,96
C15:1	1,01	C22:2	0,95
C16:0	1,01	C23:0	0,96
C16:1	1,00	C24:0	0,95
C17:1	0,99	C22:6n3	0,93
C18:0	0,99	C24:1n9	0,94

Generell erzeugen Methylgruppen-Kohlenstoffatome, nicht aber Carboxylgruppen-Kohlenstoffatome ein Signal bei der Detektion am Flammenionisationsdetektor (FID). Dabei korreliert die Signalintensität mit dem relativen Gewichtsanteil der aktiven Kohlenstoffatome am gesamten FAME [Perkins *et al.*, 1962; Ackman und Sipos, 1964]. Zuletzt wird der Gewichtsanteil

aktiver Kohlenstoffatome am FAME für den internen Standard als 1,0 definiert. Für die zu quantifizierenden FAME wird entsprechend der Gewichtsanteil der Kohlenstoffatome relativ zum internen Standard berechnet. Bei relativ zum internen Standard kürzeren Fettsäuren ergibt sich ein TRF >1,0 bzw. umgekehrt für Fettsäuren länger als der interne Standard. Ist eine Fettsäure (mehrfach) ungesättigt, steigt der Gewichtsanteil der Kohlenstoffatome am FAME und somit sinkt der TRF-Wert im Vergleich zur gesättigten Fettsäure gleicher Länge. Für eine weitere quantitative Auswertung spezifischer Fettsäuren und der Validierung der ersten Methode, wurde für die vier Fettsäuren C12:0, C14:0, C16:0 und C18:0 eine (externe) Kalibrierreihe mit fünf verschiedenen Konzentrationen mit 0,05, 0,10, 0,25, 0,50 und 1,00 mg L⁻¹ angelegt. Die externe Kalibrierung wurde regelmäßig angepasst, da durch den Verschleiß der GC-Säule (bzw. die sinkende Kapazität) sonst die Ergebnisse beider Methoden zunehmend auseinander drifteten – abhängig von der Auslastung der GC-Säule.

3.13 Zellaufschluss durch das Gefrier-Tau-Verfahren

Für das Gefrier-Tau-Verfahren wurde die Kulturbrühe bei 8000 RZB 10 min bei 4 °C zentrifugiert, im gleichen Volumen ddH₂O gewaschen und erneut wie oben angegeben zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension im gleichen Volumen ddH₂O wurden die Suspension in ein Polypropylen-Beutel gefüllt, so dass eine dünne Suspensionsschicht von 1 bis 2 cm entstand. Anschließend wurde der Beutel mit Inhalt flach liegend bei -20 °C für 3 h oder über Nacht eingefroren und wieder bei Raumtemperatur aufgetaut. Dieser Gefrier-Tau-Zyklus wurde mehrmals wiederholt, um ein Aufschlussgrad zu erhalten, wie mit einer Kugelmühle. Der Aufschluss mit der Kugelmühle wurde als vergleichender Totalzellaufschluss verwendet, wobei hierzu die Methode nach Linka *et al.* [2008] mit geändertem Aufschlusspuffer (Natriumphosphat- statt Kaliumhydroxid-Puffer bei pH 7) eingesetzt wurde. Als Zusätze wurden 1 mM EDTA und 5 mM DTT verwendet. Der Volumenanteil der Glaskugeln mit einem Durchmesser von 0,4 bis 0,6 mm lag bei 50 %. Die Zellen wurden 4 min bei einer Frequenz von 20 s⁻¹ mit der Kugelmühle (Desintegrator S von IMA, Germersheim, BRD) und Glaskugeln mit 0,4 bis 0,6 mm Durchmesser und 50 % Volumenanteil zermahlen. Nach der Vermahlung und nach jedem Gefrier-Tau-Zyklus wurden die zerstörten Zellen mikroskopisch bewertet und die Suspension auf ihre C-PC-Konzentration untersucht. So benötigte eine Suspension mit *G. sulphuraria*-Zellen acht bis zehn Gefrier-Tau-Zyklen für einen ausreichenden Aufschluss der Zellen. Dieser Wert ist jedoch von der Biomasse abhängig – vergleichende Versuche im Vorfeld mit *Athrospira platensis* benötigten hierzu nur 5 Zyklen.

3.14 Extraktion und Analytik von Phycocyanin

Extraktion von Phycocyanin

Zum Einsatz kam ein wässriges Zwei-Phasen-System (ATPE), welches von Albertsson [1986] beschrieben wurde. Anhand der Informationen zur Zusammensetzung für ein Zwei-Phasen-System mit 7,93 % (w/w) PEG 4000 sowie 15,30 % (w/w) Kaliumsalze (pH 7,0) und der Henderson-Hasselbalch-Gleichung zur Berechnung der Einwaage der Kaliumsalze für einen pH von 7,0 wurde ein System mit der Konodenlänge von 31,14 % erstellt. Diese Konodenlänge liegt nah am Wert von Patil und Raghavarao [2007] mit 35,53 %, wo mit einem leicht veränderten System und einem pH von 7,2 gearbeitet wurde. Das System wurde mit Zellextrakt bzw. mit ddH₂O verdünntem Zellextrakt auf 100 % (w/w) mit ddH₂O aufgefüllt.

Die Extraktion fand in Größenordnungen von 50, 100 und 500 g unter mehrmaligem schütteln des Scheidetrichters statt. Anschließend ruhte der Scheidetrichter 30 min (RT), um das Ausbilden der zwei Phasen zu ermöglichen. Über den Hahn am unteren Ende konnte die untere Phycocyanin arme Salz-Phase abgelassen werden. Die obere Phase wurde danach weiteren Extraktionen zugeführt. Bei jedem Schritt wurde aus jeder Phase 1 mL Probe für die Analytik entnommen. Für eine Mehrfach-Extraktion wurde nach der ersten Extraktion zunächst die Phycocyanin arme Salzphase entfernt. Anschließend wurde eine frische, mit ddH₂O angesetzte Salzphase, zur PEG-Phase gegeben. Es folgen, wie oben beschriebenen, die gleichen Schritte. Dieser Vorgang kann theoretisch beliebig oft wiederholt werden, jedoch werden zunehmend weniger unerwünschte Stoffe und vielmehr der Zielstoff aus dem System entfernt. Diese Trenngrenze ist durch das Verteilungsgleichgewicht des Systems bedingt.

Bestimmung der Phycocyanin-Reinheit

Die Reinheit wurde anhand von C-PC photometrisch aus dem Verhältnis der Absorption bei 620 nm und 280 nm ermittelt. Hierzu wurde das Absorptionsmaximum von C-PC bei 620 nm und die Absorption durch aromatische Aminosäuren in Proteinen bei 280 nm verwendet [Eriksen 2008].

$$\text{Reinheit}_{\text{C-PC}}[-] = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (\text{Gl. 3})$$

Bestimmung der Phycocyanin-Konzentration

Über die Korrelationen von Kursar und Alberte [1983] wurden die C-PC- und A-PC-Konzentration photometrisch mit Hilfe der Gleichungen 4 und 5 bestimmt:

$$c_{\text{C-PC}}[\mu\text{g L}^{-1}] = 166 \cdot A_{618} - 108 \cdot A_{650} \quad (\text{Gl. 4})$$

$$c_{\text{APC}} [\mu\text{g L}^{-1}] = 200 \cdot A_{650} - 52,3 \cdot A_{618} \quad (\text{Gl. 5})$$

Mit der Konzentration und dem Volumen der Ausgangslösung bzw. der jeweiligen Phase der Extraktion kann die Menge an C-PC berechnet werden.

3.15 SDS-PAGE-Analytik und Gel-Färbung mit colloidalem Coomassie

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch eine diskontinuierliche denaturierende Tris-Glycin Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Zur Analyse von Proteingemischen wurden 15%ige Polyacrylamid(PAA)-Gele verwendet, die in eine vertikale Kammer aus Plexiglas eingespannt wurden. Über den Trenngelen wurden 1 cm hohe 5%ige Sammelgele gegossen, um die Proteingemische vor der Auftrennung zu fokussieren. Die Trenngele wurden zwischen spezielle, durch Silikondichtungen versiegelte, Grünglasplatten gegossen und zum Auspolymerisieren unter Luftausschluss mit 500 μL Isopropanol überschichtet. Die Zusammensetzung ist der Tabelle 9 zu entnehmen. Die Polymerisation erfolgte für 40 min bei RT. Nach Entfernen des Isopropanols, spülen mit ddH₂O und trocknen mit Druckluft wurden die Gemische für Sammelgele auf die Trenngele gegossen und die Kämme für die Probenaschen eingesetzt. Die Gele polymerisierten bei 37 °C innerhalb von 20 min aus. Nach der Polymerisation wurden die Kämme wie auch die Silikondichtungen entfernt und die Gele in die PAGE-Kammer eingesetzt. Anschließend wurde die Kammer (Eigenkonstruktion der mechanischen Werkstatt der technischen Fakultät, Universität Bielefeld) an der Anoden- und Kathodenseite mit Tris-Glycin Laufpuffer (25 mM Tris (pH 8,3), 192 mM Glycin und 1 g L⁻¹ SDS) befüllt. Zur Probenvorbereitung wurden je 30 μL Probe mit 10 μL 4x Laemmli-Puffer (100 mM Tris-HCl, 200 g L⁻¹ Glycerin 99,5 % (w/w), 200 mM Dithiothreitol, 40 g L⁻¹ SDS, 0,2 g L⁻¹ Bromphenolblau) vermischt und zur Denaturierung für 5 Minuten bei 96 °C inkubiert. 13,3 μL jeden Probenansatzes wurden auf die Gele appliziert (je 10 μL Probe und 3,3 μL 4x Laemmli-Puffer pro Tasche). Als Größenstandard diente der PageRuler Prestained Protein Ladder™ (#SM0671 von Fermentas/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) mit 6 μL je Tasche. Während des Durchlaufs der Proben durch das Sammelgel wurde eine konstante Stromstärke von 10 mA/Gel eingestellt, nach dem Übergang der Bromphenolblau-Bande in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 14 mA/Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Laufmittelfront unten aus den Gelen auslief. Nachdem die Platten entfernt und das Sammelgel verworfen wurde, ist das Trenngel 10-20 min in ddH₂O gewaschen worden, um überschüssiges SDS aus dem Gel zu entfernen bevor es gefärbt wurde. Die Gelfärbung erfolgte mit colloidalem Coomassie Brilliant-Blue G250 (CBB G250) bestehend aus 10 % (v/v) Essigsäure 100 %, 25% (v/v) 2-Propanol, 65 % (v/v) ddH₂O und 2 g L⁻¹ CBB G250, welches

nach dem Ansetzen und vor dem Gebrauch einmalig über Nacht geschüttelt wurde (unter den gleichen Bedingungen, wie *E. gracilis*-Kulturen im dunkelen kultiviert wurden). Zur Färbung

Tabelle 9: Zusammensetzungen des Sammel- und Trenngels mit unterschiedlichen Mengen Polyacrylamid (PAA) für die SDS-PAGE-Analyse.

Sammelgel 5% (50 g L ⁻¹ PAA)		Trenngel 15% (150 g L ⁻¹ PAA)	
Komponente	Volumen	Komponente	Volumen
ddH ₂ O	775 µL	ddH ₂ O	760 µL
0,25 M Tris (pH 6,8)	1250 µL	1 M Tris (pH 8,8)	2810 µL
Bis/ Acrylamid (0,8%, 30%)	425 µL	Bis/ Acrylamid (0,8%, 30%)	3750 µL
5 % (w/w) SDS	50 µL	5 % (w/w) SDS	150 µL
10 % (w/w) Ammoniumpersulfat	25 µL	10 % (w/w) Ammoniumpersulfat	37,5 µL
TEMED	3 µL	TEMED	5 µL

wurde das Gel mit der Färbelösung überschichtet, in der Mikrowelle kurz aufgeköcht und dann über Nacht gefärbt. Nach dem Färben wurde das Gel mit dH₂O entfärbt, wobei das Wasser mehrmals gewechselt wurde, bis proteinfreie Bereiche des Gels eine vergleichsweise sehr geringe Färbung aufwiesen.

3.16 Bestimmung des Biogasertrages

Die Bestimmung des Biogasertrages wurde gemäß der VDI-Richtlinie VDI-4630 bzw. DIN EN ISO11734 durchgeführt [VDI 2006]. Hierzu wurden 200 mg organischer Trockensubstanz (oTS) von 10 Tage alten Mikroalgen-Kulturen oder anderen Stoffen als Substrat und 60 mL Klärschlamm eingesetzt. Die Biomasse wurde vor dem Einsatz zweifach mit ddH₂O gewaschen, um die Verfälschung der Ergebnisse durch Medienkomponenten zu verhindern. Vor dem Verschließen des Ansatzes mit einem Gummistopfen (14,9 mm mit umstülpbarem Rand von Saint Gobain, Courbevoie, Frankreich) wurde der Kopfraum mit Stickstoff sauerstofffrei gespült. Die anaerobe Umsetzung wurde bei 37 °C unter täglicher Aufnahme des Drucks mit dem Druckmessgerät (WAL BMP-Testsystem, Type 3151, Wal, BRD) im Satzversuchgefäß (260 mL Braunglasflasche) und des aktuellen Luftdrucks. Der verwendete Klärschlamm wurde von der Kläranlage Heepen der Stadtwerke Bielefeld (Bielefeld, BRD) bezogen und im ausgefaulten Zustand (ohne eigenes Substrat) eingesetzt. Als Referenzmaterial diente die mikrokristalline Cellulose Avicel®. Der Gasertrag im mL g⁻¹ oTS wurde mit Hilfe der folgenden Gleichung 6 ermittelt:

$$V_n = V_1 \frac{(p_1 - p_w) \cdot T_n}{p_n \cdot T_1} \quad (\text{Gl. 6})$$

V_n : Volumen des trockenen Gases unter Normalbedingung in mL; V_1 : Gasvolumen im Kopfraum des Satzreaktors in mL; p_1 : Gemessener Druck im Kopfraum des Satzreaktors in mbar, p_w : Dampfdruck des Wassers bei T_1 in mbar; T_n : Normtemperatur von 273 K; p_n : gemessener Luftdruck in mbar, T_1 : Reaktionstemperatur in K (gemessen im Wasserbad). Der Dampfdruck p_w wurde mit Hilfe der Antoine-Näherung aus Gleichung 7 berechnet.

$$p_w = 10^{\frac{A - \frac{B}{C + T_1}}{1,33}} \quad (\text{Gl. 7})$$

mit:

$$A = 8,07131$$

$$B = 1730,63 \text{ und}$$

$$C = 233,426.$$

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Entwicklung eines neuen Bioraffineriekonzeptes bedingte eine starke Dynamik im Entwicklungsprozess, zumal verschiedene Forschungsfelder zusammengeführt werden mussten. Die folgenden Ergebnisse skizzieren diesen Werdegang. Zunächst werden die wichtigsten Geräte und Modelle bzw. Studien vorgestellt, deren Entwicklung ein Teil dieser Arbeit war. Es folgt eine Charakterisierung des Produktionsorganismus, welche zeigt, wie einfach der Zustand der Kultur erfasst werden kann. Im Weiteren sind einige verschiedene Medium- und Wachstumscharakteristika und die hieraus resultierende Medienoptimierung beschrieben. Dabei ist zu beachten, dass die Kultivierungen im CM-Medium mit nicht konstanten Kulturschichtdicken durchgeführt wurden, da Mehrfach-Beprobung aus Schüttelkolben und die Wasserverdunstung die Schichthöhe schmälerten. Bei Arbeiten mit den EG-Medien und 1 cm Kulturschichtdicke im Ruhezustand (ab dem Abschnitt 4.5.3 bis 4.6.4) erfolgten die Kultivierungen mit konstanten Schichtdicken, was entsprechend kenntlich gemacht wurde. Hierzu wurden Versuchsanordnungen mit 20 bis 60 Schüttelkolben durchgeführt, sodass je Probenahmezeitpunkt drei Schüttelkolbenkulturen entnommen wurden (keine Mehrfach-Beprobung je Schüttelkolben). Die Wasserverdunstung wurde während der Kultivierungen alle zwei Tage mit sterilem ddH₂O und mit Hilfe des Ausgangsgewichtes eines jeden befüllten Schüttelkolbens zu Beginn der jeweiligen Kultivierung kompensiert. Derart werden dann ausführliche Untersuchungen mit dem neuen Produktionsmedium in Schüttelkolben lichtflussabhängig und in Photobioreaktoren dargelegt, welche die Optimierung des gesamten Prozesses zur Produktherstellung beschreiben. Zum Ende werden einerseits zentrale Aspekte des *upstreams* und *downstreams* behandelt und andererseits die Nutzung schwefelbelasteter heißer Rauchgase im Bioraffinerie-Konzept erörtert. Durch die großen Datenmengen wurde zu Gunsten der Übersichtlichkeit auf eine Fehlerfortpflanzung verzichtet. Aufgrund der in der Regel geringen Standardabweichungen wird im Folgenden ersichtlich, dass auch eine Fehlerfortpflanzung geringe Werte erbracht hätte. Ausnahmen mit großen Standardabweichungen traten vereinzelt auf und hingen meist mit der methodischen Fehlerbehaftung zusammen. Die in den Diagrammen dargestellten Messpunkte wurden durch Linien verbunden. Diese Verbindungslinien stellen nicht den tatsächlichen Verlauf dar und wurden der Übersichtlichkeit halber eingeführt.

4.1 Konstruktion relevanter Geräte

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche, aber auch um Fragestellungen im Rahmen der Umsetzung dieses Bioraffineriekonzeptes mit *E. gracilis* zu beantworten, wurden verschie-

dene Geräte und Modelle konstruiert. Zu Beginn dieser Arbeit waren entsprechende kommerzielle Geräte generell oder aber mit den gewünschten Eigenschaften nicht verfügbar. Konstruiert wurden deshalb Photobioreaktoren samt Illumination, Beleuchtungseinheiten für Orbital-schüttler, ein Sedimentationsrohr und ein Zellabsetzer, Lichtsensoren für Bioreaktoren und ein Solarsegel zur Sonnenlichtreflektion zum Bioreaktor. Die für die Versuche relevanten Geräte werden im Folgenden beschrieben. Zunächst wird auf die Illumination von *E. gracilis* eingegangen. Detailzeichnungen zu den Bioreaktoren und dem Zellabsetzer befinden sich im Anhang unter Punkt 7.3. Alle Geräte mit metallischen Elementen wurden mit Hilfe der mechanischen Werkstatt der technischen Fakultät der Universität Bielefeld realisiert.

4.1.1. Illumination von Schüttelkolbenkulturen

Die Illumination phototroph wachsender Organismen stellt eine wichtige Größe der verfahrenstechnischen Optimierung dar. Zur Biomasse- bzw. Produktmaximierung sollte im optimalen Fall eine ausreichende Beleuchtung aller Zellen in jeder Volumeneinheit des Kultivierungsgefäßes während des Kultivierungsprozesses gewährleistet sein. Da eine optische Dichte bei 540 nm von eins schnell erreicht ist, kommen entsprechend nach einem Zentimeter nur noch 10 % des eingestrahnten Lichtes an. Zudem ist der Verbrauch an Photonen zur photosynthetisch betriebenen Assimilation von CO₂ bei Kultivierungen hoch und die Effizienz des Photosystems vergleichsweise gering (Pulz *et al.*, 1998). Für eine optimale Illumination der phototrophen Kultivierungen von *E. gracilis* zu Forschungszwecken können sowohl Leuchtstoffröhren wie auch LED als energetisch günstige Lichtquellen in Frage kommen. Leuchtstoffröhren geben hierbei eine homogenere Verteilung des Lichtes als LED ab, fallen aber dafür bei Dauereinsatz in ihrer Effizienz deutlich schneller ab. Die aktive Leuchtfläche ist dafür bei LED wesentlich geringer, was sich auf verschiedene Konstruktionen positiv auswirkt. Einerseits strahlen die LED Licht von der Oberfläche des Leuchtmittels aus divergierend in eine Richtung im Gegensatz zu Leuchtstoffröhren, wodurch plane Photobioreaktorflächen direkt (ohne Reflektion) erreicht werden. Andererseits wird bei aktuellen Hochleistungs-LED-Emittern mehr Leistung je Leuchtfläche erreicht als bei Leuchtstoffröhren oder anderen Leuchtmitteln, womit sich kleine Konstruktionen von Photobioreaktoren mit Starklichtillumination besser realisieren lassen. Da sich der Markt für LED – insbesondere für LED-Emitter und -Arrays – erst in den letzten Jahren sehr stark entwickelt hat, wurden zu Beginn auch Leuchtstoffröhren zur Illumination eingesetzt und gleichzeitig zahlreiche LED in verschiedenen Ausführungen untersucht, wobei Leistung, Abstrahlwinkel, Wellenlängenspektrum die Hauptkriterien waren. Primär war das spezifische Wellenlängenspektrum des Leuchtmittels ausschlaggebend, da phototrophe Organismen hauptsächlich im blauen und roten Wellenlängenbereich Photonen absorbieren und auch *E. gracilis* ihre Absorptionsmaxima bei etwa 435 und 666 nm besitzt [Shibata *et al.*, 1954]. Die entsprechenden Leuchtmittel wurden deshalb mit einem Wellenlängenmessgerät

überprüft. Ausgewählt für die Illumination wurden letztendlich die Leuchtstoffröhren Aqua-GLO der Firma Hagen (AquaGLO T8, 18000 K von Rolf C. Hagen Inc., Montreal, Kanada), da diese die Absorptionsmaxima von *E. gracilis* am besten abgedeckt haben. Diese Leuchtmittel kamen im intern illuminierten Blasensäulenreaktor und für Schüttelkolbenkultivierungen zum Einsatz. Nachteilhaft war hier jedoch die Ausführung als T8 Leuchtstoffröhren, da diese höhere Betriebstemperaturen um 37 °C erzeugten, die es bei Kultivierungen abzuführen galt. Ausführungen in T5 mit Betriebstemperaturen um 30 °C der Firma Sylvania (FSL F8 T5, 4200 K von Havells Sylvania Ltd., London, GB) mit ähnlichen Spektren haben eine kurze Lebensdauer und starke Degeneration der Innenbeschichtung bei Dauerbetrieb gezeigt. Nach einer Auswahl geeigneter LED wurden die Illuminationseinheiten nach und nach umgebaut. Zur Illumination einzelner Schüttelkolben wurden sogenannte LED-Matrices eingesetzt, welche aus je einem Modul à 3 × 3 SMD-LED von Lumitronix (LED Matrix warmweiß von Lumitronix, Hechingen, BRD) mit SMD-LED von Nichia (NSSL157AT-H3 von Nichia Corporation, Kaminaka-Cho, Japan) bestanden. Die Wellenlängenspektren der gewählten Leuchtmittel sind im Vergleich in der folgenden Abbildung 11 gezeigt. Durch die oben erwähnte typische Abstrahlrichtung von LED-Emittern konnte der Lichtfluss mit einem Abstrahlwinkel von 120 ° gezielter zum Kolbeninhalt geschehen, wenn auch das Lichtfeld inhomogener war, als bei Leuchtstoffröhren. Weiterhin war die Betriebstemperatur niedriger und die kompakte Bauweise ermöglichte es, mehr Stellplätze je Schüttler zu schaffen. Bei Leuchtstoffröhren konnten nur Experimente bei kon-

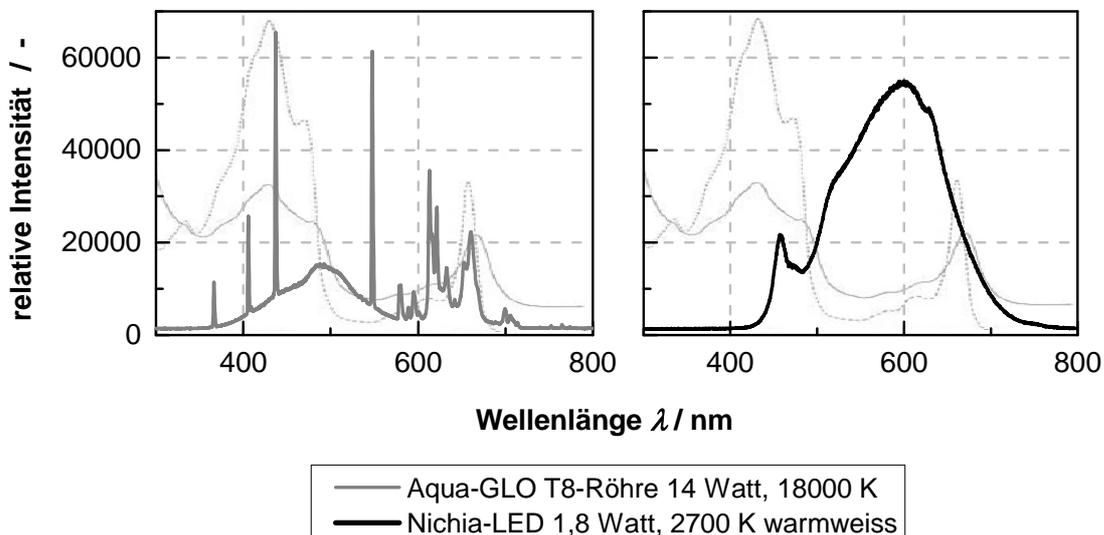


Abbildung 11 links: Wellenlängenspektren der Leuchtstoffröhre Aqua-GLO (Firma Hagen, Montreal, Kanada) und **rechts:** LED-Matrix warm-weiß von Lumitronix (Hechingen, BRD) mit LED NSSL157AT-H3 (Nichia Corporation, Kaminaka-Cho, Japan). Im Hintergrund der Graphen ist das Absorptionsspektrum von *E. gracilis* entnommen aus Shibata *et al.* [1954] abgebildet, wobei die durchgezogene Linie die Absorption vom Rohextrakt in Wasser und die gepunktete Linie (höhere Absorptionswerte) den Zellextrakt in Ethanol darstellt. Die Absorptionsmaxima liegen bei 435 und 666 nm. Details siehe Text.

stantem Lichtfluss von $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durchgeführt werden, während bei den LED-Konstruktionen mit Hilfe von digital angesteuerten Potentiometern bestimmte Lichtflüsse von 50 bis $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zur Wahl gestanden haben.

4.1.2. Illuminationsaufsätze für Orbitalschüttler

Die ersten Aufsätze für Orbitalschüttler wurden mit Hilfe ausgesuchter Leuchtstoffröhren mit einem möglichst geringen Gewicht konstruiert. Neben der Bodenplatte aus Aluminium waren die Haltewände der Glasscheibe aus Polypropylen, die transparente Scheibe aus 4 mm Grün- glas mit vernachlässigbarer Eigenabsorption im relevanten Wellenlängenbereich. Die Schüt- telkolben wurden durch eine Halterung aus Plexiglas direkt unter der Leuchtstoffröhre positio- niert. Jeder Aufsatz mit fünf Leuchtstoffröhren bot somit 15 Stellplätze, wobei je drei Plätze von einer Aqua-GLO T8 Röhre (Firma Hagen, Montreal, Kanada) illuminiert wurden. Bei fünf Röhren wurden ein einflammiges und ein vierflammiges Vorschlaggerät in einer dünnen Me- tallverschalung untergebracht. Mit Kabelkanälen und Silikon wurde der Aufsatz weitestgehend spitzwassergeschützt angefertigt. Ein Exemplar ist in der folgenden Abbildung 12 dargestellt. Insgesamt wurden drei Schüttleraufsätze angefertigt, womit 45 parallele Kultivierungsplätze zur Verfügung standen. Bei Kultivierungen wurden Mehrfachansätze zufällig verteilt. Die Ge- räte sind nach rund vier Jahren ohne Zwischenstörungen weiter im Betrieb, wobei ein regel- mäßiger Austausch (Überprüfung der Lichtflussstärke jeden Monat – ein Austausch war in der Regel nach acht bis 10 Monaten nötig) der Leuchtmittel gleichbleibende Lichtflussverhältnisse

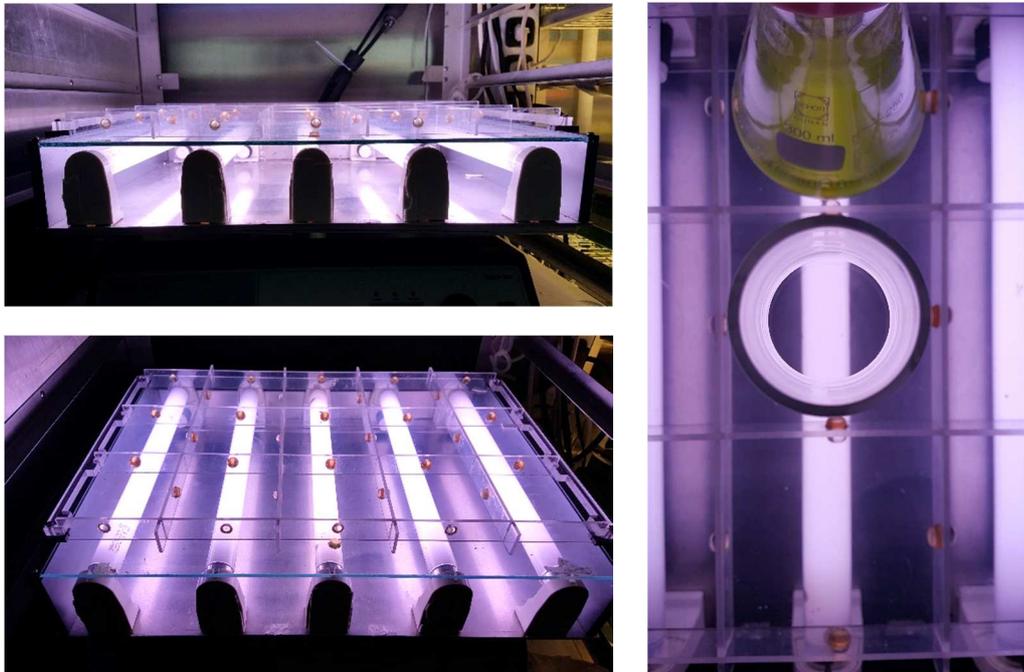


Abbildung 12: Illuminationsaufsatz für Orbitalschüttler mit Leuchtstoffröhren AquaGlo der Firma Hagen (Montreal, Kanada). Über jeder Röhre konnten drei Kolben positioniert, um von unten illuminiert zu werden. Details siehe Text.

gewährleistete. Nachdem adäquate Qualitäten bei LED für die Schüttleraufsätze zur Verfügung standen, wurde eine weitere Version auf Basis je einer LED-Matrix für jeden Schüttelkolben entwickelt, welche in Abbildung 13 zu sehen ist.

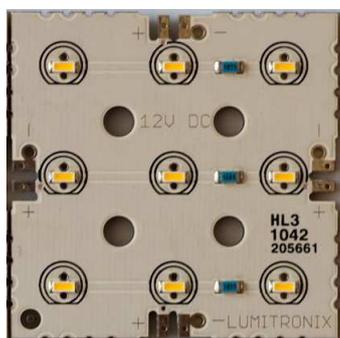


Abbildung 13: 3 x 3 LED-Matrix der Firma Lumitronix mit je 9 SMD-LED vom Typ NSSL157AT-H3 (Nichia, Corporation, Kaminaka-Cho, Japan). Details siehe Text.

Der Vorteil dieser Leuchtmittel lag in der sehr flachen Konstruktionsmöglichkeit (3 mm), einem sicheren 12 V Betrieb, der für die verwendeten Schüttelkolben passenden Kantenlänge eines Matrix-Moduls, der geringen Wärmeentwicklung im Vergleich zur Power-LED, der Dimmbarkeit, der Möglichkeit eines schnellen Austausches bei eventuellen Defekten und letztendlich der bereits oben genannten Hauptkriterien. Die LED-Matrices wurden auf einer Aluminiumplatte mit Plastikschrauben und 3 mm Abstandhaltern montiert, wobei die Platte zusätzlich Bohrungen für Luftkühler erhalten hat. Die Wandplatten aus Polypropylen als Glasplattenhalterung fielen von der Bauhöhe deutlich kleiner, wie beim Vorgängermodell, aus. Die Stromversorgung über drei Transformatoren (BV 07/056 mit 5 A bei 12 V/DC von Weiss Elektrotechnik GmbH, Johanniskirchen, BRD) zusammen mit der Steuerung wurden extern montiert und mit einer digitalen Funksteuerung (VM162 von Velleman, Gavere, Belgien) angesteuert. Somit konnten schrittweise die Lichtflüsse reproduzierbar erhöht werden, wobei die Stromversorgung der drei konstruierten Aufsätze entsprechend eingestellt werden konnte, ohne den Brutschrank selbst öffnen zu müssen. Es wurden drei Schüttleraufsätze mit je 20 Stellplätzen konstruiert, sodass 60 parallele Kultivierungen durchgeführt werden konnten. Die folgenden Abbildungen 14 und 15 zeigen einen der konstruierten Aufsätze. Die Orbitalschüttler wurden immer mit einer Drehfrequenz von 120 min^{-1} betrieben. So ergab sich neben der permanenten Illumination von unten zusätzlich ein heller Lichtkegel, der bedingt durch die geringere Flüssigkeitssäule zweimal je Sekunde im Kreis durch die Kulturbrühe wanderte, was einem Blitzeffekt für das jeweilige Volumenelement ähnelte. Dadurch sollte eine möglichst hohe Lichtintegration erreichen werden, um die Photosynthese-Effizienz wachsender Zellen zu maximieren [Phillips und Myers, 1954; Terry 1968]. Eine Rotation ist in Abbildung 16 mit einem mit 100 mL Kultur befüllten Kolben wiedergegeben. Jeder Schüttleraufsatz wurde mit zwei Ventilatoren versehen, die Luft zwischen die Glas- und Montageplatte von vorne angesaugt bzw. hinten ausge-



Abbildung 14: Konstruierter Illuminationsaufsatz mit ansteuerbaren SMD-LED Beleuchtung. **Links:** Aufsicht der 20 Stellplätze. **Rechts:** Installation auf einem Orbitalschüttler und separatem Thermometer mit externem Sensor (roter Punkt) auf der Glas- bzw. Stellfläche.



Abbildung 15: Konstruierter Illuminationsaufsatz mit ansteuerbaren SMD-LED Beleuchtung im Detail. **Links:** Aufsicht in einen illuminierten Schüttelkolben. **Rechts:** Leerkolben und Kulturen mit unterschiedlichem Kulturalter.

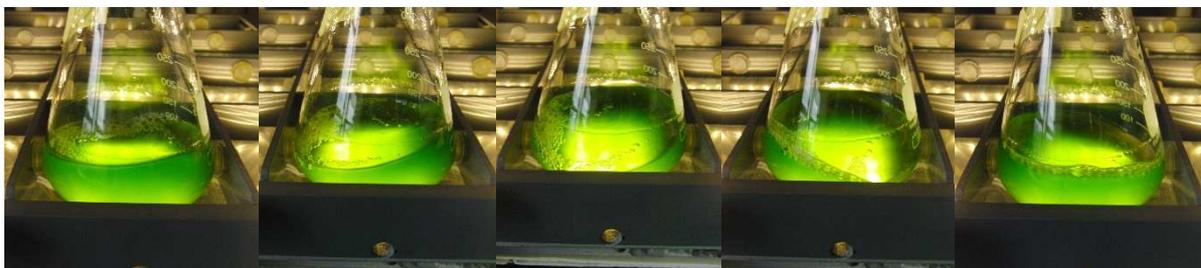


Abbildung 16: Durchmischungsverhalten von 100 mL Kulturbrühe innerhalb einer Rotation, ein Bild alle 0,1 s; Schüttlerdrehfrequenz: 120 min⁻¹, Auslenkung: 25 mm. Illumination: 500 μmol m⁻² s⁻¹.

blasen haben. Weiterhin besaß jeder Aufsatz ein eigenes Thermometer, wobei der Sensor direkt auf der Glasplatte montiert worden war.

4.1.3. CO₂-Brutschrank

Da für alle Schüttelkolbenkultivierungen gleiche Bedingungen vorliegen sollten, wurde ein Brutschrank mit den Innenmaßen 133 x 141 x 70 cm eigenständig umgebaut. Der Brutschrank ohne Herstellerangaben war eine Schenkung der AG Kruse der Uni Bielefeld. In der folgenden Abbildung 17 ist der Brutschrank im Ganzen und fokussiert auf den Bereich zur Kultivierung dargestellt.



Abbildung 17 links: Modifizierter Brutschrank mit eingebauten CO₂- und Temperaturregelung, zusätzlicher Kühlung und über eine Fernbedienung regulierbaren und statischen Stromstärkequellen (12 V) für die LED-Illuminationsaufsätze. **Rechts:** Parallelkultivierung von 60 Schüttelkolben auf 3 LED Illuminationsschüttlern und zum Vergleich einem Vorgängermodell mit Leuchtstoffröhren.

Der Schrank bestand aus 3 mm Edelstahl mit Doppelwänden, die mit PU-Schaum ausgefüllt waren und zwei Türen, welche große Glasfronten einfassten. Der für die Wärmeentwicklung der Leuchtsysteme zu schwache Kompressor wurde durch einen speziell angefertigten Wärmetauscher aus Kupferrohren mit Aluminiumlamellen mit einer Kühlfläche von 10,8 m² (Fa. Wätas, Olbernhau, BRD) ersetzt, welcher mit Kühlwasser (~15 °C) vom hausinternen Kältewerk versorgt wurde. Die Kühlung erfolgte gesteuert über ein Thermostat (UT200 von Conrad Electronic SE, Hirschau, BRD) und Magnetschalter (Gewas 191 AN von GHM Greisinger Messtechnik GmbH, Regenstauf, BRD) ab einer Temperatur von 29,0 °C wieder auf 28,0 °C.

Die Anreicherung der Luft mit 5 % (v/v) CO₂ wurde mit Hilfe eines CO₂-Sensors (GMT221 von Vaisala Oyj, Helsinki, Finnland) mit Steuereinheit gesteuert, welcher mit einem stromlos geschlossenen Magnetschalter (SGC262C002 von ASCO Numatics GmbH, Ölbronn-Dürrn, BRD) einen Hysteresebereich von 4,85 und 5,15 % (v/v) aufrecht hielt. Hierfür wurde der CO₂-Sensor zentral im Brutraum installiert. Ein zusätzliches Heizelement war durch die starke Wärmeentwicklung der Geräte im Inkubationsraum nicht erforderlich. Von der ursprünglichen Elektronik des Brutschrankes wurden lediglich die drei Ventilatoren verwendet und mit vier weiteren ergänzt, um mit einer Ventilationsleistung von etwa 320 W ein homogenes Temperaturfeld zu erreichen.

4.1.4. Intern illuminiertes Blasensäulenphotobioreaktor

Zur Konstruktion eines nicht dampfsterilisierbaren Photobioreaktors nach dem *airlift*-Prinzip wurden Borosilikatrohre der Firma QVF (Mainz, BRD) mit einer Lichttransmission von 90 % im PAR-Bereich verwendet. Hierbei wurden zwei Rohre gleicher Länge (100 cm) mit unterschiedlichem Durchmesser ineinander gesteckt, so dass zwischen dem Außenrohr mit ID 10 cm und AD 11,8 cm (PS 100/1000 von QVF, Mainz, BRD) und dem Innenrohr mit ID 4,0 cm und AD 4,8 cm (PS 40/1000 von QVF, Mainz, BRD) der Reaktorinnenraum mit etwa 5 cm Schichtdicke und 6 L Gesamtvolumen entstand. An den Enden wurden die Rohre durch Deckel aus 4 mm Edelstahl 1.4571 oder 10 mm Plexiglas (PMMA) mit Hilfe von Flanschringen (WPR2002 von QVF, Mainz, BRD) und Silikondichtungsringen abgeschlossen. Die Deckel besaßen eine zentrale Bohrung, die Zugriff zum Innenraum des Innenrohres ermöglichte, während der eigentliche zylindrische Reaktorinnenraum über 12,5 mm (M25) Stutzen zugänglich war, wobei sechs bis acht Stutzen ringförmig in den oberen und unteren Deckel eingebracht wurden. Über die Stutzen wurden Rohre für Zulauf, Ablauf, Kühlung, Begasung und ein Überdruckventil (Mini-Sicherheitsventil 0,5 bis 1,0 bar aus 1.4305 Edelstahl von A & K Armaturen und Komponenten, Wendlingen, BRD) eingebaut. Photos des Reaktors mit Details sind in der folgenden Abbildung 18. Weiterhin wurden ein Abluftkühler (Spezialanfertigung der Werkstatt aus 40 cm Edelstahlrohr mit Mantelkühlung) und Sensoren zur Temperatur, pO₂- und pH-Messung über die Stutzen eingebracht. Die Kühlung erfolgte über einen 40 cm Kühlfinger (Anfertigung der mechanischen Werkstatt, techn. Fakultät, Universität Bielefeld), der über ein Magnetschalter mit dem Kühlwasser des hausinternen Kältewerks verbunden war. Zum Heizen wurden zwei Heizfolien (6 W, 12 V von Thermo Flächenheizungs GmbH, Rohrbach, BRD) am Glaskörper montiert und von außen mit anliegendem Styropor isoliert. Die Illumination erfolgte von Innen nach Aussen, indem in das innere Rohr eine Leuchtstoffröhre (AquaGLO 40 W von Rolf C. Hagen Inc., Montreal, Kanada) oder ein LED-Stab eingeführt wurde. Gleichzeitig wurde durch das Innenrohr Luft nach oben angesaugt, um eine Stauung der durch das Leuchtmittel entstehenden Wärme und einem Aufheizen des Reaktorinnenraumes auszuschließen. Die Begasung des Reaktors

erfolgte über zwei Sintermetall-Sparger (erst Edelstahl-Schalldämpfer mit G1/8“ Außengewinde, Kahmann & Ellerbrock GmbH & Co KG, Bielefeld, BRD; später ausgetauscht durch 2 cm Sintermetallkerzen mit 10 µm Porengröße und G1/8“ Außengewinde, Edelstahl 1.4401, GKN Sinter Materials, Radevormwald, BRD). Die Gasmischung wurde mit Hilfe von zwei Gas-

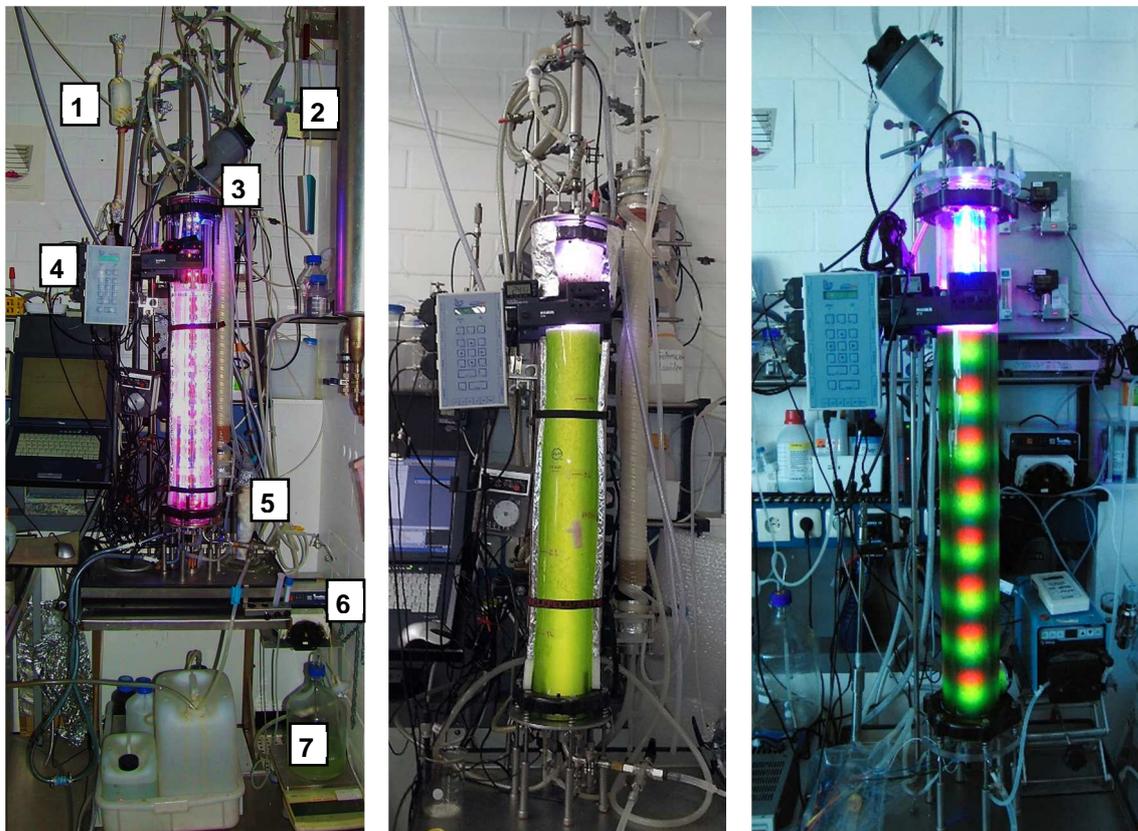


Abbildung 18: Intern illuminierter Blasensäulenreaktor. **Links:** mit LED-Beleuchtung und begast vor der Kultivierung. (1) Tiefenfilter für direkten Zulauf von filtriertem Wasser, (2) zwei Dosiersysteme für Sanitisierungsversuche, (3) Kühlung des LED-Stabes durch Ansaugen der Luft im Innenrohr, (4) Prozessleitsystem Aquastar, (5) Drei-Wege-Ventil für Probenahme von unten (alternativ von oben aus der Reaktormitte über ein Silikonschlauch), (6) Pumpen für eine kontinuierliche Betriebsweise, (7) Vorlageflasche mit Waage und (8) Gasflussregler mit Mischstrecke. **Mitte/Rechts:** Kultivierung von Mikroalgen mit Leuchtstoffröhre und LED als Beleuchtung.

flussreglern (CO₂: F-201CV-10K-AGT33-Z, Luft: F-201CV-5K0-AGT-33-Z, Firma Bronkhorst-Mättig GmbH, Kamen, BRD) kalibriert für CO₂ und Luft bereitgestellt, wobei eine 10 m Mischstrecke aus Polyethylenschlauch (Druckluft-PE-Schlauch mit AD 6 mm und ID 4 mm von Kahmann und Ellerbrock, Bielefeld, BRD) für eine homogene Durchmischung der Gase sorgte. Das Gas wurde über ein 0,2 µm PTFE-Sterilfilter (Medisart® 2000, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, BRD) in den Reaktor eingeleitet. Die Erfassung der Daten vom Temperatursensor (Pt 1000, Aqua Star V.2.2, iks ComputerSysteme GmbH, Karlsbad, BRD), pH-Sensor (Easyferm plus K8 325, Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst, BRD), pO₂-Sensor (12 mm Teflonmembran, Mettler-Toledo, Columbus, USA) als auch die Steuerung der Temperatur er-

folgte mit Hilfe der Prozessleitsystems Aquastar (IKS Aqua starV.2.2, IKS Computer Systeme GmbH, Karlsbad). Bei der Temperierung wurden die jeweiligen Komponenten angesteuert, sobald die Temperatur $>0,5$ °C abwich. Mit der Software DasyLab (Version 9, National Instruments, Austin, USA) wurden die Datensätze während jeder Prozessdauer zu der Temperatur, dem pH und dem pO_2 abgegriffen, für *online* Verlaufsdiagramme verarbeitet, und Werte über fünf Minuten gemittelt gespeichert. Die Sterilität am Probenahmeventil wurde durch die Spülung mit 70 % (v/v) Ethanol über ein Drei-Wege-Zugang gewährleistet, wobei der Schlauchteil nach dem Ventil zwischen den Probenahmen immer mit 70 % (v/v) techn. Ethanol befüllt war. Die Vorteile des Reaktors sind zunächst der einfache Aufbau, wobei durch die interne Illumination emittierte Photonen gezwungen werden, die Kulturbrühe zu passieren. Ungenutztes Reflektions- und Streulicht wurden damit minimiert; gleichzeitig war die Lichtquelle geschützt im inneren Rohr verbaut. Die hohe Flüssigkeitssäule bedingte eine lange Verweilzeit der Gasblasen in der Flüssigkeit und begünstigte damit den CO_2 -Austausch zwischen Gas- und Flüssigphase. Ebenfalls Vorteilhaft war diese Konstruktion für Sanitisierungsversuche. Durch Aufgabe von beispielsweise Säuren oder Basen in den Reaktorkopfraum über ein T-Ventil an der Abluftstrecke musste sich das Reagenz entsprechend im Arbeitsvolumen verteilen, um überall einen ausreichenden Sanitisierungseffekt erzielen zu können. Dabei war die Verteilung der Stoffe in diesem Reaktor mit maximaler Flüssigkeitssäule von 1 m vergleichbarer mit Freilandbioreaktoren, wo kommerzielle *air-lift* Systeme 1 bis 3 m Flüssigkeitssäule aufweisen, als konventionelle Laborbioreaktoren mit geringerer Füllhöhe, wie der im Folgenden beschriebene Flachplattenreaktor. Nachteilhaft bei diesem System war die Auslegung der Begasung, wenn Hochzelldichtekultivierungen durchgeführt wurden. Hierbei konnten die Zellen nicht mehr durch die Probenahme am Reaktorboden erfolgen, da sich eine mit der Biomassezunahme zunehmende Sedimentation einstellte. Deshalb wurde ein Schlauch vom Reaktorkopfdeckel bis zur oberen und mittleren Füllhöhe installiert, um eine repräsentative Biomassekonzentrationsbestimmung zu ermöglichen. Zusätzlich wurden zur Verifikation am Ende von Hochzelldichtekultivierungen die Gesamttrockenbiomasse und das Gesamterntevolumen bestimmt und mit der letzten Probenahme verglichen.

4.1.5. Flachplatten-*airlift* Photobioreaktor

Der Flachplatten-*airlift*-Photobioreaktor (FPA) wurde konstruiert, um Kultivierungen von Algen standardisiert und hoch reproduzierbar durchzuführen. Bei Flachplattenreaktoren lassen sich einfach einheitliche Lichtbedingungen für die Volumenelemente realisieren. Der Rahmen des Reaktors bestand aus Edelstahl 1.4571 und wurde seitlich durch zwei Glasplatten aus 4 mm Grünglas und Silikondichtungen verschlossen. In der folgenden Abbildung 19 ist der FPA-Photobioreaktor im Detail und mit Peripherie für verschiedene Betriebsweisen dargestellt. Der

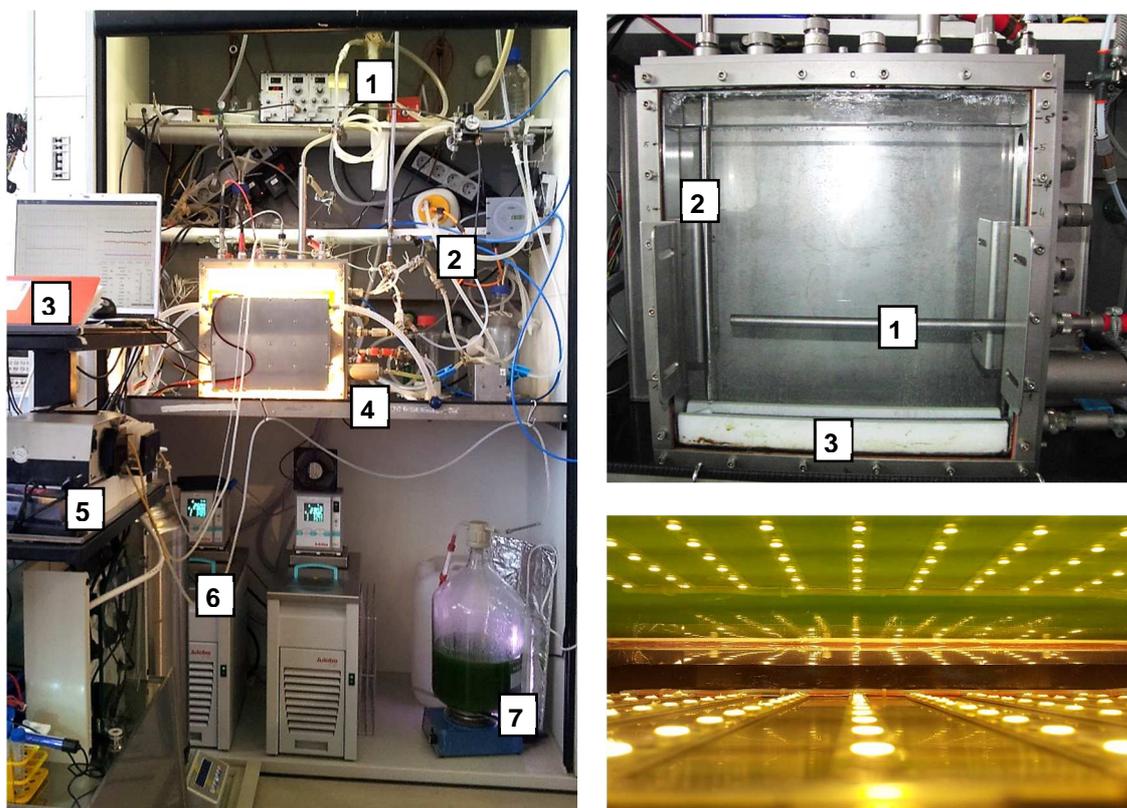


Abbildung 19 links: Flachplattenreaktor mit peripherer Ausstattung (1) Anschlussbox für pH- und pO₂-Sensor mit Potentiometern und digitalem Ausgang, (2) Gasdurchflussregler und CO₂-Messung i. d. Abluft, (3) Prozessleitsystem und A/D-Wandler, (4) Drei-Wege-Ventil für Probenahme von unten o. aus der Mitte (5) Pumpen für eine kontinuierliche/repetitive Betriebsweise, (6) Vorlageflasche mit Waage und Thermostate zur Temperierung der LED-Beleuchtung und Kulturbrühe (7) Illuminierte und begaste Ernteflasche mit Taumelrührer. **Rechts oben:** Detailansicht mit Kühlfinger (1) und Temperatursensor (2) im einseitig verschlossenem Rohr und Sinterrohr in einer Teflonschiene (3), damit keine Zellen unter das Sinterrohr auch bei sehr geringen Gasflüssen sedimentieren. **Rechts unten:** Die beidseitige LED-Illumination wurde für eine reproduzierbare Einstrahlung direkt am Reaktor montiert.

Innenraum hatte die Maße von 33 cm × 33 cm und ergab mit der Schichtdicke von 5 cm zwischen den beiden Glasplatten ein Gesamtvolumen von etwa 5,5 L. Die Durchmischung erfolgte ausschließlich durch die Begasung über ein 30 cm langes Sintermetallrohr (6A3600 Filterkerze mit 10 µm Porengröße aus 1.4401 mit angeschweißtem G1/8“ Außengewinde aus 1.4571, GKN Sinter Materials, Radevormwald, BRD). Der Reaktor wurde bei der Konstruktion für Dampfsterilisationen bei 121 °C und 1 bar Überdruck ausgelegt, wofür die LED abmontiert werden mussten. Die Beleuchtung erfolgte beidseitig mit je 120 Emittoren, welche zu jeweils zehn Leisten à 12 LED (Powerbar LED Leiste, Lumitronix, Hechingen, BRD) mit SMD-LED von Nichia (NS6W183AT-H1 für das Kaltlicht- und NS6L183AT-H1 für das Warmlichtspektrum von Nichia Corporation, Kaminaka-Cho, Japan) auf einem wassergekühlten Aluminiumkühlkörper (30 cm × 24 cm) im Abstand von je 2,2 cm mit Plastikschrauben montiert waren. Gleichviele warmweiße und (kalt-) weiße LED wurden auf Grund ihrer Spektren ausgewählt und komplementieren zusammen den Photosynthese-relevanten Bereich um 450 und 650 nm, wie

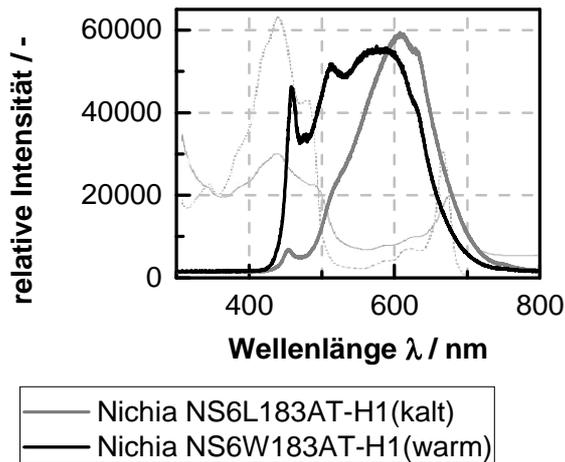


Abbildung 20 links: Wellenlängenspektren der verwendeten LED NS6W183AT-H1 LED (kalt) und NS6L183AT-H1 (warm) von Nichia Corporation aus Kaminaka-Cho in Japan. Im Hintergrund der Graphen ist das Absorptionsspektrum von *E. gracilis* entnommen aus Shibata *et al.* [1954] abgebildet, wobei die durchgezogene Linie die Absorption vom Rohextrakt in Wasser und die gepunktete Linie mit höheren Absorptionswerten den Zellextrakt in Ethanol darstellt. Die Absorptionsmaxima liegen bei 435 und 666 nm. **Rechts:** 10 × 12 LED wurden als Streifen (Powerbar LED Leiste, Lumitronix, Hechingen, BRD) auf einer wassergekühlten Aluminiumplatte montiert.

in Abbildung 24 neben einer LED-Platte dargestellt ist. Die warmweißen LED wiesen eine hohe Intensität im roten Spektralbereich um 600 nm und die weißen LED die Wellenlängen im blauen Spektralbereich um 450 nm auf. An der Oberseite und an einer Seite des Reaktors waren jeweils sechs 12,5 mm M20 Stutzen zur Aufnahme von Messsonden im Abstand von 5,5 cm angebracht. Dabei war der unterste Stutzen auf der Seite für die Begasung durch die Filterkerze reserviert, während der darüber liegende Stutzen für die Probenahme verwendet wurde. Die Sterilität am Probenahmeventil wurde durch die Spülung mit 70 % (v/v) technischen Ethanol über ein Drei-Wege-Zugang gewährleistet, wobei der Schlauchteil nach dem Ventil zwischen den Probenahmen immer mit Ethanol befüllt war. Eine Zugabe von Antischaummittel (Antifoam C, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) geschah nur manuell bei Bedarf über ein Septum. Die Begasung erfolgte mit 95 % (v/v) Luft und 5 % (v/v) CO₂ über jeweils einen Gasdurchflussregler (CO₂: F-201CV-1K0-AGD-33-Z von Bronkhorst-Mättig GmbH, Kamen, BRD; Luft: GSC-B4TA-BB23 red-y Serie von Vögtlin, Aesch, Schweiz). Nach dem Regler wurden die beiden Gase in einer 12 m langen Mischstrecke durchmischt und gelangten nach einem CO₂ Sensor, einem Sterilfilter (und einer Befeuchtungsflasche bei Satzkultivierungen) in den Reaktor. Standardmäßig wurden neben den oben erwähnten Anschlussstellen ein Kühlfinger (gebaut von der mech. Werkstatt, Techn. Fakultät, Universität Bielefeld), ein einseitig geschlossenes Tauchrohr für ein Thermometer (Pt100, Julabo, Seelbach, BRD), eine pH-Elektrode (405-DPAS-SC K85/120 von Mettler-Toledo, Columbus, USA), eine Abluftkühlung (Edelstahl 1.4401, Eigenkonstruktion), ein Überdruckventil (Mini-Sicherheitsventil 0,5 bis 1,0 bar aus 1.4305 Edelstahl von A & K – Armaturen und Komponenten, Wendlingen, BRD), eine pO₂-Elektrode (12 mm

Teflonmembran, Mettler-Toledo, Columbus, USA) und ein Lichtsensor (Eigenkonstruktion) über die Stutzen eingesetzt und mit 12,5 mm Dichtungen aus Silikon und ggf. konischen Ringen aus PTFE abgedichtet. Das eingesetzte und verbrauchte CO₂ wurde mit zwei Sensoren in der Zu- und Abluft registriert (2112B9000, Fa. Real-Gas, Martinsried, BRD und GMT220, Vaisala Oyj, Helsinki, Finnland). Als weitere Parameter wurden der *offline*-pH und für die kontinuierliche Fermentation *online* das Gewicht des Vorlagebehälters erfasst. Das Restlichtsignal wurde von einer Photodiode im genannten Lichtsensor erfasst, welcher sich mittig im Reaktor befand.

Das Prozessleitsystem wurde mit Hilfe der Software DASY Lab 9.0 (Omega Engineering GmbH, Deckenpfronn, BRD) realisiert, wobei ein Großteil der einzelnen Geräte über ein Analog Digital Wandler (NI USB-6009 von National Instruments, Austin, USA) angebunden waren. Das für die Datenaufnahme und Steuerung notwendige Schaltbild besteht aus fünf Bereichen, die in Abbildung 21 kenntlich gemacht sind. Bereich eins stellt den Dateneingang dar, wo alle Signale z.B. vom Analog Digital Wandler oder RS232-Schnittstellen eingelesen und in das Schaltbild übertragen werden. Der zweite Bereich ist die Signalumformung, in der ankommende Signale transformiert oder in entsprechende Einheiten umgerechnet werden. Im dritten Bereich werden die Signale *online* als Zahlenwerte dargestellt. Die Werte wurden mit 1 Hz ausgelesen und über fünf Minuten gemittelt aufgezeichnet. Zum einen war dadurch die Datenmenge bei Langzeitkultivierungen >30 d überschaubarer, zum anderen wurden gerätespezifische Spannungss-/Signalspitzen durch Störungen aufsteigender Gasblasen geglättet. Dieser Glättungseffekt musste nochmals erweitert auf das Photodiodensignal angewendet werden, da das Rauschverhalten der eingesetzten Photodiode durch aufsteigende Gasblasen relativ groß war. Hierzu wurde im Umformungsbereich ein Modul zur gleitenden Mittelwertbildung aus 50 Datenwerten eingefügt, womit eine deutliche Rauschreduzierung erreicht werden konnte. Der vierte Bereich ist der Regelbereich, wo im Schaltbild selbst erzeugte Befehlswerte an Geräte außerhalb des Computers über den A/D-Wandler übermittelt werden. In diesem Fall kann über das Schaltbild beispielsweise der Volumenstrom der Luft oder die Lichtstärke der LED Beleuchtung eingestellt werden. Im fünften Bereich werden die gesammelten Daten graphisch in Diagrammen aufbereitet. Die Bereiche sind untereinander durch Module verbunden, welche die eingelesenen Werte in Variablen schreiben und anschließend von anderen Modulen wieder abgerufen werden können. Dieser Schritt war nötig, um eine Synchronisation aller Eingänge und Schnittstellen zu erreichen und damit einen reibungslosen Betrieb zu gewährleisten. Der Lichtfluss kann über dem Regler im Schaltbild eingestellt werden. Das Signal wird über das Regelmodul im Funktionsbereich vier weiter an den Analog-/Digital-Wandler ausgegeben. Dieser kann nur Spannungssignale an die LED-Stromversorgung (zwei Transformatoren vom Typ HLG-320H42B mit je 7,65 A bei 42 V von Mean Well, New Taipei City, Taiwan)

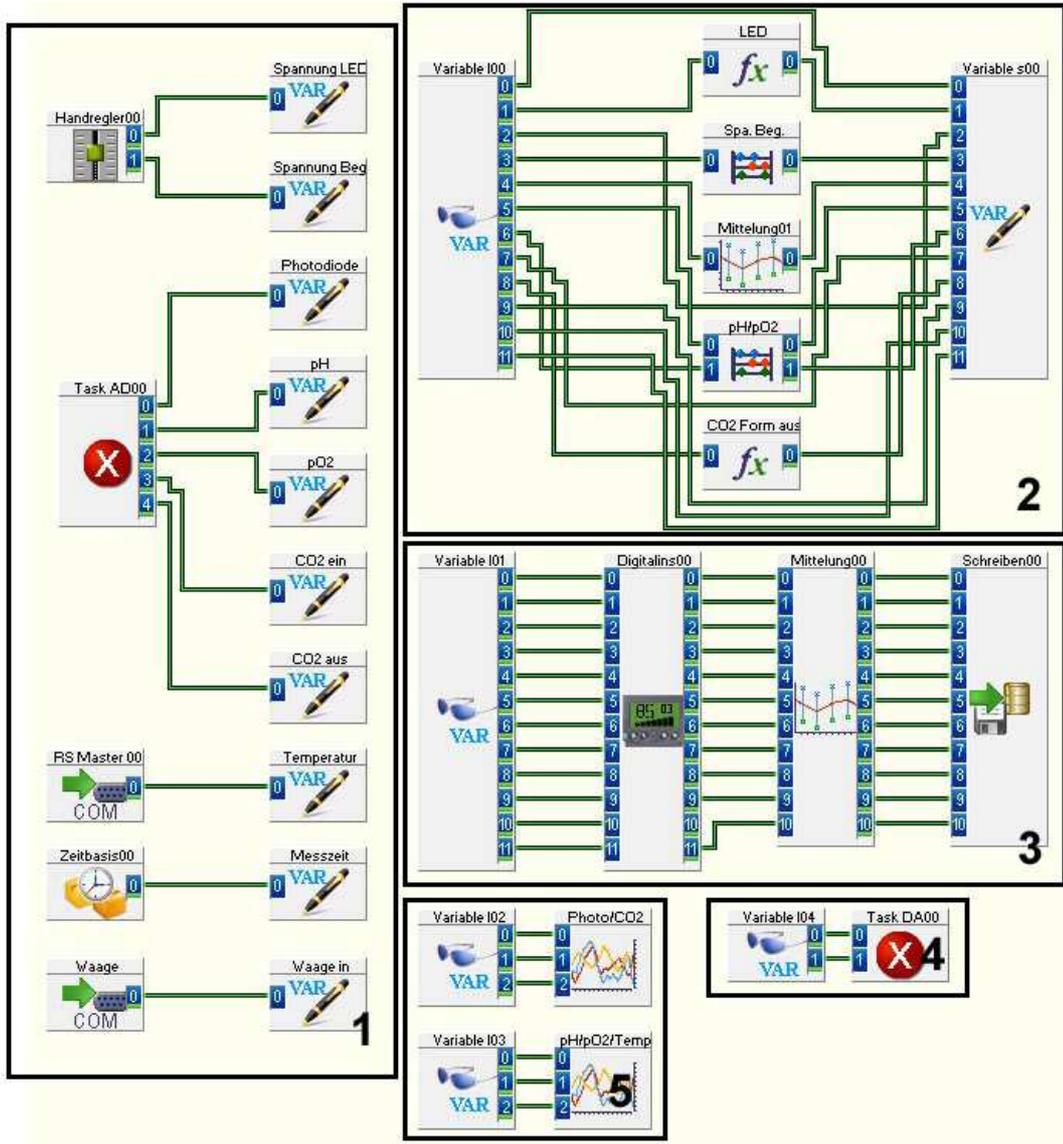


Abbildung 21: DASY Lab Schaltbild des entwickelten Prozessleitsystems mit Einteilung der Funktionsbereiche. (1) Dateneingang, (2) Signalumformung, (3) Darstellung der Signale in Einheiten und Ablage der Daten (4) Regelbereich/Datenausgabe und (5) Aufgearbeitete Bildausgabe beim Betrieb in Diagrammen. Abbild der Benutzeroberfläche der Software DASY Lab 9.0 (Omega Engineering GmbH, Deckenfronn, BRD).

weitergeben, weshalb im Schaltbild eine Umrechnung des Signals von der Einheit des Lichtflusses in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf die Spannung V geschehen muss. Das entwickelte System erwies sich als sehr stabil und hatte bei allen Prozessen keine Ausfälle. Auch Prozesslaufzeiten >1000 Stunden konnten problemlos durchgeführt werden. Die Fernsteuerung und Kontrolle erfolgte über *Virtual Network Computing* mit dem *VNC viewer* von RealVNC (RealVNC Ltd., Cambridge, UK) über ein VPN Netzwerk mit Hilfe von Cisco Systems (Cisco Systems, Inc., San José, USA). Diese Überwachungs- und Datenübertragungsmöglichkeiten wurden insbesondere bei den kontinuierlichen und repetitiven Kultivierungen von Vorteil, wo über lange Zeiträume viele Parameter ausgelesen werden konnten. Ebenfalls als vorteilhaft stellte sich

die kompakte Bauweise für die technische Umsetzung im Sinne der Dampfsterilisation mit Autoklaven in gängigen Größen heraus. Damit konnte vordergründig der Prozess beobachtet werden und nicht die Effektivität einer Sanitisierung. Bei sehr geringen Gasvolumenströmen zeigten sich die Schwächen des Systems, da die Zellen am Begasungselement vorbei am Boden sedimentierten. Dies konnte durch den zusätzlichen Einbau einer Rinne für das Begasungselement behoben werden, da die Zellen durch die Rinne direkt auf das Begasungselement gelenkt und somit durch die Gasblasen wieder nach oben mitgerissen wurden.

4.1.6. Lichtsensor

Die Konstruktion eines Lichtsensors wurde unternommen, um eine zuverlässige sowie sehr einfache Möglichkeit zu haben, die aktuelle Biomassekonzentrationen im Reaktor abzuschätzen, wie auch im Bioraffineriekonzept eine automatisierte Möglichkeit zu besitzen, die Kulturbrühe im Betrieb optimal zu verdünnen und zu ernten. Die erste Konstruktion wurde mit einem elektronischen Schaltkreis aufgebaut, von dem ein Signal abgegriffen werden konnte. Eine Weiterentwicklung reduzierte den Aufwand lediglich auf eine Photodiode (FSH203 von Osram, München, BRD), deren Spannung direkt über ein A/D-Wandler (NI USB-6009 von National Instruments, Austin, USA) mit der Software DasyLab (Omega Engineering GmbH, Deckenpfronn, BRD) aufgenommen wurde. Die aufgenommene Spannung steht für einen bestimmten Lichtfluss, welcher die Diode erreicht. Nach entsprechenden Kalibrierungen des Systems kann dann auf den eigentlichen Lichtfluss über eine Umrechnung geschlussfolgert werden. Für den eingesetzten Diodensensor im Flachplattenreaktor erfolgt die Umrechnung in [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] über die folgende Formel:

$$y = -2,01084 \cdot 10^{-20} \cdot x^6 + 1,55641 \cdot 10^{-16} \cdot x^5 - 4,5154 \cdot 10^{-13} \cdot x^4 + 6,16628 \cdot 10^{-10} \cdot x^3 - 2,89019 \cdot 10^{-7} \cdot x^2 + 0,00177 \cdot x - 0,11009$$

Abhängig vom Bioreaktor, Einbau des Sensors, Medium und Mikroorganismus konnte über die Spannung die Biotrockenmassekonzentration abgeschätzt werden. Abbildung 22 zeigt den



Abbildung 22: Photodiode in einem Borosilikatglasrohr (Durchmesser 12 mm) für den Einbau über einen Stutzen. Die Diode (1) wird im Glasrohr mit Hilfe eines Stahlrohrs auf der richtigen Höhe gehalten und ist damit zentral im Reaktor positioniert. Das Glasrohr wird über ein Stutzen in den Reaktor eingeführt und mit einer Tülle aus Edelstahl (2) fest verschraubt, wobei der konische Teflonring und eine entsprechende Dichtung hierzu nicht abgebildet sind.

Sensor in einem einseitig verschlossenen Glasrohr aus Borosilikatglas und einer Tülle mit Bohrung aus Edelstahl (1.4571), welche über einen Stutzen mit einer entsprechenden Kautschukdichtung und konischen Teflonring dicht am Photobioreaktor montiert wird.

4.1.7. Zell-Absetzer

Der Zellabsetzer wurde konstruiert, als sich die Sedimentation als beste energiearme Erntemethode neben der Flokkulation oder Flotation ergeben hat (siehe Abschnitt 4.12). Ein *proof of principle* war mit *E. gracilis* grundsätzlich wichtig, da keine Daten zur Sedimentation von Zellen vorlagen, welche gravitaktisch, phototaktisch und magnetotaktisch reagieren können und einen Tag-Nacht-Rhythmus aufzeigen, welcher von einer unterschiedlichen Motilität der Zellen geprägt ist. Die Geometrie vom Zellabsetzer orientierte sich an der Fachliteratur [Henzler 2012], während sich der Entwurf und die praktische Umsetzung nach dem Gerät CS20 der Firma Biotechnology Solutions (Cellsettler CS20, Biotechnology Solutions, Houston, USA) richtete. Die folgende Abbildung 23 zeigt den Aufbau des Gerätes. Das Gehäuse und die Sedimentationsplatten wurden elektropoliert, um das Gleiten der Zellen an der Schrägen durch einen Vibrationsimpuls zu erleichtern. Da das Verhalten von *E. gracilis* unbekannt war, wurde die Kanallänge auf 33 cm geringfügig erhöht. Weiterhin wurde ein stärkerer Vibrationsmotor mit 0,64 A bzw. 140 W Leistung (MR-1 von Würges Vibrationstechnik GmbH, Neusäß/Augsburg, BRD) installiert, da die benötigte Leistung für die Zellen unbekannt war. Sofern die Vibrationsstärke und -dauer das Sedimentationsverhalten negativ beeinflussten bzw. die Strömungen durch zu starke Aufwirbelung störten, wurde der Vibrationsmotor mit einer zusätzlichen Abstandsplatte (30 cm) am Zellabsetzer montiert, wie es auch bei kommerziellen Geräten Standard ist. Im Absetzer wurden zum normalen Boden sieben weitere Böden eingezogen, die über die gesamte Kanallänge zusätzliche Sedimentationsflächen boten.

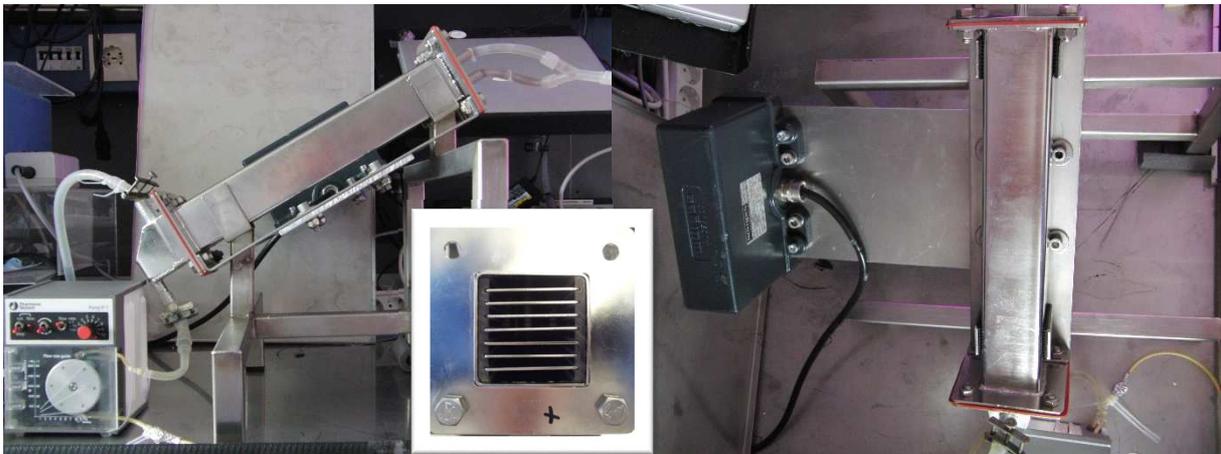


Abbildung 23 Links: Zellabsetzer von der Seite; Rechts: Zellabsetzer von oben mit seitlich angebrachtem Vibrationsmotor, Mittig (Bild im Bild): Innenleben mit zusätzlichen Sedimentationsböden.

4.1.8. Studie zum Freiland-Bioreaktormodul

Für ein Bioraffineriekonzept mit Mikroalgen bzw. *E. gracilis* nimmt der Photobioreaktor eine zentrale Rolle hinsichtlich der Qualität und Wirtschaftlichkeit ein. Wenn es vorgesehen ist, niedrigpreisige Produkte herzustellen, so muss die Produktionsanlage möglichst effizient und wirtschaftlich konzipiert sein. Hochwertprodukte können entsprechend ihrer höheren Marktpreise die Investition in eine Produktionsanlage mit Glaskomponenten erlauben. So wurde die Eignung verschiedener Materialien für den Bau von Photobioreaktoren untersucht. Es zeigte sich bei *E. gracilis*, dass der Einsatz von Kupferkomponenten vermieden werden sollte, da die Inkubation mit einer Kupferfläche von 4 cm² in 5 L Kulturbrühe bei pH 3 letal auf alle Zellen innerhalb von 48 Stunden wirkte (Daten nicht gezeigt). Eine Verfüugung mit flüssigem Silikon sollte nur erfolgen, wenn Silikone ohne Zinnverbindungen vorliegen und nicht auf Essigsäure basieren, da bei sauren Bedingungen ebenfalls eine hohe Letalität von *E. gracilis* vorliegt (Daten nicht gezeigt). Eine Begasung mit Blasen eines geringen Durchmessers (<1 mm) in kleinen Volumenströmen wirkte sich positiv auf die Viabilität der Zellen aus. Auch aus Sicht des Energieverbrauchs ist es sinnvoll, die Blasengröße zu minimieren, um einen maximalen CO₂-Transport aus der Gas- in die Flüssigphase insbesondere bei saurem pH zu gewährleisten. Durch bessere Transferraten kann der Volumenstrom gesenkt werden, was die Kosten für den Pumpen-/Kompressorenbetrieb mindert. Zudem hinterließen hohe Volumenströme und große Gasblasen mikroskopisch betrachtet im hohen Maße zerstörte Zellhüllen mit einem Großteil des Paramylons darin. Als Begasungseinheit zeigten sich Sintermetalle, keramische Filterkerzen oder poröses PTFE äußerst wirkungsvoll in Bezug auf kleine Gasblasen, stellen jedoch keine Alternative für kostengünstige Freilandbioreaktoren. Hier wäre ein einfaches Plastikrohr mit Bohrungen geringen Durchmessers zur Begasung die einfachste Lösung. Um mit dieser Variante ausreichend kleine Bläschen und keine Strahlblasen zu erhalten oder zu große Blasen zu generieren, welche durch die Haftung an der Oberfläche erst ab einem kritischen Volumen durch die Auftriebskraft abreißen, zeigte sich eine fluidische Oszillation des Gases als ausreichend, um kleine Gasblasen zu erzeugen [Tesar *et al.*, 2006; 2011]. Bei der fluidischen Oszillation werden gezielt Strömungen in einem System erzeugt, sodass die Fluidströmung periodisch verändert wird und damit Druckwellen innerhalb dieser Strömung erzeugt. Bekannt ist dieses Phänomen beispielsweise aus schnell fahrenden PKW, wenn ein Fenster einen bestimmten Spalt geöffnet wird und in der Fahrkabine periodisch wiederkehrende Druckschwankungen bzw. Strömungsprofile im Sekundenbereich erzeugt werden, die spürbar und hörbar sind. Um eine Eignung für die Begasung von für Photobioreaktoren zu überprüfen wurde ein fluidischer Oszillator nach den Vorgaben von Tesar [2013] aus Plexiglas konstruiert. In der folgenden Abbildung 24 ist der fluktuierende Gasbläschenaustritt zu erkennen, welcher mit dem fluidischen Oszillator auf der rechten Seite des Bildes erzeugt wurde.

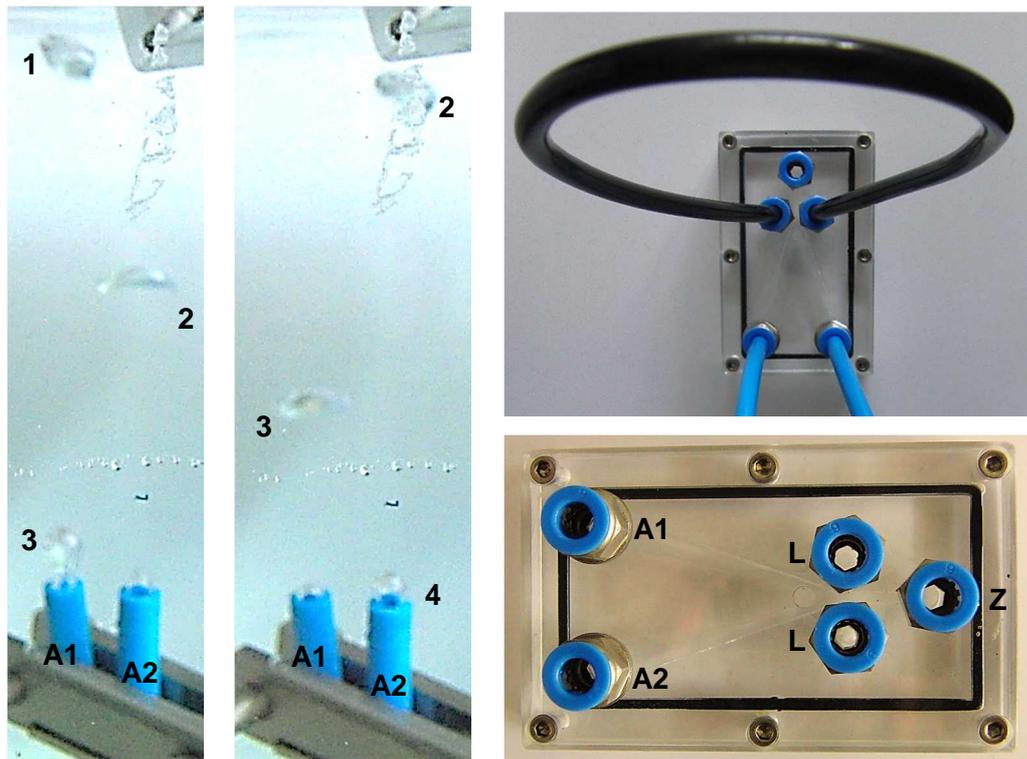


Abbildung 24 links: Ergebnis des fluidischen Oszillators in Schnellaufnahmen von Fotos alle 0,05 s. **1, 2, 3:** Die Gasblasen aus einer gemeinsamen Zuluft treten alternierend aus den Schlauchenden aus, die mit A1 und A2 verbunden sind. Dabei reißen die Blasen sofort von der Austrittsoberfläche ab **Rechts:** Eigenkonstruktion vom fluidischen Oszillator aus PMMA nach den Vorgaben von Tesar *et al.*, [2013]. **Z:** Zulauf vom Gas, **L:** Zugänge für die Schleife (*loop*), **A1** und **A2:** Ausgänge mit fluktuierendem Gasstrom.

Es wurde bestätigt, dass über die Größe des Oszillators und der Länge der Schleife (*loop*) der Volumenfluss und die Oszillationsfrequenz eingestellt werden kann. Dadurch treten alternierend aus zwei Zugängen Blasen durch erzeugte Druckwellen aus und reißen sich direkt von der Oberfläche los. Bei der Schleife wurde die maximale Länge verwendet, um eine Blasenfrequenz von etwa 50 s^{-1} zu erzeugen. Frequenzen unterhalb von 50 s^{-1} bedürfen eine Schleifenlänge $>1 \text{ m}$. In Abbildung 24 links wird deutlich, dass die Gasblasen auch bei groß gewählten Öffnungen mit 4 mm Durchmesser alternierend durch die erzeugten Druckwellen von der Oberfläche abreißen. Für den Einsatz in Bioreaktoren kann die Einheit aus Tiefziehplastik hergestellt werden, wobei das System skalierbar ist und auf gewünschte Volumenströme angepasst werden kann [Tesar *et al.*, 2013]. Damit ergäbe sich eine kostengünstige Alternative, um kleine Gasblasen ohne hohen apparativen Aufwand zu erzeugen.

Hinsichtlich der Experimente mit verschiedenen Biorektorausführungen und verschiedenen Schichtdicken wurde deutlich, dass geringe Schichtdicken von 1,0 bis 2,5 cm noch eine ausreichende Transmission des Lichtes ermöglichen und für ein Konzept in europäischen Breitengraden notwendig wären. Angedacht ist jedoch bei der Konzeptstudie durch kleine Modifikationen eine Verwendung des Modells in allen Breitengraden. Für den Transport, Aufbau oder

Austausch sollten die Bioreaktoren modulare Einheiten bilden, sodass es keine speziellen Transportmechanismen erfordert, außer gängige Europool-Paletten. Ein erhöhter Kostenaufwand in der Logistik ist beispielsweise bei den 3 m hohen Photobioreaktoren von Ecoduna (Österreich) notwendig und fließt in die Baukosten ein. Auch der Einsatz eines Fundamentes, welches schwere Bioreaktoren tragen muss, ist zu vermeiden. Weiterhin können einzelne (kleine) Module im Betrieb einer ganzen Anlage besser ausgetauscht werden. Für dauerhaft geringe Investitions- und Betriebskosten sollte der Reaktor lediglich aus einem formgebenden transmissibelen Material und einer Begasungseinheit bestehen, so dass alle weiteren Komponenten, wie Rohre, Ventile, etc. die Basis der Anlage bilden. Das lichtdurchlässige Material sollte idealerweise das photosynthese-relevante Licht nicht absorbieren, Infrarotstrahlung reflektieren, kostengünstig und langlebig sein. Optional könnte das Material Wellenlängen-*shifter* besitzen, also bekannte Moleküle, die Wellen/Photonen der photosynthetisch ungenutzten Bereiche aufnehmen und in photosynthetisch aktiven Bereich wieder emittieren. Letztendlich sollten alle Materialien einen möglichst kleinen CO₂-Footprint besitzen, um dem Bioökonomie 2030-Vorstellungen gerecht zu werden und um eine kurze CO₂-Amortisationsphase der Anlage zu gewährleisten. Um einen solchen Photobioreaktor in verschiedenen globalen Breitengraden den Lichtverhältnissen anpassen zu können, sollte dieser schnell modifizierbar sein, ohne das Gesamtkonzept grundlegend verändern zu müssen. Nach der Eignungsprüfung verschiedener Materialien wurde der Fokus auf UV-stabile, transparente PE-Folie mit Infrarotreflektion (SUN SAVER Clear 5 ST von FVG Folien GmbH, Dernbach, BRD) mit 91 % Lichttransmission gelegt, wie sie auch bei Gewächshäusern eingesetzt wird. Für erste Konstruktionen wurde eine Folie mit 220 µm Dicke verwendet, welche manuell hitzeverschweißt wurde. Freilandreaktoren bedürften einer dickeren Folie mit 400 bis 500 µm Dicke. Das Material wurde ohne Spülschritte nach dem Verschweißen direkt für Kultivierungen eingesetzt. Eine Dauerkultivierung als repetitive Satzkultivierung über 24 Monate bei pH 2,2 (im EG5.1-Medium mit reduziertem Vitamingehalt) zeigte keinerlei Veränderung des Materials (siehe Abbildung 26 rechts). Das sich am Boden angesammelte tote Material über die Zeit konnte während einer Teilernte mit einem erhöhten Gasvolumenstrom von etwa 1 vvm aufgeschwemmt und abgesaugt werden. In der folgenden Abbildung 25 sind Aufbau und Details einer Platte mit den Maßen 0,8 x 1,5 m dargestellt, wobei der finale Reaktor aus mehreren solcher verschiedengroßer Platten bestünde, welche unten miteinander verbunden sind, wie aus Abbildung 27 hervor geht. Dabei wären die einzelnen Platten unterschiedlich groß, um eine optimale Lichtverteilung über den Tages- bzw. Sonnenverlauf zu gewährleisten. Im Bereich des Reaktormodulkopfraumes müssten alle Platten in Verbindung stehen, um ein Ausgasen und zirkulierende Strömungs- sowie Vermischungseigenschaften zwischen den Platten zu ermöglichen. Dies könnte über einen angeschweißten Schlauch oder wie in der Abbildung 28 einer sichelförmigen Verbindungsgaller Plattenelemente für stromlinienförmigere Strömungsverhältnisse erfolgen. Die alternie-

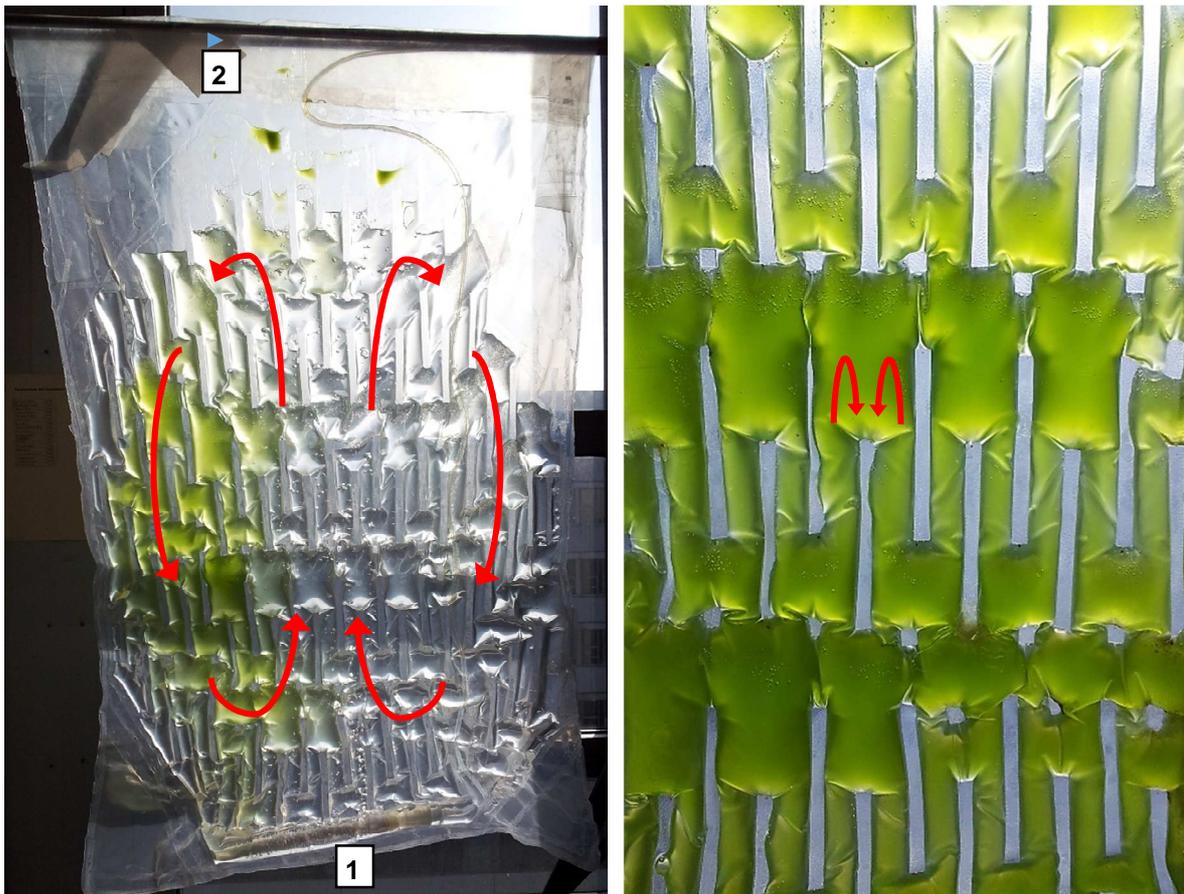


Abbildung 25: Abbildung einer Platte der Reaktorstudie. Ein gesamter Reaktor würde aus mehreren Platten bestehen, die unten miteinander verbunden sind. Oben würde über einen gemeinsamen Schlauch die Abluft realisiert sein. **Links:** Inokulation des 8,4 L Reaktors mit *E. gracilis* im Raum mit durchschnittlich 22,0 °C. Die Hauptströmungsrichtung ist durch rote Pfeile verdeutlicht. **1:** Gaseintrag; **2:** Abluft und Zugang für Inokulation, Ernte und Zufütterung. Das Modul war vor dem Fenster positioniert und der direkten Sonneneinstrahlung der Sommermonate durch die Glasscheibe von etwa 9:00 bis 13:30 in ausgesetzt, im übrigen Tagesverlauf erfolgte die Illumination nur mit indirektem Sonnenlicht von außen. Zur Mittagszeit wurden im Reaktor mittig Temperaturmaxima bis 42,3 °C gemessen und nachts Temperaturminima bis 20,5 °C. Die Aufnahme der Temperaturgrenzwerte erfolgte automatisch und wurde täglich überprüft. **Rechts:** Detailansicht im Betrieb: *E. gracilis*-Kultivierung in 8,0 L EG5.1-Medium mit Anfangs-pH-Wert von 3,0 und einem Gasvolumenstrom von 0,05 vvm mit 95 % (v/v) Luft und 5 % (v/v) CO₂.

renden Schweißnähte hatten eine Breite von 0,5 cm und bewirkten eine Ausbeulung der einzelnen Kanäle bei Befüllung, sodass jeweils konvexe Oberflächen zur Lichtabsorption entstanden. Die kleinen und großen Kanäle waren leer 2,5 und 6,5 cm und im befüllten Zustand 2,0 und 5,0 cm breit. Im gefüllten Zustand entstand somit eine maximale Schichtdicke der Kissen von 2,5 cm. An den Innenseiten dieser Kissen anhaftende Gasblasen haben den Effekt, dass dort einstrahlendes Licht wie durch Linsen weiter in den Innenraum gestreut wird. Die alternierende Verschweißung bewirkte zudem eine Bildung kleiner Wirbel, wie in der Abbildung 25 rechts mit Pfeilen angedeutet ist. Die Begasungseinheit im unteren Bereich wurde so

konstruiert, dass sich die Gasblasen mit Hilfe der Schweißnähte nach oben hin zunehmend über die

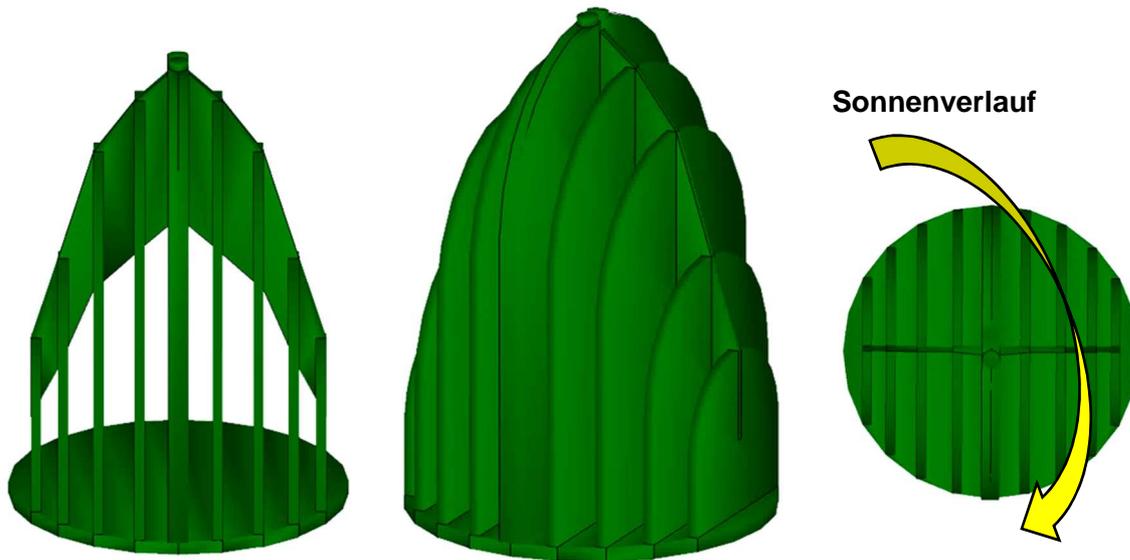


Abbildung 26: Studie eines Photobioreaktors mit verschieden großen parallelen Platten mit 1,0 bis 2,5 cm Schichtdicke je Platte, die wiederum aufgebaut sind, wie unter Abbildung 25 zu sehen ist. Zwischen den Platten orientiert sich der Abstand an der geographisch bedingten Sonnenlichtstärke. **Links:** Ansicht von vorn, der Blick fällt zwischen die Platten. **Mitte:** Ansicht seitlich von vorn, es sind die nach außen hin kleiner werdenden Platten zu erkennen. **Rechts:** Ansicht von oben mit einer Positionierung zum Sonnenverlauf, um alle Platten maximal über den Tag zu illuminieren.

gesamte Breite verteilen und die Zellen durch die Strömungseigenschaften mitreißen. Im oberen Bereich nahm die Strömung die Zellen an den Seitenbereichen wieder nach unten mit, bis diese erneut von Gasblasen mitgerissen wurden. Diese zu den Seiten kreisende Strömung wurde zur Zellkonzentrierung ausgenutzt. An den Seiten befanden sich tote Kanäle, welche geöffnet werden konnten. Bleiben diese über den einige Stunden offen, so akkumuliert strömungsbedingt die Biomasse in diesen Kanälen, wo sie ausreichend mit Licht und CO_2 versorgt wird. Bei einer Teilernte des Reaktors kann abends/nachts diese bereits konzentrierte Biomasse durch Öffnung der Kanäle nach unten hin abgezogen werden. Einer dieser Kanäle ist in Abbildung 27 links dargestellt. Durch die Ausnutzung einer bestimmten Strömung kann somit eine partielle Ernte der Biomasse bzw eine Konzentrierung der Biomasse bereits im Photobioreaktor beginnen.

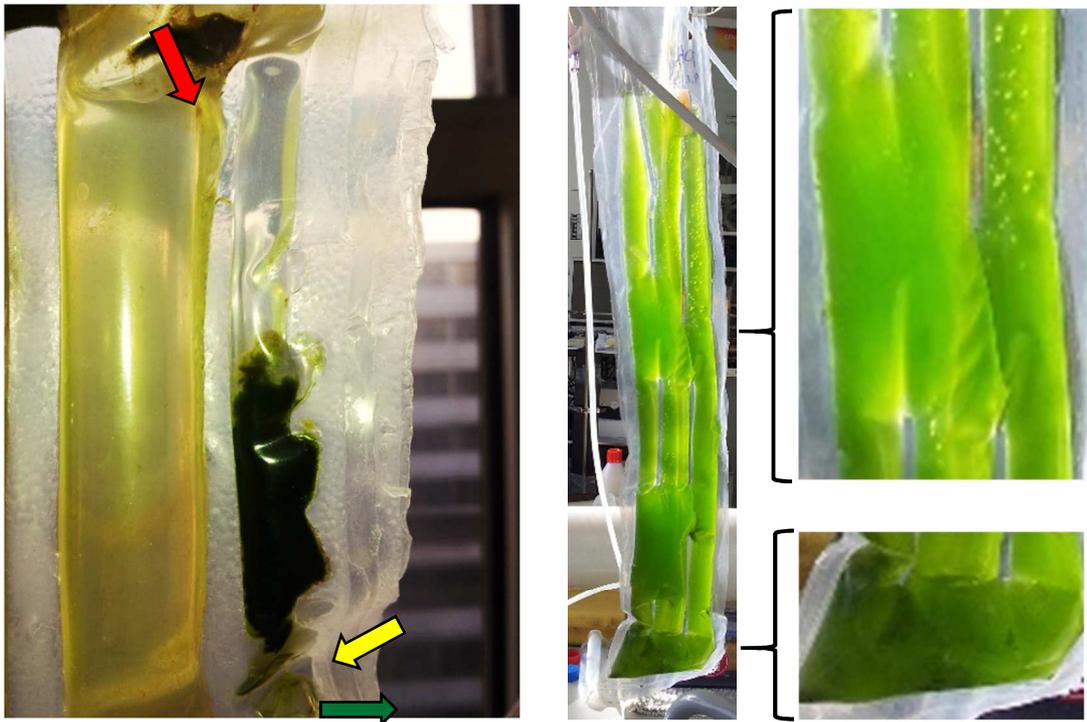


Abbildung 27 links: Akkumulation von Biomasse in einem toten Seitenkanal durch die Strömung (roter Pfeil). Wird der Kanal unten geöffnet (Klemmbereich von zwei Magneten mit gelben Pfeil markiert), kann die konzentrierte Kulturbrühe abfließen (grüner Pfeil). **Mitte/Rechts:** Dauerkultivierung (repetitive Satzkultivierung in 1 L EG5.1-Medium mit Luftbegasung) von *E. gracilis* über 24 Monate zur Eignungsprüfung des Materials. Details wurden vergrößert. Das Foto wurde nach 20 Monaten Betrieb aufgenommen, wo bei Dauerbetrieb eine sehr geringe Verschmutzung des Materials nur im strömungsarmen Bereich in Bodennähe zu erkennen ist.

4.2 Die optische Beurteilung von *E. gracilis*

Eines der Ziele vom Bioaffineriekonzept mit *E. gracilis* ist die Reduktion der aktuellen größten Kostenpunkte beim Betrieb einer Anlage, welche bei *airlift*-Photobioreaktoren neben den Energiekosten für den Gaseintrag in die Reaktoren beim (Labor-)Personal und -dienstleistungen liegen [Norsker *et al.*, 2011]. Eine möglichst einfache Charakterisierung des Zustandes der Mikroalgen wäre somit von Vorteil. Die mikroskopische Bewertung der Qualität der Biomasse, als auch die Überprüfung des axenischen Zustandes der Kulturen war generell begleitender Bestandteil aller Kultivierungsvorgänge. Die Beurteilung des Zustandes der Zellen war nicht schwierig, denn die Besonderheit des Protisten ist seine beträchtliche Größe im Vergleich mit vielen anderen Mikroalgen. Im normalen Zellzyklus ohne Nährstoffmangel war die photoautotrophe Form durchschnittlich 50 µm lang und 10 µm breit, wie in Abbildung 28 deutlich wird.

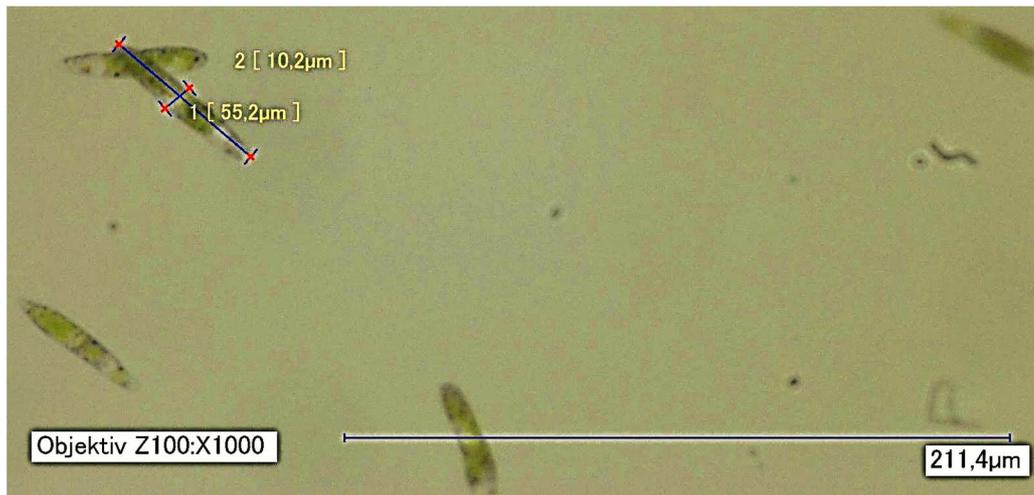


Abbildung 28: Größenbestimmung einer durchschnittlichen, photoautotroph gewachsenen *E. gracilis*-Zelle mit 55 μm Länge und 10 μm Durchmesser gemessen in der Zellmitte. Vergrößerung: Objektiv Z100, Mikroskop: Keyence VHX 5000.

In der Wachstumsphase war dies die dominante Zellmorphologie. Bei dieser Form ließen sich, wie aus der folgenden Abbildung 29 ersichtlich wird, Zellbestandteile wie Zellkern (A), vorderer Bereich mit Reservoir und kontraktile Vakuole (B) neben dem Augenfleck (C) und Chloroplast (D) in vitalen Zellen schnell identifizieren bzw. bewerten. Abgestorbene Zellen (E) fielen durch die fehlende grüne Färbung auf, da die Chloroplasten nach dem Zelltod rasch degenerierten. Ebenfalls nahmen tote Zelle eine entspannte Zellform an.

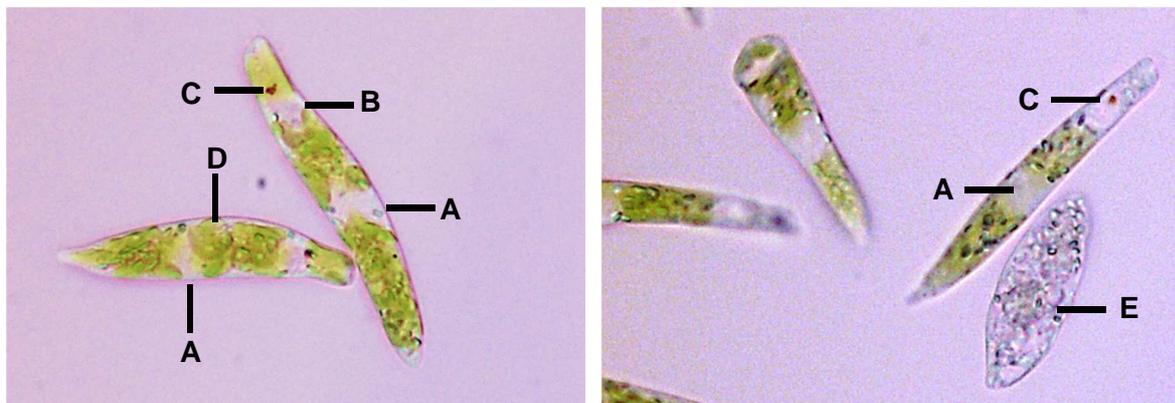


Abbildung 29 links: Photoautotroph gewachsene vitale *E. gracilis* Zellen aus der Wachstumsphase. (A) Nucleus, (B) kontraktile Vakuole, (C) Augenfleck und (D) ein Chloroplast. **Rechts:** eine abgestorbene Zelle (E) mit leicht entspannter Zellstruktur erkennbar – weitere Details siehe Text. Ausschnitt aus dem Bild mit dem Mikroskop: Olympus BX 40, Objektiv: 40x HF.

Lag ein akuter Stress vor, war dieser Zustand durch die sogenannte Hammerform der Zellen für einige Minuten leicht erkennbar. Bei längerer Exposition unter Stressbedingungen wurden die Zellen apoptotisch und nahmen eine rundliche Form an, wie in Abbildung 30 links zu erkennen ist. Sie zeigten zunehmend charakteristische intrazelluläre sphärische Abschnürungen – ein Vorgang, der auch bekannt als *blebbing* ist [Bumbulis und Balog, 2013; Hengartner 2000]. In Abbildung 30 rechts ist die späte Phase der Apoptose verdeutlicht, in der die Zellen

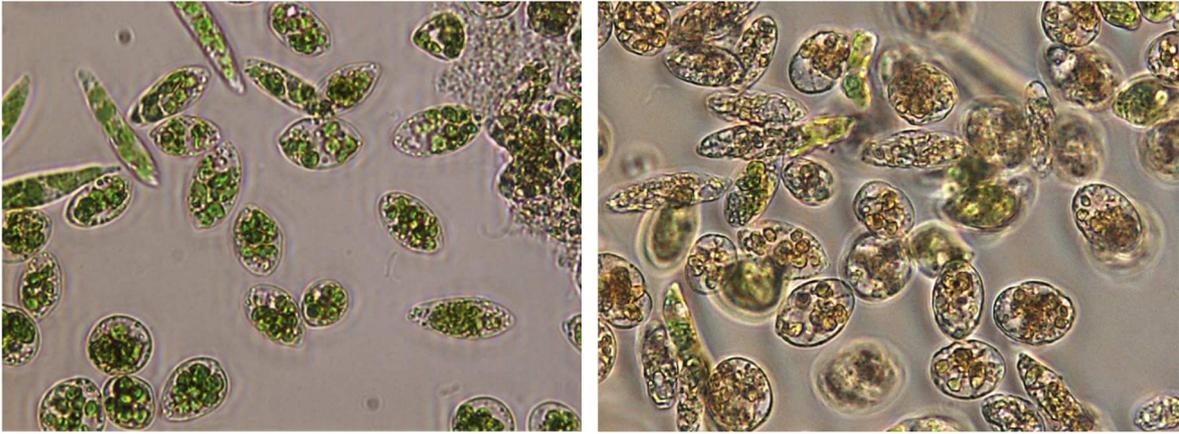


Abbildung 30: Photoautotroph gewachsene apoptotische *E. gracilis*-Zellen im frühen (**links**) und späten (**rechts**) Stadium. Weitere Details siehe Text. Mikroskop Olympus BX 40, Objektiv: 10x Ph1.

zunehmend ihre grüne Färbung verlieren und im Endzustand eine entspannte und leicht bikonvexe wie auch transparente Zellform annehmen, wie in Abbildung 29 rechts (E). Viele widrige Bedingungen konnten vom Organismus toleriert werden, einige machten sich morphologisch bemerkbar, wovon nur auf häufigere Phänomene kurz eingegangen werden soll. Bei Kultivierungen unter Standardbedingungen und einer Exposition mit 10 g L^{-1} Propionsäure im CM-Medium bei pH 7,0 und heterotrophen Bedingungen fanden sich zunehmend Zellansammlungen mit einer sternförmigen Anordnung der Zellen wie in Abbildung 31 links zu sehen ist. Am häufigsten war jedoch eine Vakuolisierung des Zellinneren zu beobachten, was in Abbildung 31 rechts mit großen Vakuolen sichtbar wird. In vielen Fällen fand trotz Stress eine Biomassezunahme statt. So fand beispielsweise bei photoautotrophen Standard-Kultivierungsbedingungen mit 2 g L^{-1} Blaukorndünger mit $0,25 \text{ g L}^{-1}$ Kalkammonsalpeter bei pH 7,0 (und den Spurenelemente sowie Vitaminen der EG-Medien) gutes Wachstum statt, wenn auch alle Zellen überdurchschnittlich große Vakuolen aufgebaut haben. Die Zellen sind neben dem Wachs-

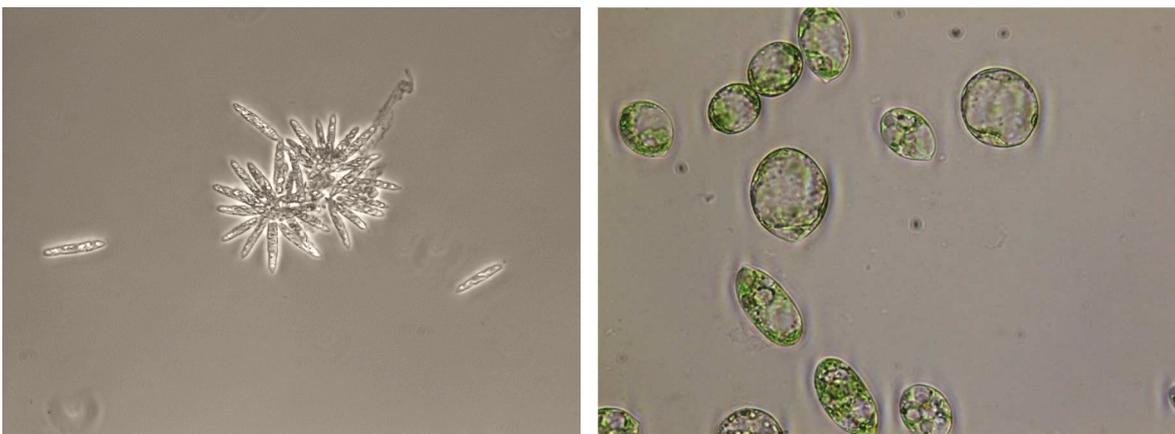


Abbildung 31: Reaktion von photoautotroph gewachsenen *E. gracilis*-Zellen auf tolerierbaren Stress. **Links:** Zellen kultiviert mit 10 g L^{-1} Propionsäure im CM-Medium unter heterotrophen Bedingungen. **Rechts:** Photoautotrophe Kultivierung mit 2 g L^{-1} Blaukorndünger und $0,25 \text{ g L}^{-1}$ Kalkammonsalpeter und den Spurenelementen und Vitaminen wie im EG5.1-Medium. Weitere Details siehe Text. Mikroskop Olympus BX 40, Objektiv: 10x Ph1 und 2.

tum unter submersen Bedingungen auch in der Lage emers auf Festmedien oder Oberflächen zu proliferieren. Sofern strömungsarme und nährstoffreiche Bereiche vorgefunden wurden, konnten Kulturen einen Biofilm ausbilden, welcher in Kultivierungsgefäßen theoretisch als ständige Inokulationsquelle dienlich sein könnte.

In diesem Zellkollektiv schien der Zustand der Zellen äußerst vital, wobei eine permanente Bewegung aller Beteiligten vorlag. Vermehrt versuchten Zellen von außen in den Biofilm einzudringen. War ein Biofilm, wie in Abbildung 32 rechts dargestellt, eingetrocknet und wieder mit Medium überflutet, so riss dieser in der Regel ab und konnte fortgespült und zum Teil aufgelöst werden. Insofern stellen etwaige Biofilme kein Problem wie eine dauerhafte Verschmutzung von Bioreaktoren mit längeren Betriebszeiten dar. Bei Festagarplatten mit bestimmten Medien wiederum, wie dem *Euglena*-Medium (mit 1 g L^{-1} Natriumacetat, 1 g L^{-1} Rinderextrakt, 2 g L^{-1} Bactotryptone, 2 g L^{-1} Hefe-Extrakt und 3 g L^{-1} Erdextrakt, Angaben siehe Sammlung für Algenkulturen Göttingen und andere Algenstammsammlungen) schwärmten die Zellen über die Oberfläche des Agarmediums, wie in Abbildung 32 links sichtbar ist.

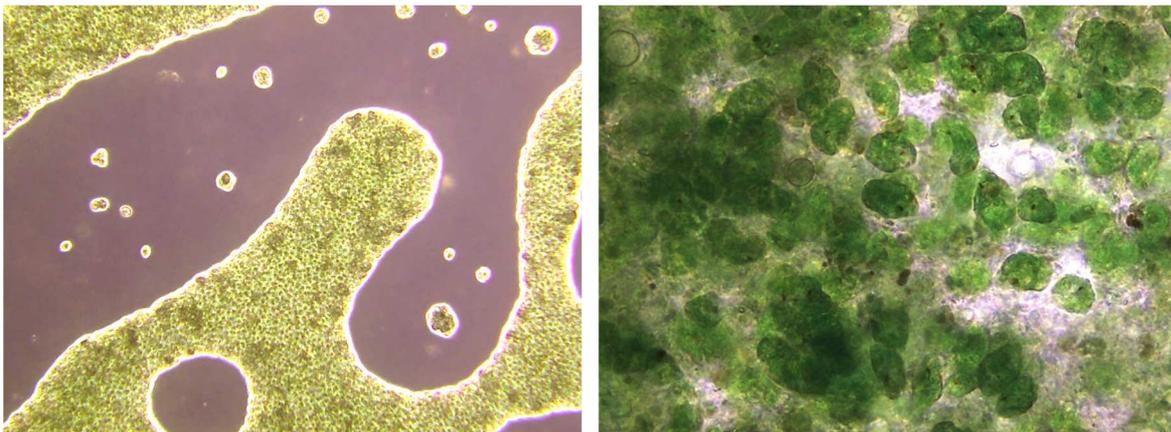


Abbildung 32 Links: Emerswachstum von *E. gracilis* auf Festmedium. **Rechts:** Submerskultivierung im Biofilm. Mikroskop: Leitz/Wetzlar Inversmikroskop Epivert. Objektiv 4x (links) und Olympus BX 40, Objektiv: 10x HF (rechts).

Die Zellteilung kann ebenfalls einfach beobachtet werden. Sofern sich viele Zellen zu bestimmten Zeiten teilen, kann die Information zum Synchronisierungszustand einer Kultur abgeleitet werden, welcher insbesondere bei Kulturen mit Tag-Nacht Zyklus prägnant ist. Bei der Verdopplung erfolgt bei *E. gracilis* eine Längsteilung beginnend am Flagellum. In dieser Phase sind die Zellen eingeschränkt in ihrer Motilität und sedimentieren schneller zu Boden. Vor Beginn der Abschnürung von der Mutterzelle in zwei Tochterzellen waren recht große Zellen zu beobachten, wie in Abbildung 33 (A) zu sehen ist, wo zentral eine Zelle vor ihrer Teilung steht, während eine Zelle im Normalzustand vorbei schwimmt und einen guten Größenvergleich liefert. Im Weiteren zogen sich die beiden Tochterzellen unter ständigem Winden auseinander, was in Abbildung 33 (B) zu erkennen ist. Zum späteren Zeitpunkt der Teilung waren die Zellen fast vollständig getrennt (Abbildung 33, C). Insgesamt wurde deutlich, dass sich die Beurteilung

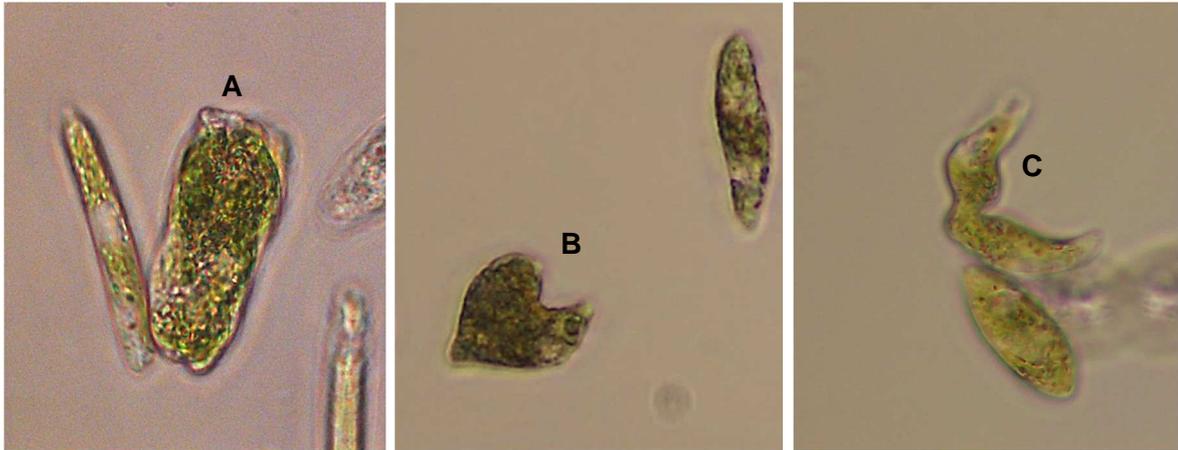


Abbildung 33: Photoautotroph gewachsene *E. gracilis* Zellen zu Beginn (A), währenddessen (B) und am Ende (C) einer Zellteilung. Mikroskop Olympus BX 40, Objektiv: 40x Ph1 (links) und HF (Mitte und rechts).

des Zustandes speziell bei *E. gracilis* durch ihre Größe, Form und Färbung automatisierten läßt, was sich mit entsprechenden Geräten, wie z.B. dem Countstar[®] Cellcounter (RuiYu Biotech Co., Ltd., Shanghai, China) und einem Algorithmus zur Erkennung der spindelförmigen Morphologie viabler Zellen reproduzierbar umsetzen ließ.

Heterotroph gewachsene Kulturen wurden im Rahmen der Vorkulturen für Kultivierungen mit dem CM-Medium, der Stammhaltung und für die Untersuchungen von Lipiden und Fettsäuren mit dem PP-Medium verwendet. Eine so differenzierte Beurteilung des Zellzustandes wie bei photoautotroph kultivierten Zellen war nicht möglich, da die Zellen bei Glukoseüberschuss viel Paramylon akkumulieren konnten und den Zustand unbeweglicher, teils runder Zellen annahmen, wie in Abbildung 34 deutlich wird. Photoheterotrophe Zellen wiederum wiesen je nach Medium ein gemischtes Aussehen zwischen den Morphologien der photoautotroph und heterotroph gewachsenen Zellen auf mit meist motilen Zellen.

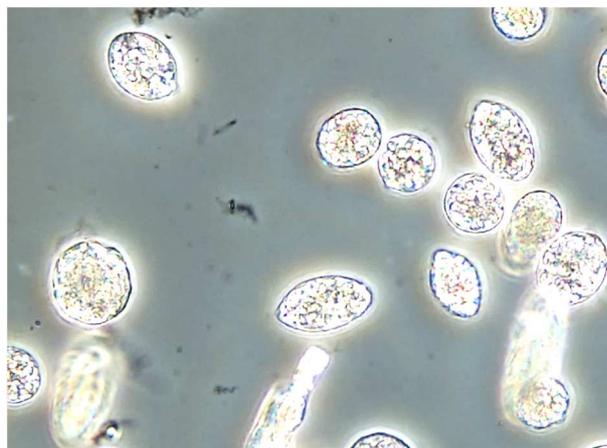


Abbildung 34: Heterotroph gewachsene *E. gracilis*-Zellen im Glukoseüberschuss. Die Zellen sind zum Teil mit viel Paramylon gefüllt. Mikroskop Olympus BX 40, Objektiv: 20x Ph1.

4.3 Grundlegende Wachstumseigenschaften von *E. gracilis*

4.3.1 Schichtdickenabhängige Zellkulturdichte von *E. gracilis*

Abhängig von der Schichtdicke der Kulturbrühe können die Photonen des photosynthetisch aktiven Bereichs einer Lichtquelle konstanter Intensität diese Brühe unterschiedlich stark durchdringen. Nach Lambert-Beer transmittieren durch eine beleuchtete Kultur mit einer optischen Dichte von 1,0 bei dieser Wellenlänge nur noch 10 % des eingestrahlenen Lichtes nach 1,0 cm Schichtdicke. Da die optische Dichte beim Wachstum von *E. gracilis* durchaus höhere Werte erreichte, zeigte sich eine Abhängigkeit der Biotrockenmasseendkonzentration von der Schichtdicke der Kultur, was aus Abbildung 35 hervor geht. Umso dünner die Schichtdicke, desto länger konnte eine maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit aufrechterhalten werden, was sich bezüglich der Zelldichten nach sieben Tagen Kultivierung widerspiegelt. Die Kulturen erreichten nach sieben Tagen Biotrockenmassekonzentrationen von etwa 1,2, 2,5 und 3,4 g L⁻¹ für die Schichtdicken im Ruhezustand von 5,0, 2,3 und 1,0 cm. Es wird deut-

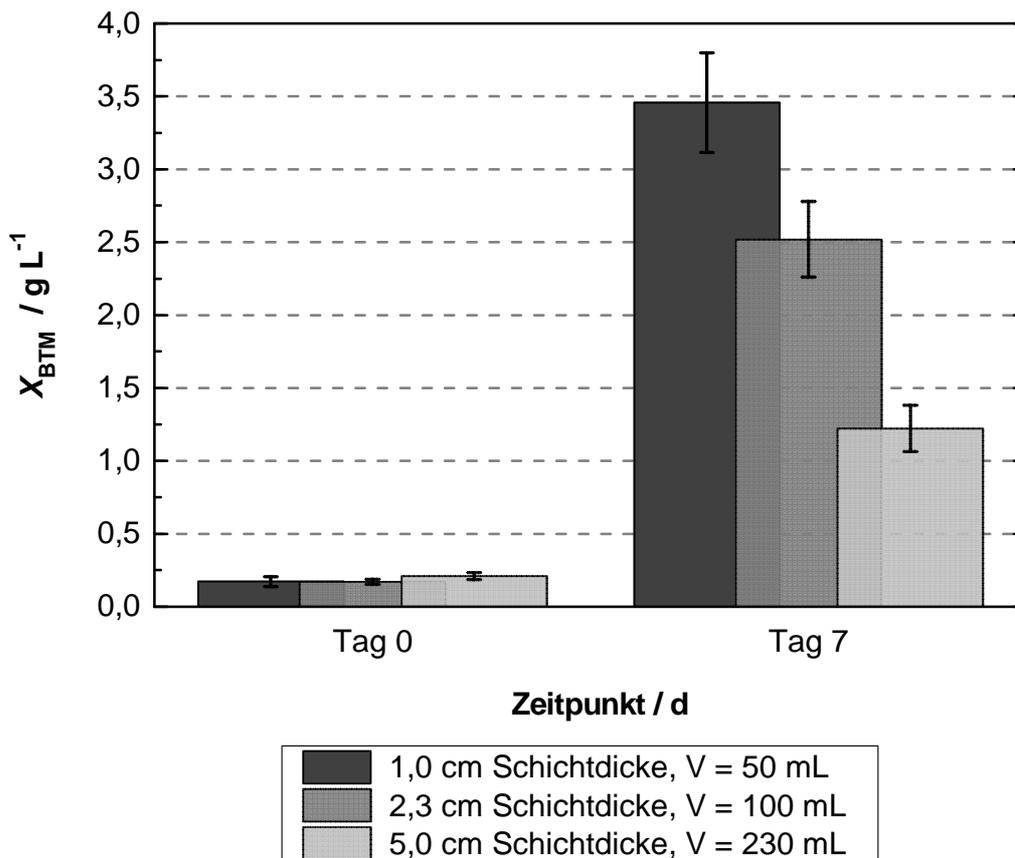


Abbildung 35: Photoautotrophe Kultivierung von *E. gracilis* in Schüttelkolben mit verschiedenen Schichtdicken, welche über sieben Tage konstant gehalten wurden (Verdunstung kompensiert). Die Illumination erfolgte mit homogen leuchtenden Leuchtstoffröhren bei 150 μmol m⁻² s⁻¹. Die Kulturen (n = 9) wurden im CM-Medium bei pH 3,5 auf einem Orbitalschüttler mit einer Rotationsfrequenz von 120 min⁻¹ bei 28 °C und einer Gasphase bestehend aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft inkubiert.

lich, wie massiv die Schichtdicke das phototrophe Wachstum beeinflusste. Hierbei sei angemerkt, dass die Kulturen bei den auch im Folgenden präsentierten Kultivierungen durch den Orbitalschüttler keine statischen Schichtdicken aufweisen. Durch die Rotation der Flüssigkeit im Kolben entstehen der Füllhöhe und Zentrifugalkraft entsprechend unterschiedliche Schichtdicken. Die Wahl einer Drehfrequenz von 120 min^{-1} sollte das in Strömung geratene Arbeitsvolumen in seiner Wellenbewegung zweimal je Sekunde im Kreis rotieren lassen.

4.3.2 Korrelation von Biotrockenmassekonzentration und der Lichtabsorption bei 540 nm

Die Abschätzung der Biotrockenmassekonzentration durch die optische Dichte wurden nach Vorversuchen bei einer OD von 540 nm durchgeführt, um vergleichbare Ausgangsbedingungen zu erzielen. Ein schneller Kenntnisstand der Biomassekonzentration war ebenfalls von Nöten, wenn Kultivierungsstrategien oder Erntetechniken erprobt wurden. In Abbildung 36 ist eine Kalibriergerade für Näherungswerte dargestellt, mit der zu jedem Zeitpunkt eine Aussage über die Biotrockenmassekonzentration mit Hilfe einer Messung der optischen Dichte gemacht werden konnte. Die Auswahl der Wellenlänge bei 540 nm fiel aufgrund der geringsten Absorption und Lichtstreuung der Zellen und ihrem Chlorophyll in diesem Bereich, zumal sich bei

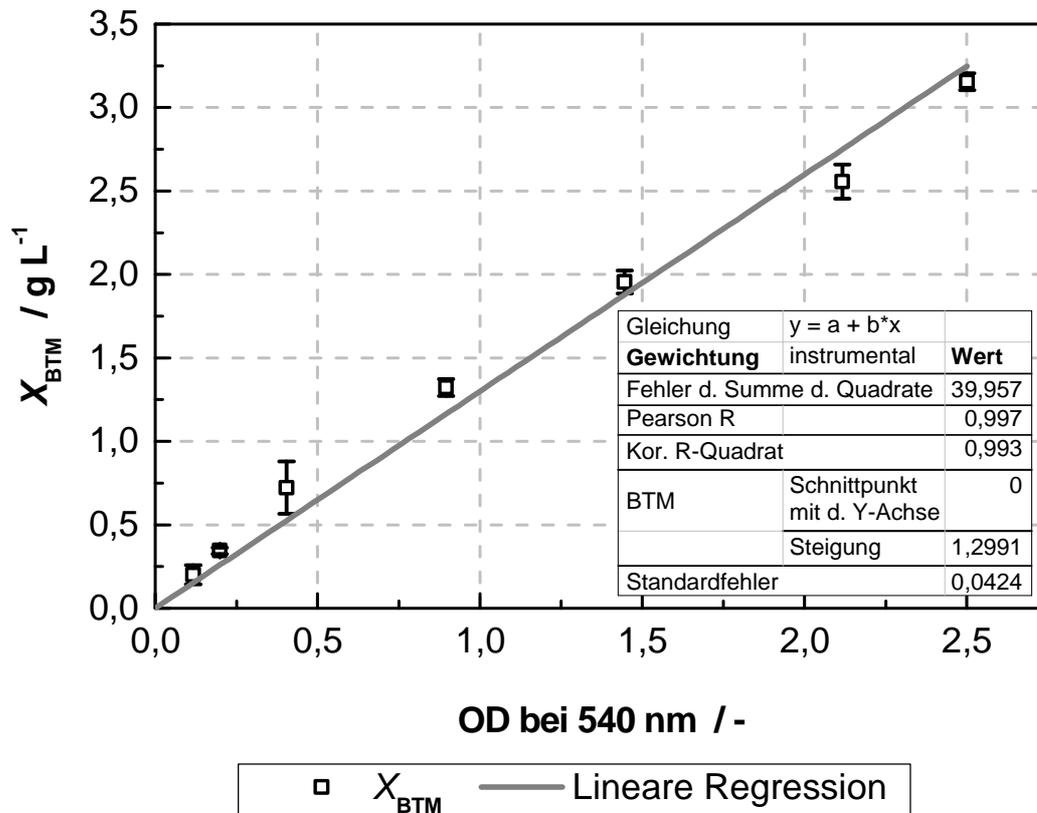


Abbildung 36: Korrelation der Biotrockenmassekonzentration und der optischen Dichte bei 540 nm mit der Biomasse und Kulturbrühe von *E. gracilis*. Die Kulturen ($n = 9$) wurden im EG5.1-Medium bei pH 3,0 auf einem Orbitalschüttler mit einer Rotationsfrequenz von 120 min^{-1} bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Gasphase bestehend aus 5 % (v/v) CO_2 und 95 % (v/v) Luft inkubiert.

bei Änderung der Lichtverhältnisse die Chloroplastenanzahl bei *E. gracilis* ändern kann. Aufgrund dieser Änderung war zuvor unbekannt, ob eine Korrelation vorliegt, wenn auch der ausgewählte Bereich theoretisch nicht davon beeinflusst werden sollte. Wie auch bei anderen Mikroorganismen ändert sich die Steilheit der Geraden geringfügig, wenn *E. gracilis* in anderen Medien kultiviert wird.

4.3.3 Charakterisierung des Wachstums von *E. gracilis* mit dem CRAMER-MYERS(CM)-Medium

Für die Kultivierungen von *E. gracilis* wurde das synthetische Medium nach Cramer und Myers [1952] ausgewählt, da es eine gute Grundlage hinsichtlich einer minimalen Einwaage an Substanzen bei gutem Wachstum bot. Ein geringer Einsatz an Substrat war hierbei sinnvoll, wenn das Ziel ein möglichst wirtschaftliches Bioraffineriekonzept sein sollte. Dabei zeigte sich in dieser Arbeit in der Regel ein normales Wachstum der Zellen im CM-Medium, wenn auch gelegentlich ein Einbruch der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit zwischen Tag drei und fünf der jeweiligen Kultivierung verzeichnet wurde. In der Literatur sind für *E. gracilis* verschiedene Wachstumsgeschwindigkeiten abhängig vom pH des Mediums beschrieben worden. Es wurde gezeigt, dass photoautotroph kultivierte Zellen im CM-Medium bei 95 % (v/v) Luft und 5 % (v/v) CO₂ in der Gasphase geringe spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten im pH-Bereich von pH 3,5 bis 5,0 mit einem Minimum bei pH 4,0 mit 0,72 d⁻¹ haben. Unterhalb von pH 3,5 und oberhalb von pH 5,0 wurden höhere spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten mit etwa 1,0 d⁻¹ ermittelt [Jones und Cook, 1978]. Allerdings wurden die pH-Werte der verwendeten Medien mit Schwefelsäure oder Kaliumhydroxid eingestellt, was letztendlich das wahre Medium hinsichtlich der Schwefel- und Kaliumkonzentration veränderte. Die Ergebnisse von Olaveson und Nalewajko [2000] wiederum zeigen ein hierzu entgegengesetztes Bild, wo keine signifikante Änderung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit (1,05 d⁻¹) im pH-Bereich von pH 2,5 bis 7,0 photoautotroph gewachsener Kulturen festgestellt wurde, wobei eine dem CM-Medium ähnliche Grundlage (mit zusätzlichem Biotin) verwendet wurde. In beiden Veröffentlichungen wurden die Zellzahlen zur Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeiten verwendet, jedoch haben im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse verdeutlicht, dass die Zellzahl nicht mit der Biotrockenmasse korreliert [Schwarzthans und Cholewa *et al.*, 2015]. Weiterhin sind bei der Fachliteratur von Jones und Cook sowie Olaveson und Nalewajko die Kurvenverläufe der Kultivierungen zur weiteren Interpretation nicht dargestellt. Generell wäre es für das Bioraffineriekonzept von Vorteil, wenn die Zellen bei einem niedrigen Anfangs-pH-Wert eine hohe spezifische Wachstumsgeschwindigkeit aufweisen. Durch die Wahl eines solchen pH-Wertes würde die Population zu Beginn schneller wachsen und mögliche konkurrierende

rende Mikroorganismen bzw. Kontaminationen ggf. überwachsen oder sich besser durchsetzen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit mehrfach Kultivierungen bei drei verschiedenen Ausgangs-pH-Werten durchgeführt. Ein exemplarisches Wachstum der Zellen bei pH 3,5, 5,5 und 7,0 zu Beginn der Kultivierung wie auch das oben beschriebene Phänomen ist in der folgenden Abbildung 37 abgebildet. Bei den ersten photoautotrophen Kultivierungen im CM-Medium bei Standardbedingungen und $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurden als Inokulum 1 Woche alte heterotrophe Kulturen verwendet. Hierdurch lagen für erste Versuche Zellen im gleichen Status zu Beginn der Hauptversuche mit einem neu ausgebildeten Chloroplastenapparat vor. Alterserscheinungen, welche sich ab Tag sieben auch in der Änderung der Pigmentzusammensetzung äußerten, wurden bereits von Kempner und Miller [1972] beschrieben. Tendenziell lag ein leichter Trend vor, dass Kulturen bei pH 7,0 im Mittel eine geringfügig höhere spezifische

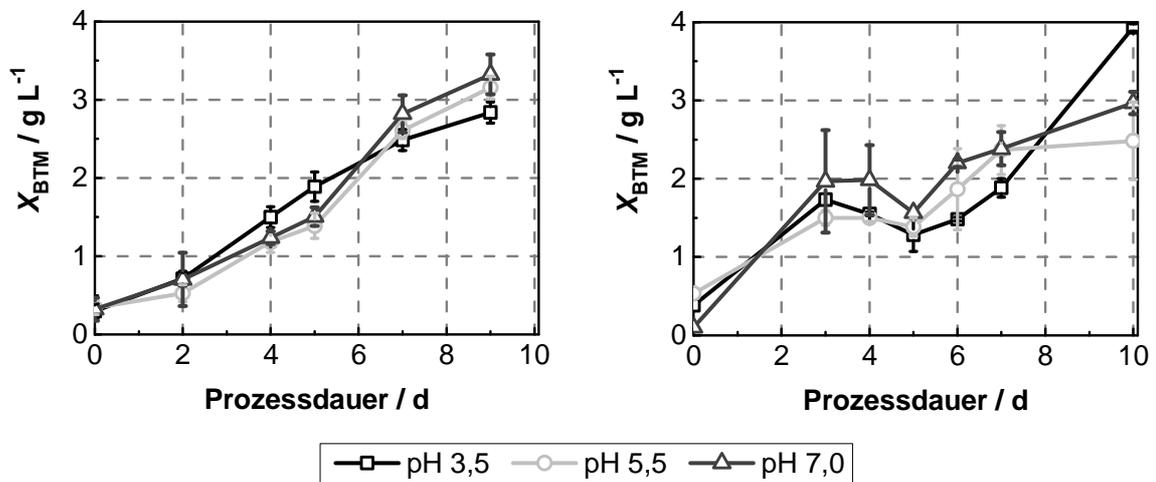


Abbildung 37: Photoautotrophe Kultivierungen von *E. gracilis* im Cramer-Myers-Medium bei verschiedenen pH-Werten zu Beginn der Kultivierung. Die Kulturen wurden bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ auf bodenilluminierten Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min^{-1} und einem Lichtfluss von $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in einer Gasatmosphäre aus $5 \text{ } \%$ CO_2 und $95 \text{ } \%$ Luft durchgeführt. Für jedes Medium eines anderen pH-Wertes wurden drei Replikate kultiviert. Die Kultivierungen im Diagramm links und rechts wurden zu verschiedenen Zeiten durchgeführt. Inokulum: je 10 mL einer mindestens 1 Woche alten heterotrophen Kultur.

Wachstumsgeschwindigkeit aufwiesen, was vermutlich auf das gänzlich andere Löslichkeitsverhalten von CO_2 bei pH 7,0, als bei pH 3,5 zurückzuführen ist. Dieser Vorteil egalisierte sich mit fortschreitender Kultivierungsdauer, da das Medium mit seiner geringen Pufferkapazität schnell ansäuerte, sobald die Zellen für das Wachstum verschiedene Ionen aus dem Medium assimilierten. Aufgrund dieser Ansäuerung kann somit nicht von einem deutlichen Wachstumsvorteil gesprochen werden, sofern der pH nicht statisiert wird. Messungen zeigten, dass unabhängig vom Anfangs-pH-Wert (zwischen 3,0 und 7,0) und den verwendeten photoautotrophen Medien ab Tag vier von Kultivierungen sich die pH-Werte bei pH 2,0 angleichen (Daten nicht gezeigt).

Durch die Verwendung von heterotrophen Vorkulturen für photoautotrophe Kultivierungen variierte jedoch die initiale Anpassungsphase zwischen ein und drei Tagen, was eventuell auf den jeweiligen Zustand der Zellen, wie beispielsweise den Paramylongehalt zurückzuführen war. Ebenfalls wurden zu Beginn dieser Arbeit die Zellen mit relativ geringem Lichtfluss von $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Bezug auf die Kulturchichtdicke stimuliert, was vielleicht für eine inhomogene Photoinduktion der Chloroplastenausbildung sorgte. Zwar wurden für Kultivierungen stets gleich alte Vorkulturen verwendet, jedoch schwankte der Paramylongehalt in den Zellen geringfügig. Da in den ersten Tagen der Kultivierungen die Grünung der Zellen erfolgte, war zum Teil ein geringer Biomassezuwachs zu erkennen, wie in Abbildung 38.

Somit waren Vergleiche von Kultivierungen, die mit der gleichen Vorkultur inokuliert wurden durchaus aussagekräftig, weniger jedoch Vergleichskultivierungen unter gleichen Bedingungen aber mit verschiedenen Vorkulturen als Inokulum bzw. verschiedenen Zeitstempeln. Es konnte ein Mittelwert zur Orientierung gebildet werden - die Referenzkulturen verschiedener Kultivierungsreihen wiesen jedoch oft eine finale Gewichtsdiﬀerenz auf. Ein Beispiel hierzu ist im der folgenden Abbildung zu erkennen, wo die Referenzkulturen zusammengetragen wurden, die als Standard bei verschiedenen Versuchen mitgeführt wurden.

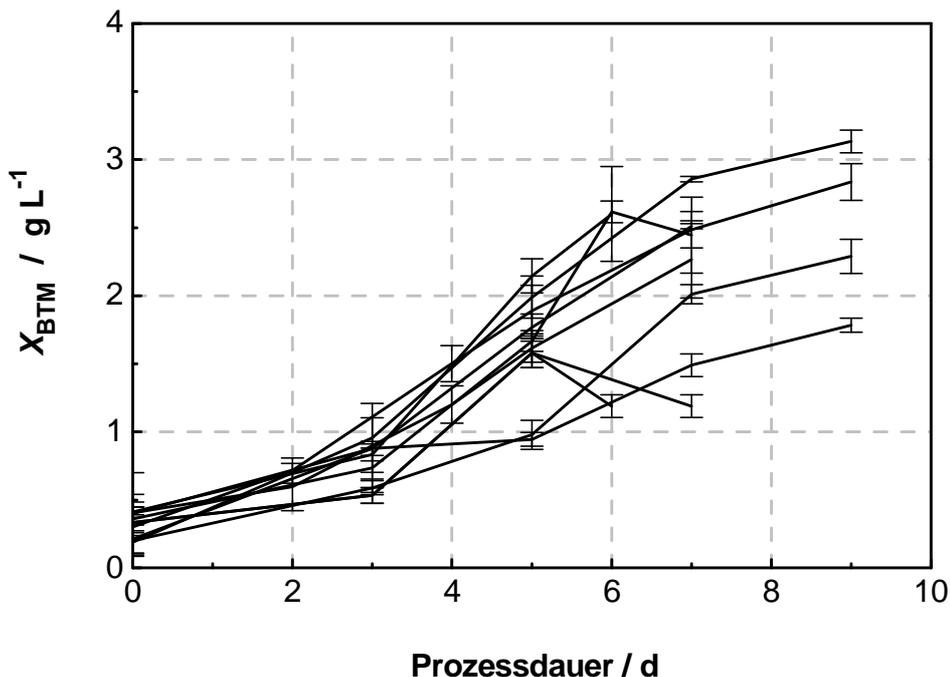


Abbildung 38: Sammlung der Referenz-Kultivierungen von *E. gracilis* im CM-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von 3,5 und einem Lichtfluss von $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sie wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert, jedoch zu anderen Zeiten und mit verschiedenen Inokulationskulturen, die möglichst standardisiert wurden (siehe Text). Alle Kultivierungen wurden bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ auf bodenilluminierten Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min^{-1} in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO_2 und 95 % (v/v) Luft durchgeführt. Jeder dargestellte Kurvenverlauf repräsentiert drei parallel angesetzte Kulturen ($n = 3$) aus gleicher Vorkultur. Inokulum: je 10 mL einer mindestens 1 Woche alten heterotrophen Kultur. Bedingt durch Probenahmen sank die Schichtdicke der Kulturen (Schicht bei $t_0 = 2,3 \text{ cm}$).

Diese Referenzkulturen wurden stets gleich angesetzt und kultiviert. In diesen Fall konnte sich bereits am dritten Kultivierungstag ein Unterschied in der Trockenbiomasse zwischen 0,5 und 1,0 g L⁻¹ (Minimum/Maximum) ergeben, wie aus Abbildung 38 hervorgeht. Es wurde deutlich, dass ältere heterotrophe Kulturen zur schnelleren Ergrünung der Zellen führten. Derartige 14 Tage alte heterotrophe Kulturen wiesen unter dem Mikroskop in der Regel eine schlanke, den photoautotrophen Zellen ähnliche Morphologie auf. Intrazellulär konnten deutlich weniger Paramylongranula detektiert werden verglich man diese mit jungen heterotrophen Zellen, die eine rundliche Morphologie mit viel Paramylongranula aufwiesen.

4.3.4 Steigerung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit

Da photoautotrophe Kulturen bei Eintritt in die Stationärphase schnell an Qualität hinsichtlich der Quantität potentieller Produkte verloren haben oder teilweise ausbleichen, wurden alle Kultivierungen – wie bereits erwähnt – unter photoautotrophen Bedingungen immer mit heterotroph gewachsener Biomasse begonnen, um stets gleichbleibende Startbedingungen zu generieren.

Da hierfür konsequent sieben bis zehn Tage alte heterotrophe Kulturen mit wenig Paramylon verwendet wurden, zeigte sich ein langsames Anlaufverhalten der Kulturen bei der Ausbildung des photosynthetischen Apparates, was zu geringem Wachstum innerhalb der ersten Tage führte. Als Möglichkeit die verschiedenen Wachstumsgeschwindigkeiten anzugleichen, wurden unterschiedliche Phytohormone und andere Substanzen eingesetzt, von denen im Folgenden diejenigen vorgestellt werden, welche das größte Potential als Wachstumsbeschleuniger aufwiesen. Eine beschleunigende Wirkung war bei den Ausgangs-pH-Werten 3,5, 5,5 und 7,0 sichtbar und ist exemplarisch für pH 5,5 in Abbildung 39 dargestellt. Wie bereits erwähnt, ist insbesondere um pH 5,0 eine geringe Wachstumsgeschwindigkeit bei *E. gracilis* beschrieben worden. Dass manche Phytohormone und Steroide das Wachstumsverhalten beeinflussen, wurde in einigen Studien gezeigt oder nur erwähnt [Elliot 1939; Cramer und Myers, 1952; Buetow und Levedahl 1957]. Ebenfalls wurden zwei Vitamine hinzugezogen. Ausgesucht wurden kostengünstige Stoffe, welche bei eventueller kommerzieller Nutzung den Preis eines Prozessmediums minimal belasten würden. Untersucht wurden die Substanzen α -Naphthylelessigsäure, 3-Indolessigsäure, γ -3-n-Indolbuttersäure, Cholecalciferol (Vitamin D₃), Phyllochinon (Vitamin K₁) und Cholesterin in Konzentrationen von 1 bis 100 mg L⁻¹. Da sich die Phytohormone oder Cholesterin in Ethanol oder Hexan lösen, wurden die Substanzen hochkonzentriert angesetzt, so dass nur eine geringe Menge der organischen Lösungsmittel ins Medium gelangten (0,1 mL L⁻¹). Das Medium der Referenzkulturen wurde mit einer äquivalenten Menge des Lösungsmittels versetzt. Die Endkonzentration der Phytohormone lag bei 1 mg L⁻¹ Medium. Ergebnisse der Kultivierungen mit 0,1 g L⁻¹ Cholesterin werden nicht gezeigt.

Bei Cholesterinzugabe wurde zu Beginn der Kultivierung eine etwa doppelt so hohe Biotrockenmassekonzentration bei gleicher Vorkultur für alle Versuchsansätze ermittelt, da sich das Cholesterin in Flockenform nicht in wässriger Umgebung löste und im Zellpellet das Gewicht verfälschte. An Tag sieben der Kultivierung wurde hier eine Biotrockenmassekonzentration von $5,1 \text{ g L}^{-1}$ ermittelt – die Zellen zeigten jedoch eine stark entartete Zellmorphologie, da sich vermutlich auch Cholesterin in der Membran der Zellen eingelagert hatte. Ebenfalls ließen sich hohe Biotrockenmassekonzentration im Vergleich zur Referenz mit der Supplementierung von Vitamin D₃ (Cholecalciferol) erreichen, welche jedoch wenig reproduzierbar waren. Mehrere Versuche mit Triplikaten ergaben hier Biotrockenmassekonzentration ähnlich der Referenz oder bis zu $1,4 \text{ g L}^{-1}$ mehr Biotrockenmasse nach sieben Tagen Kultivierung. Wie aus Abbildung 39 ersichtlich wird, führten insbesondere die drei ausgewählten Phytohormone beträcht-

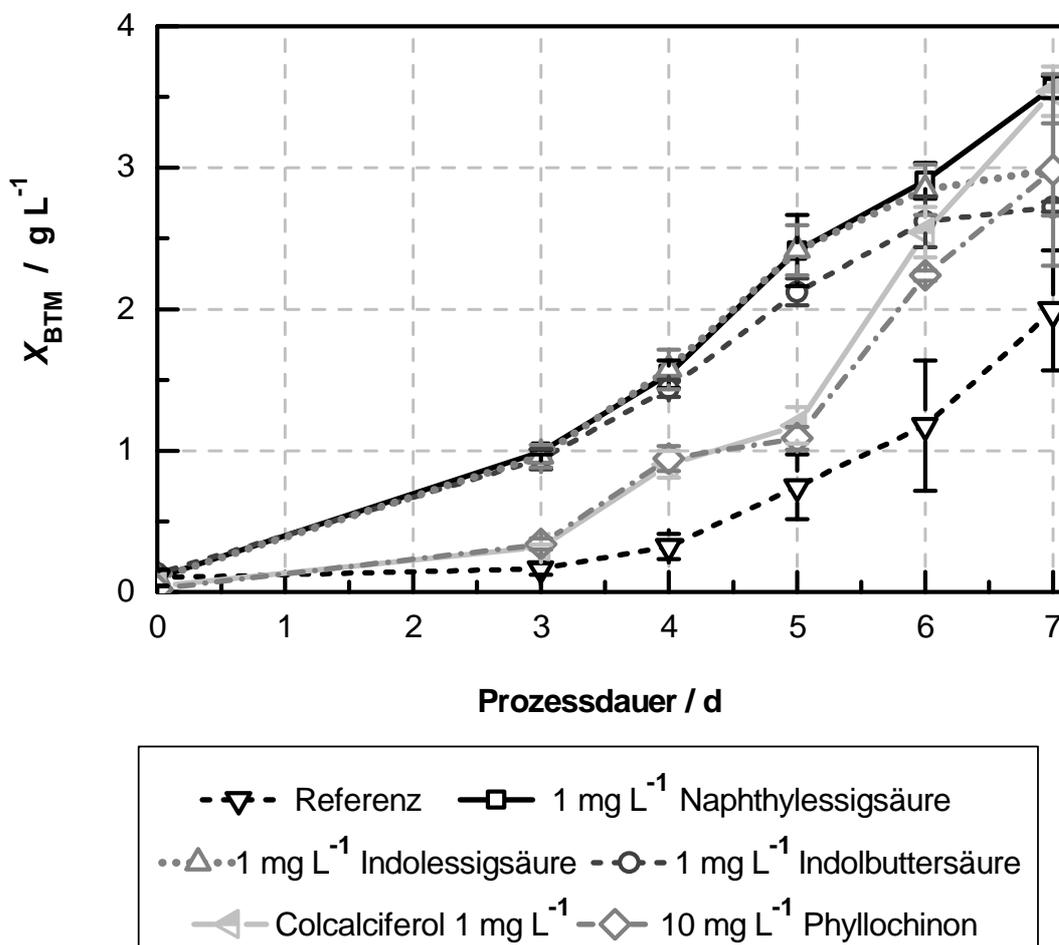


Abbildung 39: Kultivierungen von *E. gracilis* im CM-Medium mit Phytohormonen oder Vitaminen und ohne Zusätze (Referenz) bei pH 5,5 und einem Lichtfluss von $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Alle Kultivierungen wurden bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ auf bodenilluminierten Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min^{-1} in einer Gasatmosphäre aus 5% CO_2 und 95 % Luft durchgeführt. Jeder dargestellte Kurvenverlauf repräsentiert drei parallel angesetzte Kulturen aus gleicher Vorkultur. Inokulum: je 10 mL einer mindestens 1 Woche alten heterotrophen Kultur. Bedingt durch Probenahmen sank die Schichtdicke der Kulturen (Schicht bei $t_0 = 2,3 \text{ cm}$). $N = 3$.

lich zu einer Beschleunigung der Anlaufphase in den ersten Tagen verglichen mit der Referenz. Es sei erwähnt, dass die hier dargestellten Kulturen am Tag sieben noch nicht die Stationärphase erreichten. Insgesamt wurden in den Kulturen mit Supplement am siebten Tag 0,7, 1,0 bzw. 1,5 g L⁻¹ höhere Biotrockenmasse bei den Phytohormonen und 1,5 bzw. rund 1,0 g L⁻¹ höhere Biotrockenmasse bei den Vitaminen Cholecalciferol und Phyllochinon (Vitamin K1) generiert als im Referenzmedium. Kultivierungen über zehn Tage, bei denen von Tag zwei bis sieben keine Proben genommen wurden zeigten jedoch, dass mit Phytohormonen supplementierte Kulturen auch beim Eintritt in die Stationärphase mehr Biomasse aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Eine Beschleunigung der Biomassebildung konnte durch die Zugabe ausgewählter Stoffe begünstigt werden. Dabei stellte sich die Zugabe von Naphthyllessigsäure als besonders wirkungsvoll heraus und wäre für eine Anwendung für das Bioraffineriekonzept von Interesse, da dieses Phytohormon im technischen Maßstab synthetisch hergestellt wird und sich bei einem Preis von unter 30 \$ kg⁻¹ laut Handelsplattform alibaba.com (Stand Februar 2016) bewegt, was für 100 m³ Nährmedium ausreichen würde.

4.4 Entwicklung eines Prozessmediums

Die Entwicklung eines neuen Mediums für *E. gracilis* für die Nutzung in einem Bioraffineriekonzept erwies sich aus verschiedenen Gründen als notwendig. Wurden ausgehend vom recht einfach und damit auch kostengünstigen CM-Medium gute Grundlagen geschaffen, um Vergleiche mit der Literatur zu ziehen, zeigte sich dieses Medium in einigen Punkten eher nachteilhaft für ein Bioraffineriekonzept. Primär ist dieses Medium nicht frei von Kohlenstoffquellen. Zudem zeigten sich Probleme in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse insbesondere bei photoautotroph gewachsenen Vorkulturen für photoautotrophe Kultivierungen. Deshalb wurden zur Vergleichbarkeit verschiedener Kultivierungsreihen heterotrophe Vorkulturen für photoautotrophe Kultivierungen eingesetzt. Spontane Ausbleicheffekte wurden mit einer nach Dubash und Rege [1968] optimalen jedoch höheren Vitamin B₁₂-Konzentration kompensiert, was damit nicht in eine wirtschaftlichere Richtung stieß. Weiterhin wurden bei photoheterotrophen Kultivierungsreihen mit verschiedenen Ausgangs-pH-Werten ausgesuchte Komponenten im Bereich von 0,01 bis 10,0 g L⁻¹ zugesetzt, die eventuelle Wachstumsvorteile haben könnten oder sollten [Hosotani *et al.*, 1987; Cook und Kaiser, 1973, Schuber *et al.*, 1981]. Unter anderem waren dies Carbonsäuren, Alkohole, Aminosäuren, Polyamine und Glycerin. Ebenfalls wurden Substanzen geprüft, die die Produktion der potentiellen Hochwertprodukte fördern könnten oder sollten [Whistance und Threlfall, 1967; Popoff und Paspaleff, 1924], wie beispielweise Isoprenol, Isoamylalkohol, Geraniol oder Strychnin. Auf die Daten der Zugaben von C-Quellen wird im folgenden nicht näher eingegangen.

4.4.1 Entwicklung des EG-Mediums für *E. gracilis*

Das CM-Medium beinhaltet eine große Menge Natriumcitrat als Komplexbildner. Dies kann zwar von *E. gracilis* nicht verstoffwechselt werden [Hurlbert und Rittenberg, 1962], stellt aber ein potentielles Substrat für alle unerwünschten Kontaminationen dar, die Citrat verstoffwechseln können. Weiterhin enthält das CM-Medium eine große Menge an Phosphat, was nicht vom Organismus assimiliert wird und im Rahmen der Nachhaltigkeit und der global endlichen Menge an Phosphat reduziert werden sollte. Insgesamt stellte sich die Frage, ob die Konzentrationen der Hauptbestandteile vom CM-Medium in ihrer Größenordnung notwendig, zu gering oder einfach nur wachstumsfördernd waren. Deshalb wurden zahlreiche Kultivierungen durchgeführt, bei denen die Stickstoff-, Schwefel-, Magnesium-, Calcium-, Eisen- und Kaliumkonzentration variiert wurden. Weiterhin wurden andere Stoffquellen wie z.B. Ammoniumsulfat oder -chlorid statt Ammoniumphosphat für das Medium untersucht. Da bereits bekannt ist, dass EDTA in der Konzentration von 0,01 % (w/w) ebenfalls ein geeigneter Komplexbildner ist [Hurlbert und Rittenberg, 1962], wurde dieses als neuer Standardkomplexbildner verwendet. Zudem wurden die nach der Düngemittelverordnung ebenfalls düngemittelkonformen Chelatoren HEDTA (*N*-(2-Hydroxyethyl)-ethylendiamin-*N,N,N*-triessigsäure) und DPTA (Diethylentriaminpentaessigsäure) untersucht. Einige der Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

Um den genauen Substratverbrauch zu quantifizieren wurden die Elemente Magnesium, Phosphor (als Phosphat), Schwefel (als Sulfat), Stickstoff (als Ammonium und Gesamtstickstoff) Kalium und Gesamtkohlenstoff mit Hilfe von HACH-Lange Tests in mehreren Kulturen mit jeweils drei Replikaten aus Schüttelkoben und aus dem Flachplatten-Photobioreaktor an verschiedenen Tagen bestimmt (Daten nicht gezeigt). In Bezug auf die generierte Biomasse bei diesen Kulturen konnte eine Aussage über ihre Zusammensetzung getroffen werden und mit den Elementarzusammensetzungen aus der Literatur verglichen werden [Kempner und Miller, 1964]. Ebenfalls wurde mit der Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffs überprüft, ob *E. gracilis* wirklich kein Citrat aufnehmen bzw. verstoffwechseln kann, was zutraf. Generell wurde bei den Überprüfungen auch das Frischmedium auf seine Zusammensetzung geprüft, da bei den HACH-Lange Tests einige Fremd-Ionen die Messungen verfälschen konnten.

Die Ergebnisse wiesen eine hohe Übereinstimmung mit den Daten von Kempner und Miller [1964] auf. Bei der Verwendung des CM-Mediums (pH 6,8) verblieben beispielsweise nach einer siebentägigen Kultivierung bei Standardbedingungen mit $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in Schüttelkoben rund 90 % des Magnesiums im Medium. Bei Kultivierungen im Bioreaktor zeigte sich ein deutlich höherer Verbrauch bei sonst identischen Kultivierungsbedingungen. Kulturüberstände von Tag sechs der jeweiligen Kultivierung wiesen einen Verbrauch von 20 bis 30 % auf. Bei

Proben vom Tag neun konnte nur noch ein Restgehalt von rund 20 % im Vergleich zum Referenz-/Frischmedium ermittelt werden. Bei einem Zellgehalt von $1,4 \text{ mg g}^{-1}$ nach Kemptner und Miller [1964] und 23 mg L^{-1} im vorgelegten Medium erschienen die Werte bei den erreichten Biotrockenmasskonzentrationen plausibel, wenn auch der Verbrauch im Bioreaktor der späteren Zeitpunkte deutlich darüber lag. Zuvorige Ergebnisse aus Kultivierungen gaben den Anschein, dass mehr Magnesium förderlich wäre für eine Erhöhung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit. Eine Abhängigkeit hierzu wurde bei Magnesiumkonzentrationen im Medium von $0,5$ bis 40 mg L^{-1} beobachtet [Zielinski und Price, 1978]. Weitere eigene Versuche mit schwefelhaltigen Komponenten zeigten schließlich, dass der Sulfat-Anteil des Magnesiumsulfates ein besseres Wachstum bedingte. Bei Kultivierungen zur Untersuchung, ob *E. gracilis* Glycerin verstoffwechseln kann, wurde mit 10 g L^{-1} Reinglycerin, 10 g L^{-1} schwefelhaltigem Rohglycerin (Qualitäten mit $<0,5$ und $<1,5 \%$ (w/w) Schwefelanteil der Firma Sepura, Würzburg, BRD) und einer photoautotrophen Referenz gearbeitet. Es ergab sich kein eindeutiger Wachstumsvorteil mit Reinglycerin, wohingegen 10 bis 18 % mehr Biomasse bei den Kulturen mit Rohglycerin nach sieben Tagen im Vergleich zur photoautotrophen Referenz festgestellt werden konnten. Dabei wurde eine Abnahme der Glycerinkonzentration im Medium durch eine HPLC-Substratanalyse nicht nachgewiesen – es diene somit nicht als zusätzliche Kohlenstoffquelle im konventionellen Sinne. Weiterhin bestätigen die Ergebnisse indirekt die Aussagen von Harris und Kirk [1969] in Bezug auf den positiven Effekt von Ammoniumsulfat auf die Chlorophyllsynthese bzw. -regeneration im Vergleich zu anderen schwefelfreien Stickstoffquellen.

Die Untersuchungen zum Verbrauch von Phosphat mit Hilfe der Hach-Lange Tests ergaben ein ähnliches Bild bei Schüttelkolbenkultivierungen mit einer Absenkung von bis zu 10 % der ursprünglich $1,4 \text{ g}$ Phosphat je Liter. Beim Schwefel-, hier als Sulfatkonsum war der Verbrauch der gleichen Kulturen mit bis zu 35 % (Tag 7) der vorgelegten 160 mg L^{-1} Sulfat deutlich höher. Die Ergebnisse stimmen mit den erhobenen Daten von Kemptner und Miller [1964] überein. Bei Medienüberständen aus dem Bioreaktor konnte beim Phosphat ebenfalls ein höherer Verbrauch im Vergleich zu den Schüttelkolbenkultivierungen bezogen auf die gebildete Biotrockenmasse beobachtet werden, während die Verbrauchsmengen für Sulfat identisch in Schüttelkolben und Bioreaktor waren. Gegebenenfalls bedingt das schnellere Wachstum im Photo-Bioreaktor eine höhere Aufnahmegeschwindigkeit bestimmter Ionen/Elemente.

Stickstoff hingegen, welcher im CM-Medium als dibasisches Ammoniumphosphat vorliegt, wurde bei den in Schüttelkolbenkultivierungen normal wachsenden Kulturen mit bis zu 90 % fast vollständig verbraucht. Auch bei Kultivierungen im Bioreaktor konnten zum Ende der Kultivierungen zwischen Tag acht und vierzehn lediglich 8 bis 15 % des ursprünglich vorhandenen Stickstoffs ermittelt werden. Auf die Ergebnisse der Kaliumbestimmung wird nicht weiter eingegangen, da die Ergebnisse durch die Ammonium-Ionen im Medium stark verfälscht wurden.

Die Ergebnisse der Gesamtorganischen Kohlenstoff-Messung ergaben im Vergleich zum untersuchten Frischmedium identische bis doppelt so hohe Konzentration bei den meisten überprüften Überständen – generell wurde ein deutlicher Anstieg in Proben aus dem Bioreaktor mit bis zur sechsfachen Menge ermittelt. Da Algen generell viele Stoffe sezernieren und durch Zellyse viele Stoffe mit Kohlenstoffanteil im Medium akkumulieren, ist dieser Befund zu erwarten gewesen.

Die Ergebnisse der Hach-Lange Tests zeigten somit, das insbesondere bei Phosphat Einsparungen vorgenommen werden konnten. Da das Kalium nicht eindeutig quantifiziert werden konnte, ist zunächst laut Kempner und Miller [1964] davon ausgegangen worden, das es ebenfalls in wesentlich geringerem Umfang von Nöten sein muss. Weiterhin wurde das gesamte Natriumcitrat 5,5 H₂O mit 0,36 g L⁻¹ durch 0,011 g L⁻¹ EDTA × 2 Na × 2 H₂O ersetzt. Da der Verbrauch von Magnesium in Schüttelkolben- und Bioreaktorkultivierungen auch bei erneuten Messungen sehr unterschiedlich war, wurden beim empirisch optimierten Medium zwei Varianten mit verschiedenen Magnesiumsulfatkonzentrationen weiter untersucht, dass EG2-Medium mit 0,0197 g und das EG5-Medium mit 0,0493 g L⁻¹ Magnesium im Vergleich zu den 0,0227 g L⁻¹ im CM-Medium. Das EG5-Medium wurde zunächst mit 0,1 g L⁻¹ CaCl₂ × 2H₂O angesetzt. Da weitere Versuche mit geringeren Calcium-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede während des Wachstums zeigten, wurde das EG5.1-Medium mit nur 0,03 g L⁻¹ CaCl₂ × 2H₂O für weitere Versuche eingeführt. Mit dem EG5-Medium wurden deshalb nur wenige Versuche durchgeführt. Allgemein sind die wesentlichen Unterschiede der Medien in der Tabelle 10 zusammengefasst.

Es wird deutlich, dass bei den EG-Medien die Phosphormenge um etwa die Hälfte reduziert wurde, das Kalium weist in etwa nur noch ein Zehntel der Ursprungsmenge auf, während Stickstoff- und Schwefel-Konzentrationen massiv erhöht wurden. Das im CM-Medium eingesetzte Citrat wurde durch den Komplexbildner EDTA als Dinatriumsalz Dihydrat ersetzt, so dass auch Spuren von Natrium zur Verfügung standen. Versuche mit reinem EDTA zeigten jedoch keine nachteiligen Effekte – vermutlich reichten die Mengen Natrium, die als Verunreinigungen ins Medium geraten, für die Bedürfnisse von *E. gracilis* aus.

Tabelle 10: Zentrale Bestandteile der Medien CM, EG5.1 und EG2. Die Werte beziehen sich auf die Einwaagen der Elemente bzw. Ammonium, Sulfat und Phosphat. Die Gesamteinwaage bezieht sich auf alle verwendeten Salze außer der Spurenelemente, Vitamine und pH-Korrekturmittel.

	NH ₄	N	SO ₄	S	PO ₄	P	Mg	K	Ca	Gesamteinwaage
	g L ⁻¹									
CM	0,27	0,21	0,09	0,03	1,41	0,46	0,02	0,29	0,01	2,62
EG5.1	0,41	0,32	0,56	0,19	0,79	0,26	0,05	0,03	0,01	2,14
EG2	0,41	0,32	0,44	0,15	0,79	0,26	0,02	0,03	0,01	1,91

4.4.2 Vergleich von EG2-, EG5.1- und CM-Medium mit verschiedenen Lichtquellen

Für einen Vergleich des konventionellen CM-Mediums mit dem eigens entwickelten EG2- und EG5.1-Medium wurden photoautotrophe Vorkulturen mit den jeweils gleichen Medien zur Inokulation der Hauptkulturen verwendet. Um bei den Zellen im CM-Medium keine Alterserscheinungen der Zellen wie oben beschrieben zu erhalten, wurden drei Tage alte Kulturen durch eine 30 minütige Sedimentation in den Kolben angereichert und Mehrfachansätze vereinigt. Für eine gute Vergleichbarkeit wurden die Vorkulturen im EG5.1-Medium gleichbehandelt. In Abbildung 40 links wird deutlich, dass bereits in den ersten zwei Tagen die Kulturen im EG5.1-Medium höhere Biotrockenmassekonzentrationen aufgebaut hatten. Über die gesamte Kultivierungsdauer von elf Tagen wiesen die Kulturen im CM- und EG5.1-Medium mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten von 0,26 bzw. 0,42 d⁻¹ auf, wobei im CM-Medium eine maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit von Tag zwei bis sieben mit 0,34 d⁻¹ ermittelt wurde. Eine maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Kulturen im EG5.1-Medium wurde vom Anfang an bis zum Tag zwei mit 0,54 d⁻¹ vorgefunden. Die lineare Entwicklung des Kurvenverlaufes insbesondere beim EG5.1-Medium lässt eine Limitierung vermuten, welche wahrscheinlich durch einen limitierenden CO₂-Transport im Medium bedingt war. Die Kulturen im EG5.1-Medium erreichten nach Tag zehn eine Biotrockenmassekonzentration von 4,9 g L⁻¹, wobei kein Eintritt in die Stationärphase zu erkennen ist. Die im CM-Medium gewachsenen Kulturen zeigten einen typischen Verlauf und erreichten am Tag elf eine Biotrockenmassekonzentration von 3,1 g L⁻¹. Ein weiterer Versuch zum Vergleich der neuen Medien erfolgte mit LED-Illumination, welche eine andere Lichtverteilung und -qualität durch die LED aufwies. Diesmal wurde eine Vorkultur photoautotroph für alle Ansätze angezogen, da heterotrophe Vorkulturen bei den EG-Medien unnötig wurden. Die Wachstumsverläufe sind in Abbildung 40 rechts abgebildet. Es wird deutlich, dass die Kulturen in den verschiedenen Medien bis zum Tag acht ähnliche Biotrockenmassekonzentrationen von 4,1 bis 4,4 g L⁻¹ erreichten. Ab Tag acht gingen die Kulturen im CM-Medium in die stationäre Phase über, während die Kulturen in den EG-Medien identisch weitergewachsen sind und nach 13 Tagen eine Biotrockenmassekonzentration von rund 6 g L⁻¹ vorwiesen, wobei ein Übergang in die Stationärphase nicht zu erkennen war. In allen Medien war die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Kulturen zwischen Tag eins und zwei mit 1,1 (CM und EG2) und 1,3 d⁻¹ (EG5.1) am höchsten, während sich um Tag vier ein oftmals beobachteter temporärer Einbruch in der Wachstumsgeschwindigkeit abzeichnete. Die generell höheren spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten entstanden durch die deutlich effektivere LED-Illumination im Vergleich zu Leuchtstoffröhren, wie im zuvor beschriebenen Experiment. Insgesamt waren die Ergebnisse für die Biotrockenmasse-, α -Tocopherol- und Paramylonkonzentrationen aus Kulturen im EG5.1-Medium geringfügig höher, jedoch überschritten sich häufig die Standardabweichungen mit dem

EG2-Medium, so dass kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. Weitere Versuche zeigten, dass sich Unterschiede zwischen EG2 und EG5.1-Medium bei identischen Bedingungen bei 500 bis 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erst ab Tag 14 bis 16 zeigten, was in einer Differenz der Biotrockenmassekonzentration von 0,75 g L^{-1} am Tag 21 resultierte (Daten nicht dargestellt).

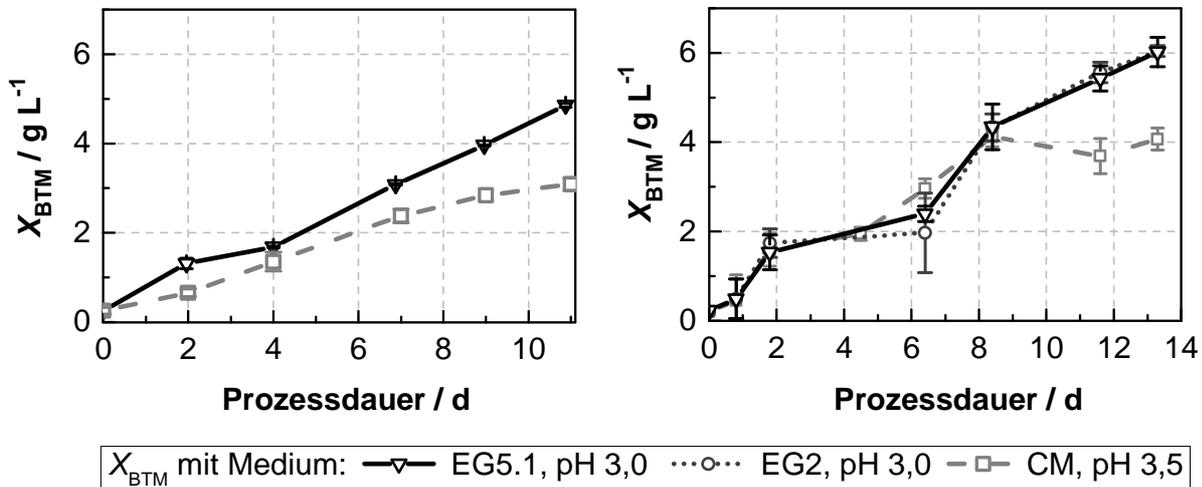


Abbildung 40: Kultivierungen von *E. gracilis* im CM-Medium bei pH 3,5 und EG5.1- und EG2-Medium bei pH 3,0 und initialen Schichtdicken von 2,3 cm. Die Schichtdicke der Kulturen sank bedingt durch Probenahmen und Verdunstung. Die Vergleichskultivierungen wurden mit beiden Illuminationssystemen durchgeführt, die für die Orbitalschüttler entwickelt wurden. **Links:** Lichtfluss von 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit HAGEN AquaGlo Leuchtstoffröhren **Rechts:** Lichtfluss von 570 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ LED Illumination. Alle Kulturen wurden mit drei Tage alten angereicherten photoautotrophen Vorkulturen inokuliert und bei 28 °C bei einer Schüttlerdrehfrequenz von 120 min^{-1} und in einer Gasatmosphäre aus 5 % CO_2 und 95 % Luft angezogen. N = 6.

Des Weiteren ist bei Betrachtung der spezifischen α -Tocopherolkonzentration deutlich geworden, dass auf EG-Medium gewachsene Kulturen in der Regel etwa doppelt so viel α -Tocopherol während der gesamten Prozessdauer akkumulierten, als Kulturen im CM-Medium. Ebenfalls wiesen Kulturen, die im EG5.1-Medium wuchsen, über einen langen Zeitraum eine hohe Viabilität der Biomasse auf, was im CM-Medium nicht der Fall war. Somit konnten weitere Versuche und Charakterisierungen mit bereits photoautotroph gewachsenen Kulturen ohne große Umstände begonnen werden, was beim CM-Medium nicht voll reproduzierbar war. Bei einem Langzeitversuch wurde eine photoautotrophe Kultur über ein Jahr lang stets nach zwei bis drei Wochen in photoautotrophe Bedingungen überimpft und wies keinerlei qualitative oder quantitative Einschränkungen auf. Ein solches Vorgehen hätte bei der Verwendung vom CM-Medium zu den bereits erwähnten Problemen geführt. Ein Ausbleichen der Kulturen, wie es im CM-Medium vorkam, ist in den EG-Medien nicht mehr beobachtet worden. Weiterhin wurden Kulturen über 45 Tage im EG5.1-Medium in gleichem Schüttelkolben bis zum vollständigen Ausbleichen der Zellen durch Alterung/Cystenbildung und Nährstoffmangel inkubiert und dann wieder in frisches Medium überimpft. Nach vier Tagen im neuen Medium begannen die

Zellen wieder sichtbar photoautotroph zu wachsen, während bereits nach zwei Tagen erste ergrünte Zellen vorgefunden wurden. Insgesamt zeigte sich bei Kultivierungen im EG5-Medium ein stabiles Wachstum, was für die Prozessstabilität eines Bioraffineriekonzeptes essenziell ist. Zudem konnte bei anderen Versuchen ebenfalls beobachtet werden, dass die Zellen auch bei kurzen Hitzeschocks über die Mittagszeit bis 42 °C die widrigen Bedingungen ohne massives Zellsterben vertragen konnten. Dies liegt vermutlich an der Schwefelkonzentration im entwickelten Medium. Ausreichende Mengen an Schwefel sind essentiell zur Bildung von Disulfidbrücken bei Proteinen, welche für die Thermostabilität von Proteinen mitverantwortlich sind [Betz 1993]. Auch die Cobalamin-abhängige Methionin-Synthetase von *E. gracilis* profitiert von ausreichenden Schwefelkonzentrationen zur Bildung von S-Adenosylmethionin. Dabei ist bekannt, dass S-Adenosylmethionin das Photosystem I stabilisiert [Isegawa *et al.*, 1994], da die Photosysteme sehr thermosensitiv bei höheren Temperaturen reagieren [Ortiz, 1990].

4.4.3 Mathematische Optimierung des EG2-Mediums nach der *surface response*-Methode

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Ergebnisse der Kultivierungen mit dem EG2- und EG5.1-Medium identisch waren. Auch wenn ein geringer Unterschied nach längerer Kultivierungsdauer von drei Wochen festgestellt wurde, war dieser nicht relevant, da in diesem Bioraffineriekonzept keine einfachen Satzkultivierungen im technischen Maßstab vorgesehen sind. Somit wurde das EG2-Medium zu einer mathematischen Optimierung herangezogen. Nach der oben beschriebenen empirischen Verbesserung des Mediums erfolgte eine weitere Optimierung vom EG2-Medium mit Hilfe der *response surface*-Methode (RSM) und der Software Modde (Version 10.1 von Umetrics/MKS Instruments AB, Malmö, Schweden), indem ein bestimmter Bereich des gesamten Wertebereichs der Parameter betrachtet wurde. Aus der empirischen Optimierung wurde deutlich, dass der Schwefel-Anteil oder die Stickstoff- und Schwefel-Konzentrationen einen Einfluss auf die relevanten Messgrößen hatten. Gesucht wurden Bereiche der Produktmaxima für die α -Tocopherol- und Paramylonkonzentrationen unter dem Kriterium eines minimalen Substrateinsatzes. Weitere Messgrößen waren die spezifischen Produktkonzentrationen. Zur Gestaltung des Versuchsplans diente *das central composite design* (CCD), wobei für die benötigte Matrix als unabhängige Parameter bzw. Stellgrößen verschiedene Substratkonzentrationen von Stickstoff und Schwefel eingesetzt wurden. Die abhängigen Parameter bzw. Messgrößen waren die oben genannten Produktkonzentrationen, wobei zur Optimierung die Messgrößen unterschiedlich kombiniert werden konnten. In der verwendeten Matrix wurden die Werte für das aktuelle Optimum gleich Null gesetzt, während neue Werte der unabhängigen Parameter mit -1 und 1 beschrieben wurden. Die ermittelten Ergebniswerte wurden in einer polynomischen Regression zweiten Grades zur Ermittlung der Konstante α_0 und der Koeffizienten α_{1-n} genutzt. Bei den zwei untersuchten unabhängigen

Parametern ergeben sich die Koeffizienten x^2_1 , x^2_2 , x_1 , x_2 , und x_1x_2 , und führen zur Lösung des Polynoms: $y(x_1, x_2) = \alpha_0 + \alpha_1 x_1 + \alpha_2 x_2 + \alpha_3 x^2_1 + \alpha_4 x^2_2 + \alpha_5 x_1x_2$. Das Ergebnis wurde durch Konturdiagramme visualisiert, welche im Folgenden diskutiert werden. Eine solche Berechnung konnte mit den Ergebnissen von vier Zeitpunkten der Kultivierung mit insgesamt neun verschiedenen Medienzusammensetzungen erfolgen, bei denen die Stickstoff- und Schwefelkonzentrationen, wie in Tabelle 11 beschrieben, variiert worden sind.

Tabelle 11: Die Zusammensetzung der Medien A - I unterschieden sich in der Stickstoff- und Schwefelkonzentration, welche hier in g L^{-1} angegeben sind. Als Grundlage diente das EG2-Medium.

Element	Stickstoff			
	g L^{-1}	0,125	0,250	0,375
Schwefel	0,169	A	B	C
	0,313	D	E	F
	0,456	G	H	I

Um alle Zusammensetzungen bei einem einheitlichen pH-Wert zu erhalten, wurde Calciumdihydroxid statt Calciumchlorid, Ammoniumchlorid und Schwefelsäure verwendet, womit die elementare Medienzusammensetzung nicht verändert wurde. Damit konnte ein einheitlicher Anfangs-pH von 2,3 bei allen Medien erreicht werden – das Einstellen des pH auf den üblichen Wert von 3,0 war nicht möglich, da Natrium und Kalium in Form von Hydroxiden nicht verwendet werden konnten. Diese Elemente würden das Wachstum beeinflussen [Benson und Hall, 1972] und die Interpretation der Ergebnisse erschweren. Da sich die Kulturen generell unter solchen Bedingungen während des Wachstums bis zu einem pH von 1,9 ansäuerten, lagen bei diesen Versuchen also die Potentiale der Ansäuerung durch Ionenassimilation beim Wachstum nur im sehr geringen Maße vor. Insgesamt sind die Kulturen langsamer gewachsen, so dass zur Analyse die Daten aus den späteren Zeitpunkten der Kultivierung verwendet wurden, zumal die Biomassekonzentrationen der einzelnen Medienzusammensetzungen bei früheren Zeitpunkten sehr ähnlich waren. Ein leichter Trend in Bezug auf die maximale Biotrockenmassekonzentration war bei den Medien B, E und H mit der mittleren Stickstoffkonzentration am Tag 12 zu erkennen. Im Vergleich zu allen anderen Kultivierungen mit den EG-Medien wurden nach 12 Tagen Kultivierungsdauer bei hohen Lichtflüssen mehr als doppelt so hohe Biotrockenmassekonzentrationen erreicht, wie in Abbildung 41 (vergleiche hierzu mit Abbildung 44). Da der größte Unterschied im Anfangs-pH-Wert der Medien für die Optimierung im Vergleich zu den EG2- und EG5.1-Medien lag, war die Vermutung hinsichtlich des verminderten Potentials zur Ansäuerung beim Wachstum nicht falsch, zumal die Medien für die Optimierung am Ende der Kultivierungen pH-Werte von 1,9 bis 2,1 aufwiesen und eine Wiederholung der Kultivierungen identische Biotrockenmassekonzentrationen lieferte.

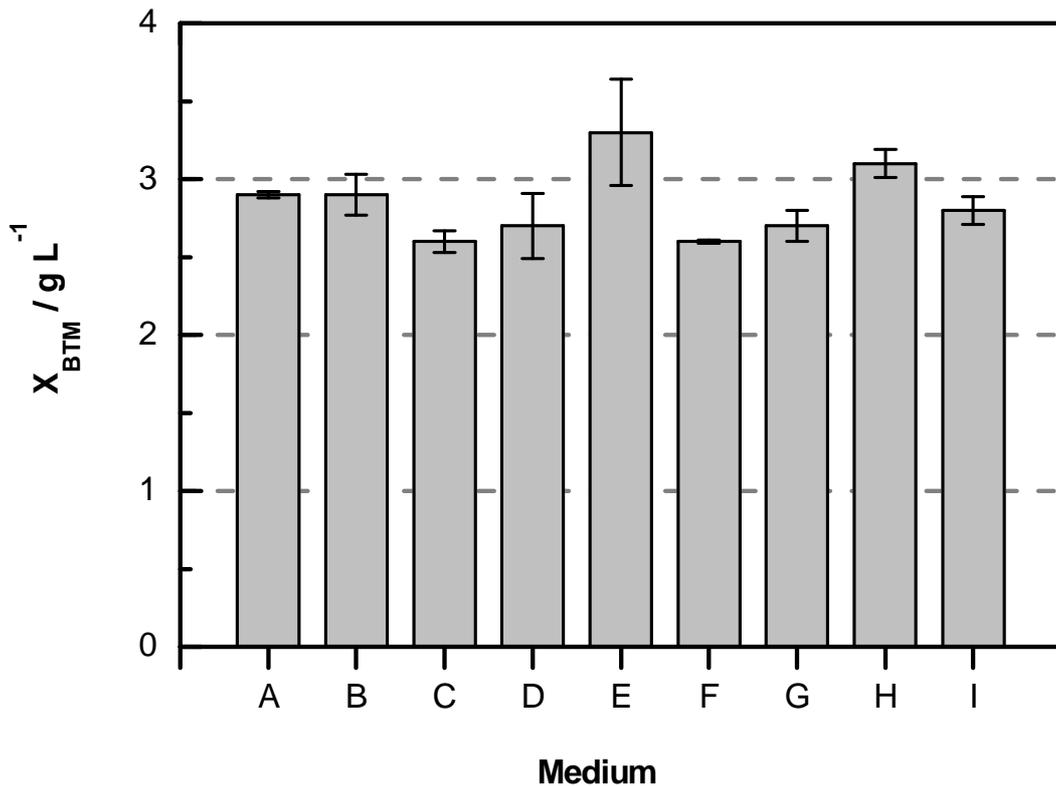


Abbildung 41: Biotrockenmassekonzentrationen vom Tag 12 aus Kultivierungen von *E. gracilis* mit EG2-Medien in den Varianten A bis I bei pH 2,3 zur Medienoptimierung. Die einzelnen Kulturvolumen lagen bei jeweils 100 mL, was einer initialen Schichtdicke von 2,3 cm im Ruhezustand entsprach. Die Unterschiede der Medien liegen im Schwefel- und Stickstoffanteil, was der Tabelle 11 zu entnehmen ist. Alle Kulturen wurden bei einem Lichtfluss von $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bodenilluminert und wurden bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$, einer Schüttlerdrehfrequenz von 120 min^{-1} und in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO_2 und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 6.

Bei Betrachtung der spezifischen Konzentrationen wurden die Einflüsse der verschiedenen Medienzusammensetzungen jedoch deutlich, was in Abbildung 42 zu erkennen ist. Bei den Medien A, D und G werden mit der jeweils geringsten Stickstoffkonzentration von $0,125 \text{ g L}^{-1}$ die maximalen Produktanteile deutlich, wobei Medium D die höchste spezifische Konzentration von $2,2 \text{ mg g}^{-1} \alpha\text{-Tocopherol}$ erreichte. Ausgehend von den Medien A, D und G sinken jeweils die spezifischen $\alpha\text{-Tocopherol}$ konzentration mit Zunahme der Stickstoffkonzentrationen im Medium. Letztendlich wird damit das Muster der Medienmatrix in Tabelle 11 mit ihren Konzentrationen wiedergegeben. Ein ähnliches Bild zeigten die spezifischen Paramylonkonzentrationen am Tag 12 der Kultivierung, wenn auch deutlicher ausgebildet. Werden die einzelnen Mediengruppen ABC, DEF, GHI betrachtet, so fanden sich erneut bei den Medien A, D und G die höchsten Produktkonzentrationen mit der Ausnahme, dass G und H eine nahezu gleiche spezifische Paramylonkonzentration aufwiesen. Insgesamt ist ein leichter Trend zu höheren spezifischen Konzentrationen (wie bereits auch bei den spezifischen $\alpha\text{-Tocopherol}$ konzentration beschrieben) im Bereich der Medien D, E und F zu erkennen. Allgemein kann die Hypothese der empirischen Optimierungen bestätigt werden, dass mehr Schwefel, als im

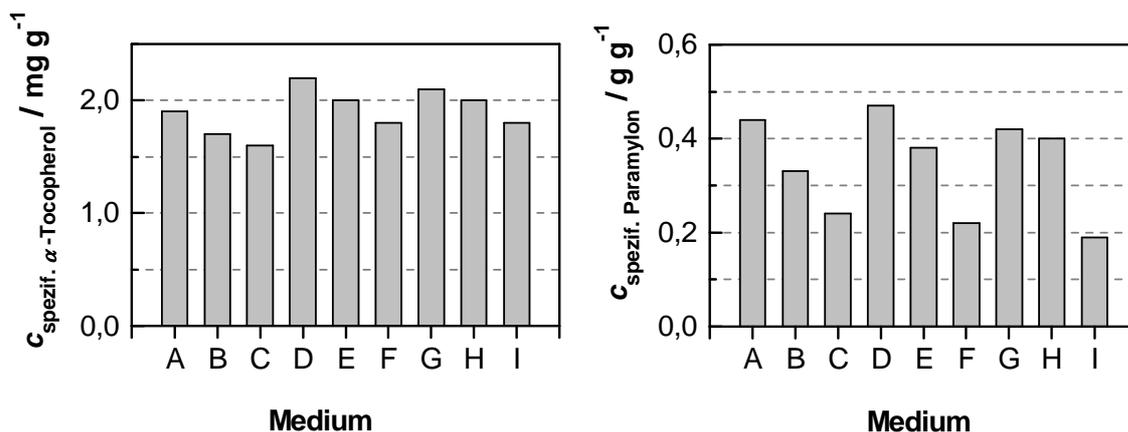


Abbildung 42: Spezifische Produktkonzentrationen von α -Tocopherol und Paramylon vom Tag 12 aus Kultivierungen von *E. gracilis* mit EG2-Medien in den Varianten A bis I bei pH 2,3. Die Unterschiede der Medien liegen im Schwefel- und Stickstoffanteil, was der Tabelle 11 zu entnehmen ist. Die Schichtdicken wurden konstant auf 1 cm eingestellt und die Verdunstung alle zwei Tage mit Wasser korrigiert. Alle Kulturen wurden bei einem Lichtfluss von $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bodenilluminert und wurden bei 28°C , einer Schüttlerdrehfrequenz von 120min^{-1} und in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO_2 und 95 % (v/v) Luft angezogen. $N = 6$.

CM-Medium einen positiven Einfluss auf die beobachteten spezifischen Produktkonzentrationen hat. Da die Stichprobenmenge begrenzt war, besteht eine Wahrscheinlichkeit, dass die betrachteten Optima der Parameter nicht mit der gewählten Abstufung übereinstimmen, sondern zwischen den Konzentrationsstufen liegen. Durch polynomiale Regressionen ließen sich die gesuchten optimalen Größen daher besser ermitteln. Wie bereits erwähnt, haben die Werte mit zunehmender Kultivierungsdauer an Aussagekraft gewonnen. Deshalb wird im Weiteren nur auf die Berechnung mit den Werten vom Zeitpunkt 12 d eingegangen. Die Regressionen wurden mit der statistischen *PLS-partial least square*-Methode (als varianzbasiertes Strukturgleichungsmodell) berechnet. Die Ergebnisse hiervon wurden zur besseren Übersicht in Konturdiagramme für die Biotrockenmasse-, Paramylon-, α -Tocopherolkonzentration und -selektivität überführt. Die Konturdiagramme für die die Biotrockenmasse, α -Tocopherol- und Paramylonkonzentrationen sind in der folgenden Abbildung 43 zu sehen. Bei der Betrachtung wird deutlich, dass sich der Mittelpunkt vom errechneten Optimum der Biotrockenmassekonzentration im Gegensatz zur α -Tocopherol- und Paramylonkonzentration nicht im Bereich der Medienzusammensetzungen A - I befindet. Das ellipsoide Optimum der Biotrockenmassekonzentration zeigt eine Fläche, die sich über einen großen Bereich der Schwefelkonzentration erstreckt. Im Sinne einer geringeren Einwaage der Medienbestandteile ist die Abstufungen von rot nach orange sehr interessant, da diese extrem flach verläuft und für Schwefel noch unterhalb von $0,10 \text{g L}^{-1}$ präsent ist. Die optimale Stickstoffkonzentration wird dagegen genauer abhängig von der Schwefelkonzentration bei $0,20\text{-}0,30 \text{g L}^{-1}$ eingegrenzt.

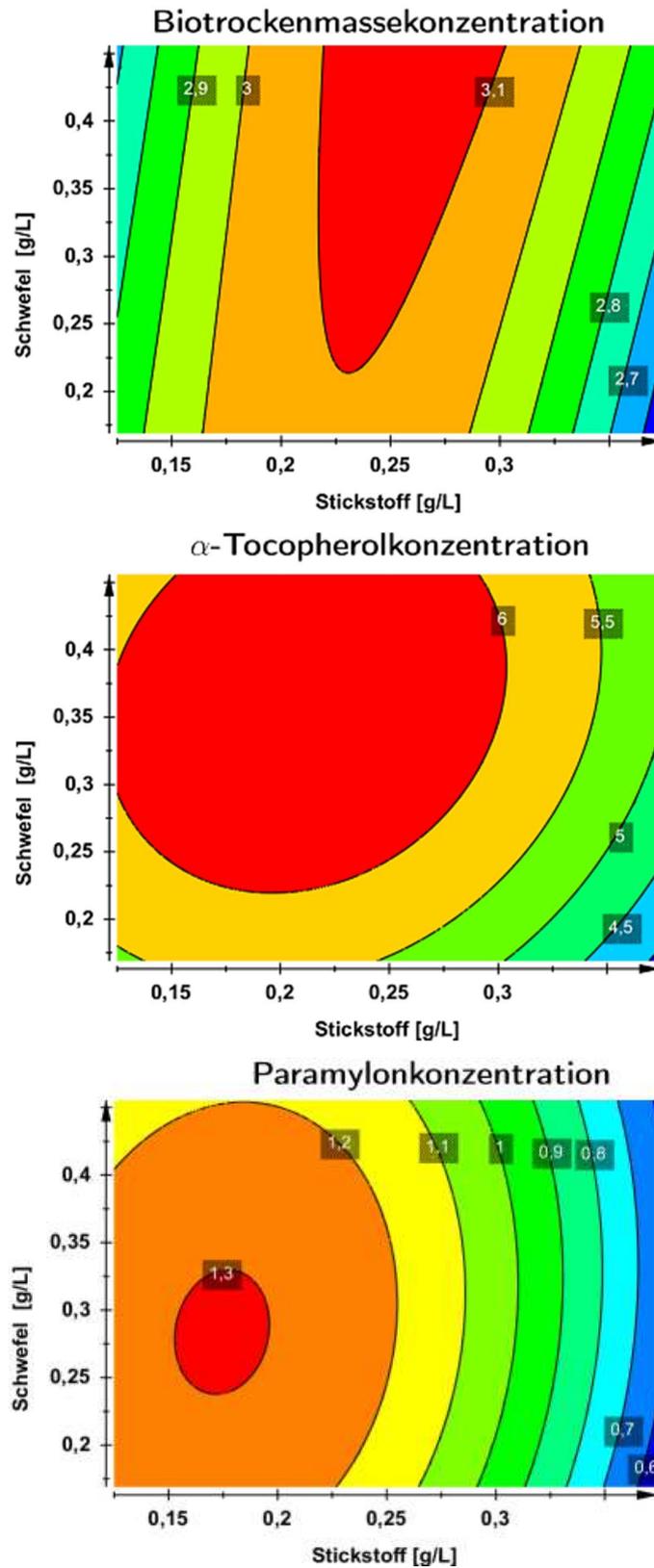


Abbildung 43: Computergestützt berechnete Konturdiagramme aus den Messwerten der Kultivierungen von *E. gracilis* in den Medienvarianten A-I (siehe Tabelle 11) am Tag 12. Aufgetragen in den Diagrammen sind die zu erwartenden Konzentrationen der Biotrockenmasse in g L^{-1} , des α -Tocopherols in mg L^{-1} und des Paramylons in g L^{-1} in Abhängigkeit von der Schwefel- und Stickstoffkonzentration. Die Modelle wurden mit Modde 10.1 (Umetrics/MKS Instruments AB, Malmö, Schweden) erstellt.

Die in diesen Kultivierungen verwendete maximale Schwefelkonzentration lag bei rund $0,46 \text{ g L}^{-1}$. Das vom Modell vorgeschlagene Zentrum vom Optimum läge jedoch im Bereich einer wachstumslimitierenden Konzentration, welche bei $0,68 \text{ g L}^{-1}$ Schwefel beginnt [Buetow, 1965]. Das Optimum der α -Tocopherolkonzentration ist relativ ausgedehnt mit einem Mittelpunkt bei $0,21 \text{ g L}^{-1}$ Stickstoff und $0,36 \text{ g L}^{-1}$ Schwefel. In dem Bereich dieser Medienzusammensetzung lag ebenfalls die maximale α -Tocopherolkonzentration bei den Kultivierungen mit $6,20 \text{ mg L}^{-1}$ vor. Die Fläche vom Optimum für die Paramylonkonzentration ist deutlich kleiner und liegt bei ca. $0,28 \text{ g L}^{-1}$ Schwefel und rund $0,18 \text{ g L}^{-1}$ Stickstoff für $1,30 \text{ g L}^{-1}$ Paramylon. Dieses Optimum flacht nur langsam ab zur nächsten sehr großflächigen Abstufung mit den erreichbaren $1,20 \text{ g L}^{-1}$ Paramylon.

Die Konturdiagramme zur Optimierung auf die Selektivitäten werden nicht dargestellt, da diese auf sehr geringe Stickstoffkonzentrationen im Medium um $0,10 \text{ g L}^{-1}$ extrapoliert wurden, was nicht im Sinne einer annehmbaren Biomassekonzentration wäre.

Insgesamt liegen bei den in Abbildung 45 gezeigten Optimierungsansätzen bei den Maxima Schnittmengen zwischen der maximalen α -Tocopherolkonzentration mit den Optima der beiden anderen Ergebnisgrößen vor, während diese untereinander (Biotrockenmasse- und Paramylonkonzentration) keine Schnittmenge ihrer Maxima in den Konzentrationsbereichen von Schwefel und Stickstoff aufzeigten. Da die Bereiche nicht sehr stark voneinander abweichen, kann hieraus trotzdem eine Medienzusammensetzung abgeleitet werden. Der Korrelationskoeffizient R^2 lag bei diesen Berechnungen zwischen 0,8 und 0,9 für die Paramylon- und α -Tocopherolkonzentration sowie deren Selektivitäten. Zur Vorhersagekraft für die Zielwerte wurde ein recht hoher Q^2 -Wert von 0,85 bis 0,89 ausgegeben. Für die jeweilige Reproduzierbarkeit lagen die Werte zwischen 0,87 und 0,96. Nur für die Biotrockenmassekonzentration lagen die Werte für R^2 , Q^2 und die Reproduzierbarkeit in niedrigeren Bereich bei 0,65, 0,49 und 0,64, was auf eine weniger vertrauenswürdige Grundlage hindeutete und falsche Vorhersagen fördert.

Die erhobenen Daten konnten im Weiteren für die Maximierung verschiedener auch kombinierter Zielgrößen eingesetzt werden. So kann sich die Maximierung auch simultan auf die Zielgrößen Biotrockenmasse-, α -Tocopherol- und Paramylonkonzentration richten. Die Optimierungen mit der Zielgröße der Biotrockenmassekonzentration wurde nicht gewählt, da hierfür die Stickstoffeinwaage erhöht werden müsste. Das Ziel dieser Optimierung war jedoch die Stoffeinwaage für die Medien zu reduzieren, jedoch identische Ergebnisse der Biotrockenmassekonzentration, α -Tocopherol und Paramylon zu erhalten, wie beim Ausgangsmedium. Hierdurch würde die finale Gewinnspanne hinsichtlich Investition und Gewinn größer werden. Außerdem wurde in Abbildung 43 deutlich, dass zu hohe Stickstoffkonzentrationen im Medium die Paramylonselektivität schmälerten. Zuletzt wurde die Einbeziehung der Biotrockenmassekonzentrationsmaximierung in Betracht gezogen, jedoch aufgrund der schlechteren Werte bei

der statistischen Analyse außen vor gelassen. Insgesamt wurden durch die Kombination der Zielgrößen α -Tocopherol und Paramylon annehmbare Zusammensetzungen durch die Software ausgegeben. Verwendet wurden somit für ein optimiertes Medium die Ergebnisse aus der Zielgrößenmaximierung der Selektivitäten, da es von Vorteil wäre hohe Selektivitäten bei etwa gleicher Biotrockenmassekonzentration, wie im EG2-Medium zu erreichen, jedoch mit weniger stofflichen Einsatz. Gewählt wurden hierfür Bereiche, welche zum Teil in orangen Bereichen der oben gezeigten Konturdiagramme liegen, da die Abstufung relativ gering ausfiel. Die Auswahl stellt also eine leicht suboptimale Zusammenstellung dar, bei der die Einwaage jedoch vergleichsweise noch deutlicher reduziert werden konnte. Weitere Vorschläge der Software waren zum Teil für konventionelle Satzkultivierungen nicht annehmbar, da beispielsweise für sehr hohe Paramylonkonzentrationen sehr geringe Stickstoffkonzentrationen vorgeschlagen wurden – diese jedoch würden kaum Biomassezuwachs erlauben.

Das neu entstandene EG6-Medium besitzt somit ein N:S-Verhältnis von 0,269 mit 0,284 g L⁻¹ Stickstoff – eine nach den Konturdiagrammen maximal empfohlene Einwaage von Stickstoff unter dem Gesichtspunkt der Zielgrößenmaximierung. Die Schwefeleinwaage mit 0,108 g L⁻¹ wurde vergleichsweise mit dem CM-Medium 3,6fach höher gewählt. Das EG6-Medium besitzt damit eine Gesamteinwaage von 1,75 g L⁻¹ während das EG5.1-Medium 2,14 g L⁻¹ aufweist. Bezogen auf die Salze ist das EG6-Medium bis auf die Ammoniumsulfatkonzentration von 0,34 statt 0,5 g L⁻¹ mit dem EG2-Medium identisch.

4.4.4 Vergleich vom EG5.1- und EG6-Medium und Senkung der Vitamin B₁₂-Konzentration

Zahlreiche Versuchsanordnungen, die in den folgenden Kapiteln erörtert werden, sind mit dem empirisch optimierten EG5.1-Medium durchgeführt worden. Zuvor wird hierfür exemplarisch eine Vergleichskultivierung des EG6-Mediums mit dem EG5.1-Medium bei konstanter Schichtdicke (1 cm) mit einem Lichtfluss von 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beim regulären Anfangs-pH-Wert von 3,0 vorgestellt. Ebenfalls wurde das EG5.1-Medium mit deutlich reduzierter Vitamin B₁₂-Konzentration von 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ für *E. gracilis* überprüft. Die erhöhte Konzentration von 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cyanocobalamin wurde zu Beginn der Kultivierungsarbeiten eingesetzt, um das Ausbleichen der Kulturen zu minimieren und ist nun beim EG-Medium nicht mehr notwendig. Da Vitamin B₁₂ essentiell für das Wachstum von *E. gracilis* ist, könnte eine Reduktion die Ergebnisse beeinflussen und wurde deshalb überprüft [Dubash und Rege, 1968]. Die Resultate der Vergleichskultivierungen sind in den folgenden Abbildungen 44 bis 47 dargestellt – beginnend mit dem Verlauf der Biotrockenmassekonzentrationen. Obwohl die Lipide nicht als Zielgröße der Optimierungsversuche dienten, wurden sie ebenfalls untersucht, um eventuelle Veränderungen auszuschließen. Da bei den Versuchen mit unterschiedlich starken Lichtflüssen im folgenden Kapitel 4.6 der achte Tag der Kultivierung als optimaler Zustand der Kultur als prozess-

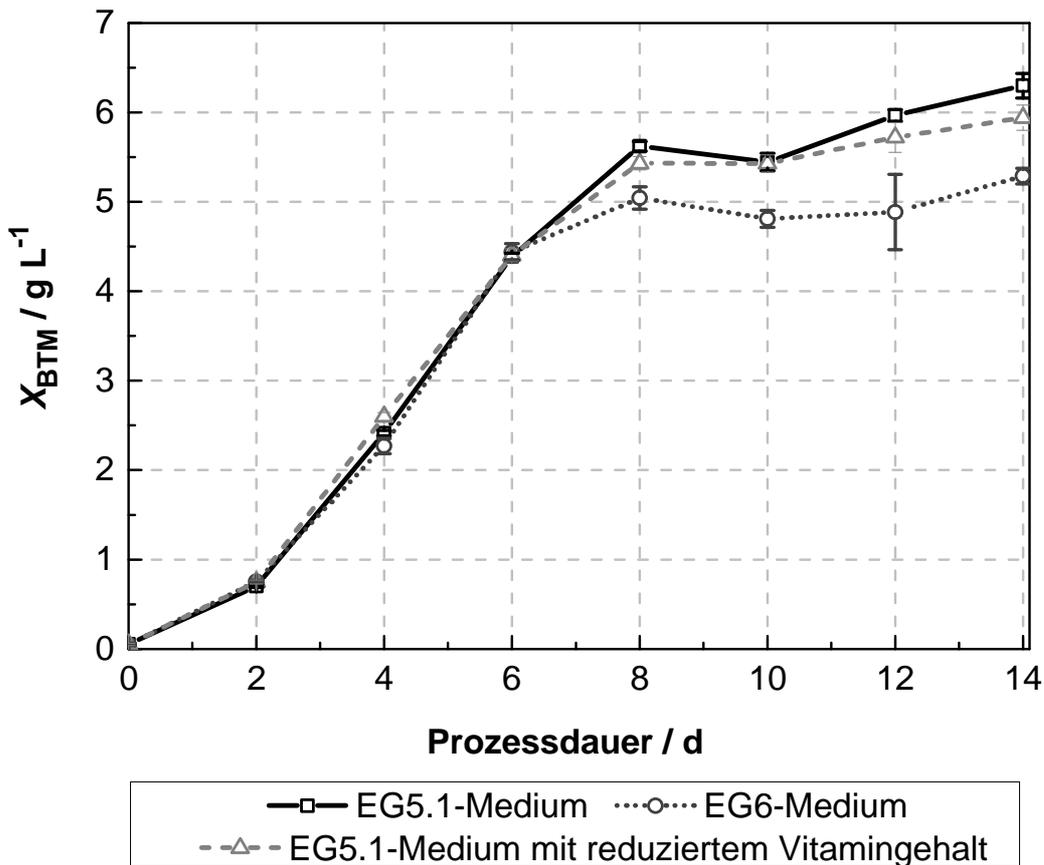


Abbildung 44: Biotrockenmassekonzentrationen von *E. gracilis*-Kulturen im EG5.1-, EG6- und EG5.1-Medium mit reduziertem Vitamingehalt (redVit) bei Anfangs-pH-Werten von 3,0. Die Kultivierungen erfolgten mit konstanten Schichtdicken von 1,0 cm (im Ruhezustand). Die Kompensation der Wasserverdunstung erfolgte alle zwei Tage. Die Kulturen wurden bei 29 °C auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹ und einem Lichtfluss von 700 μmol m⁻² s⁻¹ in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 9.

relevant erachtet wird, werden Ergebnisse hierzu ebenfalls diskutiert. Bei den Verläufen der Biotrockenmassekonzentrationen in Abbildung 46 ist bis zum sechsten Tag ein fast identischer Verlauf der verschiedenen Kulturen zu sehen. Am Tag acht erkennt man einen langsamen Übergang aller Kulturen in die stationäre Phase und einem Unterschied von 0,6 g L⁻¹ zwischen dem EG5.1- und dem EG6-Medium. Somit bewirken die 21 % weniger Einwaage bzw. rund 11 % weniger Stickstoff im EG6-Medium auch 11 % weniger Biotrockenmasse verglichen mit dem EG5.1-Medium und bezogen auf Tag acht. Die reduzierte Vitaminvariante wies während der gesamten Kultivierung nur geringfügig niedrigere volumetrische Konzentrationen als Kulturen im EG5.1-Medium auf. Ob die Reduktion der Gesamteinwaage im EG6-Medium um 21 % und der Verlust von 11 % Biotrockenmasse letztendlich stark zur Wirtschaftlichkeit beitragen, wird im Kapitel 4.15 diskutiert. Werden in Abbildungen 45 die α-Tocopherolkonzentrationen und die entsprechenden Selektivitäten betrachtet, so fällt auf, dass die Entwicklung der Konzentrationen im EG5.1- und EG6-Medium bis zum Tag 8 identisch war. Im weiteren Verlauf stieg die Konzentration im EG6-Medium vergleichsweise langsamer, so dass am Tag 14 im

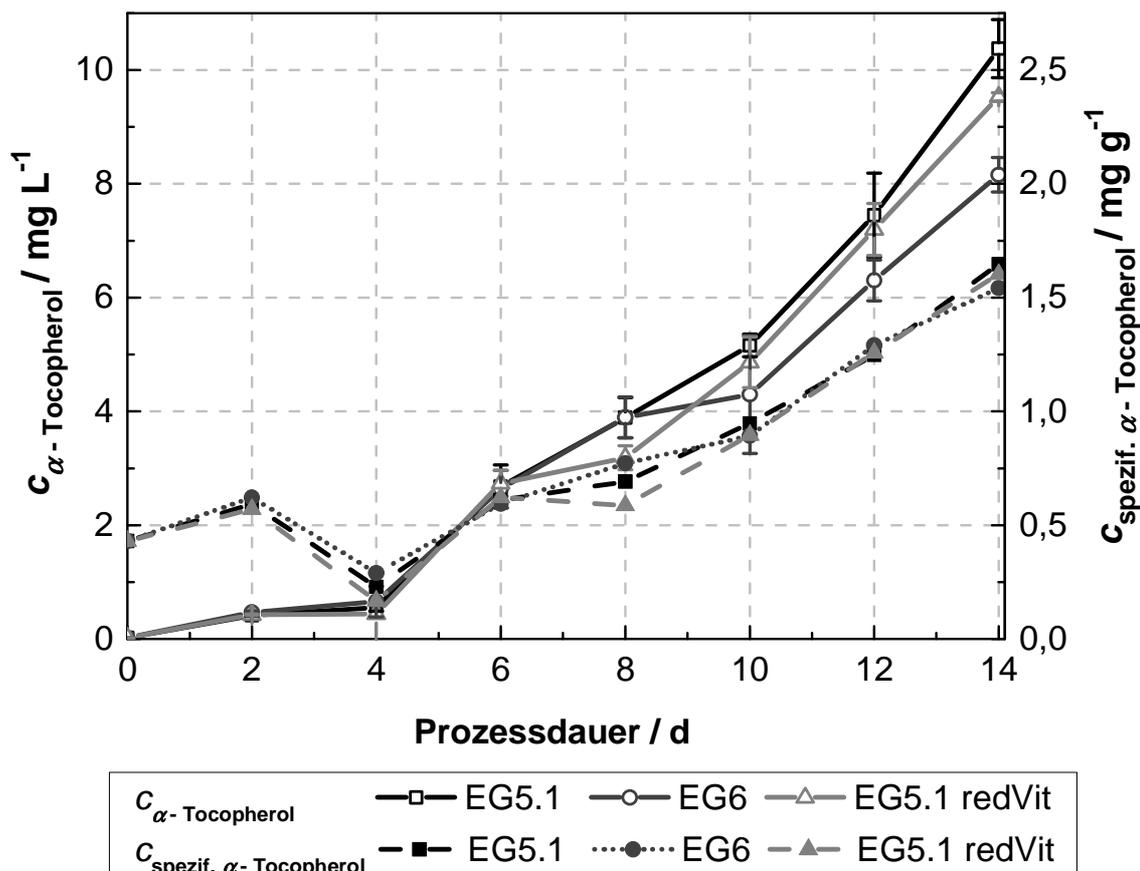


Abbildung 45: (Spezifische) α -Tocopherolkonzentrationen von *E. gracilis*-Kulturen im EG5.1-, EG6- und EG5.1 redVit-Medium mit reduziertem Vitamingehalt und den Anfangs-pH-Werten von 3,0. Die Kultivierungen erfolgten mit konstanten Schichtdicken von 1,0 cm im Ruhezustand. Die Kompensation der Wasserverdunstung erfolgte alle zwei Tage. Die Kulturen wurden bei 29 °C auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹ und einem Lichtfluss von 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 9.

EG6-Medium 8,2 mg L⁻¹ und im EG5.1-Medium 10,3 mg L⁻¹ detektiert wurden. Der Verlauf der Kulturen in der reduzierten Vitaminvariante war ebenfalls geringfügig anders, als im EG5.1-Medium. Die Selektivitäten aller Kulturen waren hierbei sehr ähnlich, wobei am Tag acht im EG6-Medium diese mit 0,8 mg g⁻¹ geringfügig höher war, als im EG5.1-Medium mit 0,7 mg g⁻¹. Wie bereits bei anderen Kultivierungen beobachtet wurde, stiegen die α -Tocopherolselektivitäten bis zum Ende der Kultivierung recht gleichmäßig weiter an und erreichten am letzten Tag 1,6 mg g⁻¹. Bei der Betrachtung der Werte für Paramylon in Abbildung 46 wird ebenfalls deutlich, dass keine Änderung der Selektivitäten vorliegt, wohl aber der absoluten Werte, was wahrscheinlich durch die geringere Stickstoffeinwaage bedingt ist. Am Tag acht lagen bei Kulturen im EG5.1-Medium 2,6 g L⁻¹ als Paramylon vor – in Kulturen mit EG6-Medium waren es 2,3 g L⁻¹. Dabei erfüllt das EG6-Medium die wichtige Bedingung am Tag acht der Kultivierung eine hohe bzw. identische spezifische Paramylonkonzentration zu erreichen. Die spezifischen Konzentrationen bewegen sich hierbei ab Tag acht bei 45 % Gesamtanteil

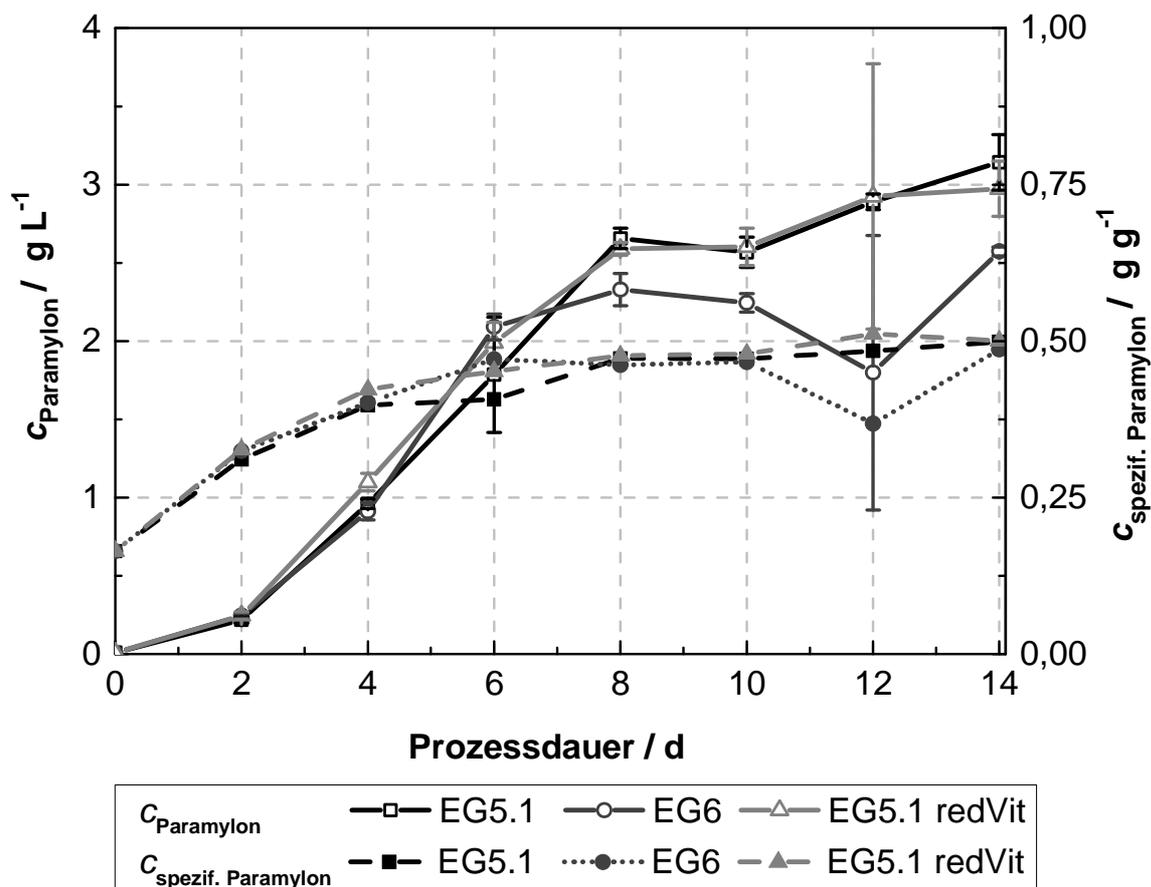


Abbildung 46: (Spezifische) Paramylonkonzentrationen von *E. gracilis*-Kulturen im EG5.1-, EG6- und EG5.1redVit-Medium mit reduziertem Vitamingehalt und den Anfangs-pH-Werten von 3,0. Die Kultivierungen erfolgten mit konstanten Schichtdicken von 1,0 cm im Ruhezustand. Die Kompensation der Wasserverdunstung erfolgte alle zwei Tage. Die Kulturen wurden bei 29 °C auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹ und einem Lichtfluss von 700 μmol m⁻² s⁻¹ in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 9.

zur Biomasse, was im Rahmen dieser Arbeit gute Werte für photoautotrophe Kulturen widerspiegelt bzw. sehr gute Werte im Vergleich zu Kultivierungen im Cramer-Myers-Medium mit etwa 25 %, wie bei Grimm *et al.* [2015] beschrieben, ergibt.

Dieses vorteilhafte Wachstumsverhalten wurde bei den Lipiden der Kulturen ebenfalls beobachtet. Abbildung 47 beschreibt die Lipidakkumulation wie auch die Selektivitäten der Kulturen. Es wird deutlich, dass am Tag acht ein Maximum an Lipiden bei allen Kulturen vorlag, wobei die Kulturen im EG6-Medium bis auf Tag acht größtenteils geringfügig geringere Konzentrationen an Lipiden vorwiesen, als solche im EG5.1-Medium. Die spezifischen Konzentrationen sind mit 23 bis 26 % Lipidanteil am achten Tag wiederum sehr identisch untereinander, wobei diese im weiteren Verlauf bis auf 20 % absinken. Die Kulturen mit reduziertem Vitamin B₁₂-Gehalt zeigten dabei keine Unterschiede und markieren bei einigen Zeitpunkten die höchsten Konzentrationen an Lipiden. Die auffallend hohen Selektivitäten am Tag zwei der Kultivierungen sind bei *Euglena gracilis* bekannt [Rosenberg und Parker, 1963] und werden im Rahmen der Versuche mit unterschiedlich starken Lichtflüssen (Abschnitt 4.6) genauer diskutiert.

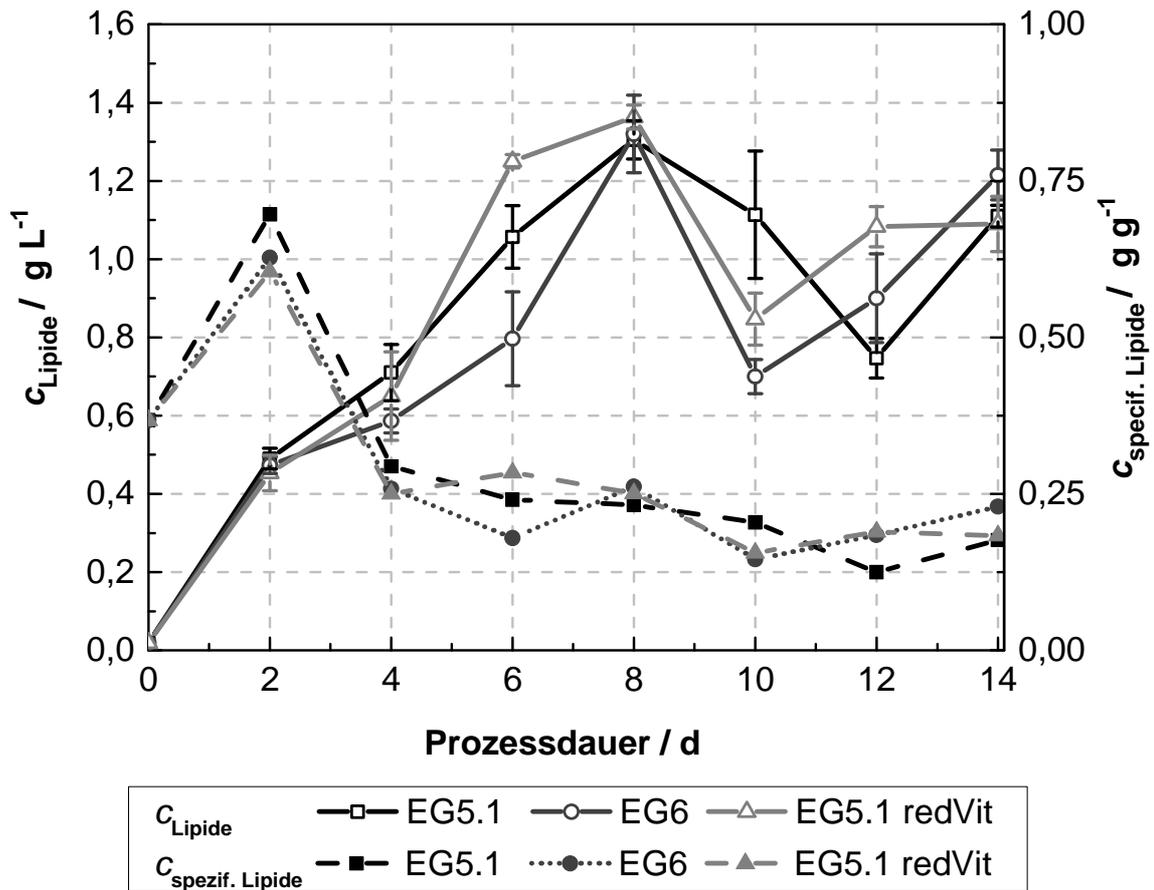


Abbildung 47: (Spezifische) Lipidkonzentrationen von *E. gracilis*-Kulturen im EG5.1-, EG6- und EG5.1redVit-Medium mit reduziertem Vitamingehalt und den Anfangs-pH-Werten von 3,0. Die Kultivierungen erfolgten mit konstanten Schichtdicken von 1,0 cm im Ruhezustand. Die Kompensation der Wasserverdunstung erfolgte alle zwei Tage. Die Kulturen wurden bei 29 °C auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹ und einem Lichtfluss von 700 μmol m⁻² s⁻¹ in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 9.

Es konnte somit bei der vorliegenden mathematischen Optimierung eine weitere Reduktion der Einwaage um 20 % (w/w) beim Medium erzielt werden, wobei sich die Selektivitäten und die volumetrischen Lipidkonzentration der Kulturen im EG6-Medium im Vergleich zu denen im EG5.1-Medium nicht geändert haben. Lediglich die absoluten Konzentrationen von α -Tocopherol und Paramylon haben sich geändert, was aus insgesamt 11 % weniger Biotrockenmasse am achten Kultivierungstag im Vergleich zum EG5.1-Medium resultierte. Auch wenn nur die Stickstoffkonzentration wieder angehoben würde, ergäbe sich immer noch eine Einsparung des Sulfatanteils um rund 42 %. Die Anhebung der Stickstoffkomponente ohne komplementären Salz ist hierbei möglich, da das EG6-Medium ebenfalls als Säure-Base-Variante angesetzt werden kann (vergleiche Kapitel 4.10.1).

4.5 Photoautotrophe Kultivierungen von *E. gracilis* in Schüttelkolben bei verschiedenen Lichtflüssen und konstanten Schichtdicken im EG5.1-Medium

Um den genauen Sachverhalt von *Euglena gracilis* und dem Lichteinfluss in Bezug auf verschiedene Zielgrößen zu charakterisieren, wurden Kultivierungen bei konstanten Schichtdicken des Kulturmediums durchgeführt. Hierbei wurden 50 mL Medium und Kultur je Schüttelkolben eingesetzt um eine Schichtdicke von 1 cm im Ruhezustand zu erhalten. Eine eventuelle Reduktion der Dicke durch Verdunstung während der Kultivierung wurde durch Zugabe von sterilem ddH₂O alle zwei Tage kompensiert. Hierzu wurden die Schüttelkolben zu Beginn des jeweiligen Versuches und dann alle zwei Tage gewogen. Es wurden Kultivierungen bei den Lichtflüssen 130, 300, 500, 700, 860 und 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR über 14 bis 20 Tage durchgeführt, wobei alle zwei Tage Proben entnommen wurden. Da zu allen Probenahmezeitpunkten eine konstante Schichtdicke vorliegen sollte, wurden je Probenahmezeitpunkt drei Schüttelkolben entnommen und auf die im Folgenden gezeigten Parameter mit mehreren technischen Replikaten untersucht. Die Kultivierungsreihen wurden durch Wiederholung unter gleichen Bedingungen verifiziert.

Zahlreiche Kultivierungen aus der Fachliteratur können letztendlich nur bedingt zum Vergleich herangezogen werden, da entweder die Kultivierungsbedingungen nicht genau beschrieben sind oder aber die Ergebnisse sich auf die Zellzahl beziehen [Jones und Cook, 1978; Calvayrac *et al.*, 1980; Barsanti *et al.*, 2001; Kitaya *et al.*, 2005]. Hierbei ist zu erwähnen, dass sich das Zellvolumen je nach Wachstumsbedingungen oder Stadium der Kultur stark ändern kann, was auch bereits publiziert wurde [Schwarzthans und Cholewa *et al.*, 2015]. Eine Korrelation der Zellzahl zur Biotrockenmassekonzentration wird damit schwierig.

4.5.1 Biotrockenmassekonzentration

Die Biotrockenmassekonzentrationen zu Beginn jeder Kultivierung wurden aus je 250 mL Kultur bestimmt, um eine ausreichende Menge an Biomasse zu erhalten. Es wurde eine initiale optische Dichte bei 540 nm von 0,1 gewählt. Die Biotrockenmassekonzentrationen ergaben bei allen Kultivierungsreihen zu Beginn Werte zwischen 0,053 und 0,079 g L⁻¹. In Abbildung 48 wird deutlich, dass die Kulturen bei verschieden starken Lichtflüssen bereits in den ersten zwei Tagen unterschiedliche spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten aufwiesen. Am Tag zwei wird deutlich, dass die Kultivierungsreihen mit schwacher Illumination bei 130 und 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ die geringsten spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten aufwiesen, während die übrigen Kultivierungsreihen eine maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit

von $0,97 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$ bis Tag sechs vorwiesen, wobei die Kulturreihe bei $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dieses μ_{max} bis Tag acht aufrecht erhalten konnte. Buetow beschrieb für heterotroph gewachsene *E. gracilis* SM-L1 eine maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit von $0,79 \text{ d}^{-1}$ bei $28,5 \text{ }^\circ\text{C}$ im Cramer-Myers Medium [Buetow 1962]. Cramer und Myers wiederum konnten im gleichen Medium für *E. gracilis* var. *bacillaris* bei heterotroph gewachsenen Zellen ($0,2 \%$ (w/w) Butyrat und $0,1 \%$ (w/w) L-Glutamat) eine spezifische Wachstumsgeschwindigkeit von $0,42 \text{ d}^{-1}$ beobachten und haben für photoautotroph gewachsene Zellen mit einer 20 W Fluoreszenzlampe als Lichtquelle eine spezifische Wachstumsgeschwindigkeit von $0,43 \text{ d}^{-1}$ ermittelt [Cramer und Myers, 1952]. Hierbei wurden die Zellen in Röhrcchen kultiviert und das Wachstum turbidimetrisch bestimmt. Ergebnisse aus aktuellen Publikationen mit ähnlichen Kultivierungsbedingungen decken sich mit den im eigenen Versuch ermittelten Werten. Kitaya und Kollegen konnten mit *Euglena gracilis* Z im Cramer-Myers Medium bei pH 3,5 und $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und extrem dünnen Schichtdicken durch Kultivierung in hängenden Tröpfchen mit je $3 \mu\text{L}$ Volumen der Kultur spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten bis $1,1 \text{ d}^{-1}$ beobachten [Kitaya *et al.*, 2005]. Bei den Biotrockenmassekonzentration in Abbildung 48 wird deutlich, dass Kulturen bei Lichtflüssen von 300, 1000 und nahezu bei $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ eine Stationärphase mit stagnierender Biomassekonzentration erreicht wurde. Während Kulturen bei $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Lichtfluss ab Tag 8 eine leichte Gelbfärbung aufwiesen, konnte dieses Phänomen bei den schwächer illuminierten Kulturen nicht beobachtet werden. Mikroskopische Untersuchungen zeigten hier bei Kulturen mit $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Lichtfluss ab Tag 8 zunehmend tote Zellen, während sich bei den schwächer illuminierten Kulturen vermehrt eine Zystenbildung formte und die Zellen ihre Überdauerungsform bildeten. Die Kulturen bei 130, 700 und $860 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ sind nach Tag 14 noch nicht in den stationären Zustand der jeweiligen Kultur übergegangen, dieser zeichnet sich jedoch aufgrund der sinkenden spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten bei $0,1$ und $0,2 \text{ d}^{-1}$ ab. Hinsichtlich der Biotrockenmassekonzentrationen erreichen die Kulturen am Tag acht von 130 bis $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ aufsteigend 2,1, 3,4, 5,3, 5,6, 5,7 und $6,7 \text{ g L}^{-1}$. Die Maxima wurden bei $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ am Tag 16 mit $3,4 \text{ g L}^{-1}$ erreicht (Daten nicht gezeigt), während Kulturen bei $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ diese am Tag zehn mit ebenfalls $3,4 \text{ g L}^{-1}$ vorwiesen. Alle übrigen Kulturen wiesen ihr Maximum für die Biotrockenmassekonzentration am Tag 14 mit 5,7, 6,3, 6,9 und $7,9 \text{ g L}^{-1}$ auf (500 bis $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ aufsteigend). Unter absolut identischen Bedingungen jedoch mit $2,3 \text{ cm}$ ruhender Schichtdicke, die sonst durch Verdunstung als auch Probenahme während der Kultivierung sank, wurden mit dem CM-Medium mit erhöhtem Vitamin B₁₂-Gehalt bei $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ $1,4$, $3,1$ und $3,4 \text{ g L}^{-1}$ nach vier, sieben bzw. zehn Tagen erreicht [Grimm *et al.*, 2015]. Andere Vergleiche, wie im Folgenden beschrieben, sind in der Literatur mit höheren Schichtdicken oder anderen Parametern verfügbar. Bei $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mit 100 mL Kultur im 200 mL Schüttelkolben wurden in einem Basalmedium bei pH 3,3 nach etwa 5 Tagen

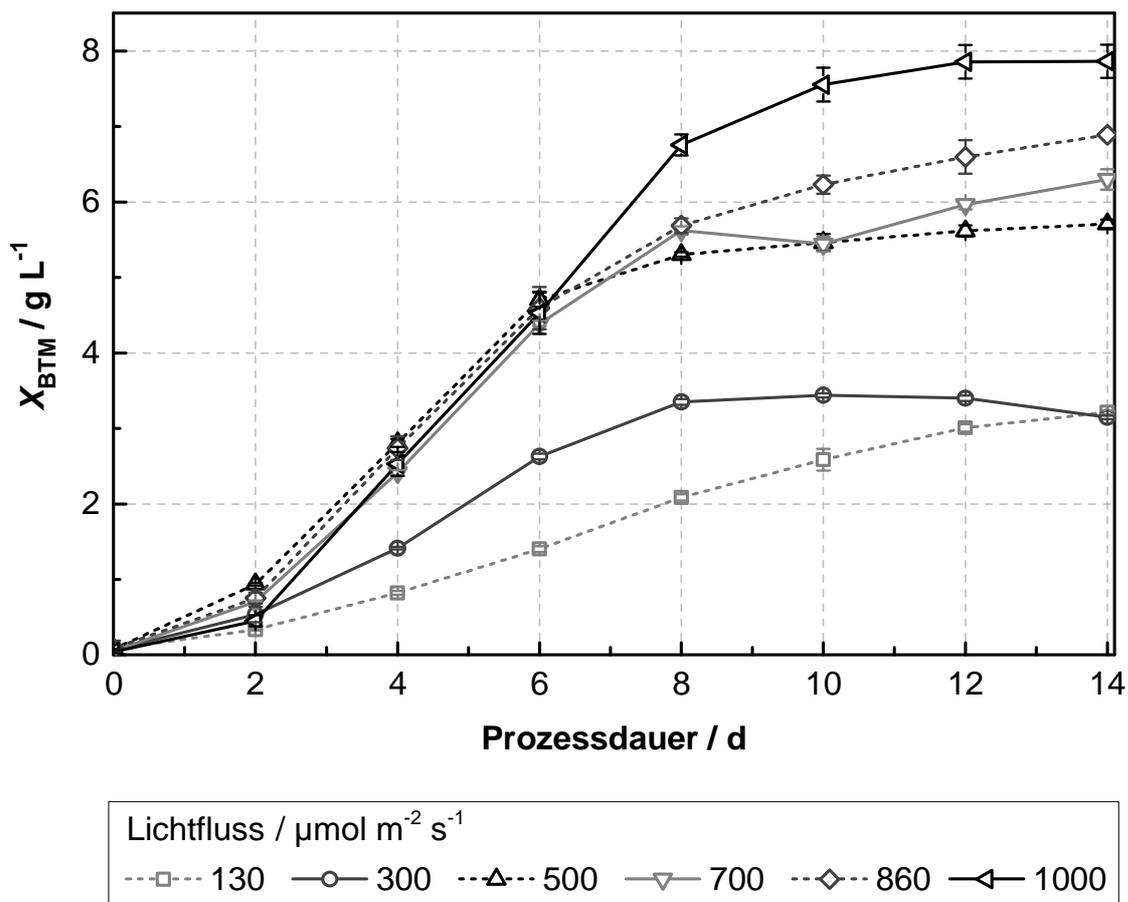


Abbildung 48: Biotrockenmassekonzentrationen von *E. gracilis*-Kulturen in Schüttelkolben mit 1 cm Schichtdicke und verschiedenen Lichtflüssen im EG5.1-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von 3,0. Die Schichtdicken wurden alle zwei Tage mit Wasser korrigiert. Die Kulturen wurden bei 29 °C auf bodenilluminieren LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹ in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 9.

0,3 g L⁻¹ erreicht [Yamane *et al.*, 2001]. Im 1000 L-Maßstab bei recht hohen Schichtdicken wurde mit dem CM-Medium bei pH 3,5 und einem Lichtfluss 960 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nach zehn Tagen und rund 11 % (v/v) CO₂ (aus Rauchgasen) in der Zuluft eine Biotrockenmassekonzentration von 0,9 g L⁻¹ erreicht [Chae *et al.* 2006]. Takeyama *et al.* [1996] beschrieben bei photoautotroph gewachsenen Kulturen im CM-Medium eine Biotrockenmassekonzentration von 1 g L⁻¹ nach zehn Tagen Kultivierung. In Anbetracht der nur bedingt nutzbaren Vergleichswerte wurden bei den hier durchgeführten Versuchen vergleichsweise hohe Biotrockenmassekonzentrationen erreicht.

4.5.2 α -Tocopherol

Bei der Analyse der α -Tocopherol-Ergebnisse wird in Abbildung 49 deutlich, dass die Produktbildung stark abhängig war von der Intensität des Lichtflusses. Umso stärker der Lichtfluss, desto früher begann der Konzentrationsanstieg vom α -Tocopherol. Bei der Kultivierungsreihe

mit $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurde erst ab Tag 16 ein signifikanter Anstieg des Vitamins detektiert, welcher zum Ende 2 mg L^{-1} nicht überschritten hatte (Daten nicht gezeigt). Unter recht schwachen Lichtbedingungen mit 18 W m^{-2} ermittelten Takeyama und Mitwirkende [1996] mit photoautotrophem Cramer-Myers Medium eine α -Tocopherolkonzentration von $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ nach zehn Tagen Satzkultivierung. Unter der Annahme, dass mit dem Wert zur Lichtleistung das

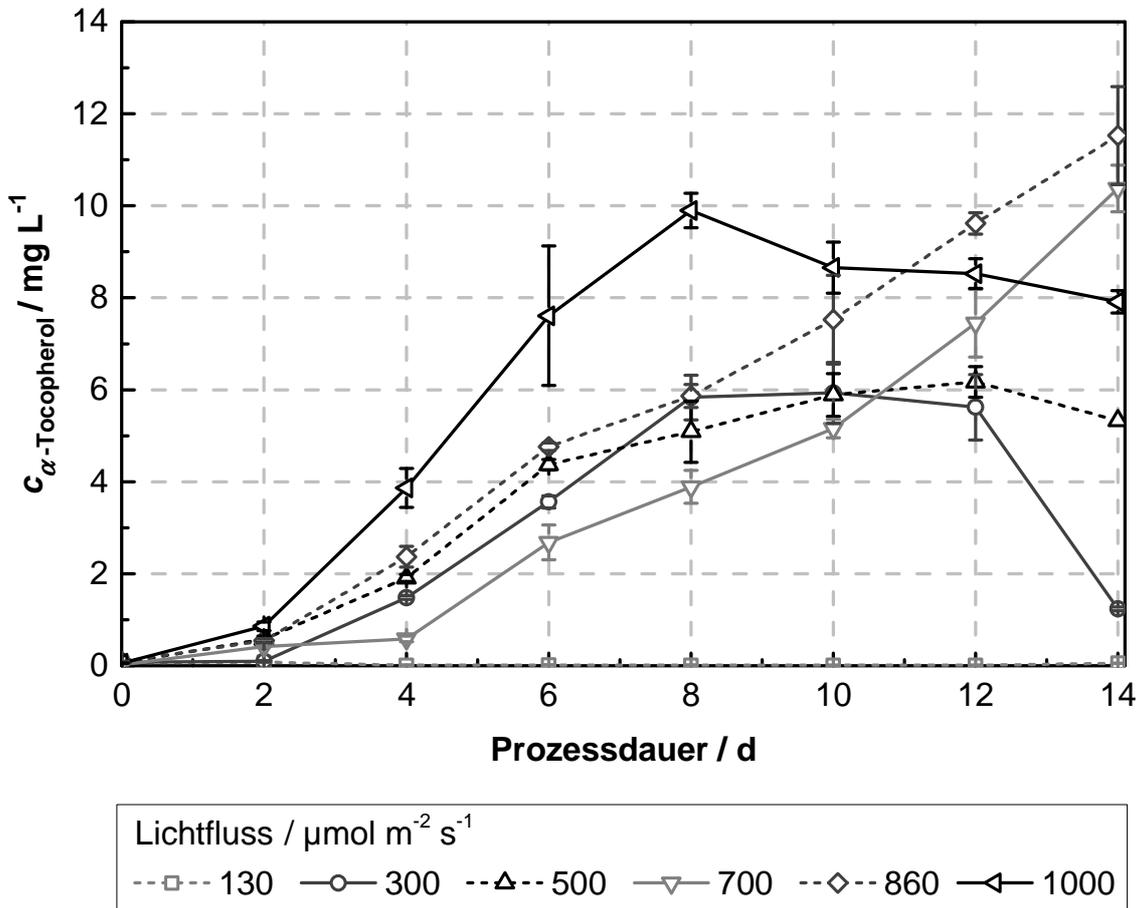


Abbildung 49: α -Tocopherolkonzentrationen von *E. gracilis*-Kulturen in Schüttelkolben mit 1 cm Schichtdicke im Ruhezustand und verschiedenen Lichtflüssen im EG5.1-Medium mit einem AnfangspH-Wert von 3,0. Die Schichtdicken wurden alle zwei Tage mit Wasser korrigiert. Die Kulturen wurden bei $29 \text{ }^\circ\text{C}$ auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min^{-1} in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO_2 und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 6.

photosynthetisch aktive Spektrum gemeint war, ergäbe sich eine Umrechnung der 18 W m^{-2} zu rund $82 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nach McCree [1981]. Zum Vergleich hierzu wird aus den in Abbildung 49 dargestellten Ergebnissen ersichtlich, dass die Kulturen mit dem geringsten Lichtfluss von $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nach zehn Tagen die 3,7 fache Konzentration mit rund $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ erzielten. Die Entwicklung der α -Tocopherolkonzentrationen der Kultivierungsreihen bei 300 und $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wiesen einen recht identischen Verlauf auf und erreichten jeweils maximale Konzentrationen von $5,9$ und $6,2 \text{ mg L}^{-1}$ an den Tagen zehn und zwölf. Bei den Kultivierungsreihen bei starken Lichtflüssen wurden die höchsten α -Tocopherolkonzentrationen detektiert.

Während bei der Kultivierungsreihe bei $860 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bis zum Ende des Versuches die Produktion des Vitamins fast linear von statten ging und am Tag 14 rund $11,5 \text{ mg L}^{-1}$ erreichte, scheint das Maximum bei Kultivierungsreihen bei $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bereits am Tag mit $9,9 \text{ mg L}^{-1}$ erreicht gewesen zu sein. Wiederholungen der Kultivierungsreihen zeigten erneut, dass die Produktion von α -Tocopherol im Bereich von 700 bis $860 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ zu einer höheren Endkonzentration führte, als bei $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, wobei längere Kultivierungszeiten hierzu benötigt wurden. Mit dem CM-Medium wurden bei sonst identischen Bedingungen mit $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nach vier, sieben und zehn Tagen $1,3$, $6,8$ und $8,6 \text{ mg L}^{-1}$ α -Tocopherol ermittelt [Grimm *et al.*, 2015]. Ruggeri und Kollegen [1985] fassten von verschiedenen Autoren Konzentrationen von $0,2$ bis $3,2 \text{ mg L}^{-1}$ zusammen. Bei photoheterotrophen Kultivierungen mit Cramer-Myers Medium und 2% (*v/v*) Ethanol bei $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ wurden mit $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ aber auch von relativ geringen Mengen berichtet [Kusmic *et al.*, 1999].

Werden die hierzu gehörenden spezifischen Konzentrationen in Abbildung 50 betrachtet, beginnen die Kultivierungen mit Werten zwischen $0,8$ und $1,2 \text{ mg g}^{-1}$ α -Tocopherol mit Ausnahme der Reihe bei $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mit $0,4 \text{ mg g}^{-1}$. Im Kultivierungsverlauf schien bei nahezu allen Versuchen die Tendenz vorzuliegen, dass der Gehalt zunächst sank bevor er wieder stieg. Dieser Anstieg wurde bei Kulturen mit Lichtflüssen von 700 und $860 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bis zum Ende der Kultivierungsdauer beobachtet, wo für Tag 14 Werte um $1,7 \text{ mg g}^{-1}$ α -Tocopherol erreicht wurden. Nur bei einem Lichtfluss von $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ erfolgte ein direkter Anstieg des α -Tocopherolgehaltes mit einem Maximum von $1,9 \text{ mg g}^{-1}$ am zweiten Tag und anschließend sinkenden Verlauf über die weitere Kultivierungsdauer. Identische Kultivierungen im CM-Medium mit sinkender Schichtdicke durch Probenahmen und Verdunstung aus den Schüttelkolben wiesen bei $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ $1,0$, $2,1$ und $2,5 \text{ mg g}^{-1}$ α -Tocopherol nach vier, sieben und zehn Tagen auf [Grimm *et al.*, 2015]. Ruggeri *et al.* [1985] beschrieben für photoheterotroph gewachsene Kulturen bei $740 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ im komplexen Medium „*Euglena broth*“ bis zu $7,2 \text{ mg g}^{-1}$ nach 100 Stunden Kultivierungsdauer. Insgesamt lassen sich die Ergebnisse der spezifischen Konzentrationen dahingehend interpretieren, dass ein geringer, aber ausreichender Lichtfluss für eine Produktionssteigerung von α -Tocopherol sorgte, was mit $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bis zur maximalen Biotrockenmassekonzentration gegeben war. Die Lichtflüsse 700 und $860 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ wirkten sich positiv insbesondere bei den späteren Kultivierungszeitpunkten aus und lieferten auch hinsichtlich der Biotrockenmassekonzentration wünschenswerte Ergebnisse. Ein Lichtfluss von $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ initiierte zwar eine hohe Produktbildungsgeschwindigkeit, jedoch schien der Reiz zu hoch, was eventuell die sinkende Selektivität für α -Tocopherol erklärt. Wie bereits erwähnt, wurden mikroskopisch früher tote Zellen beobachtet, als bei geringeren Lichtflüssen.

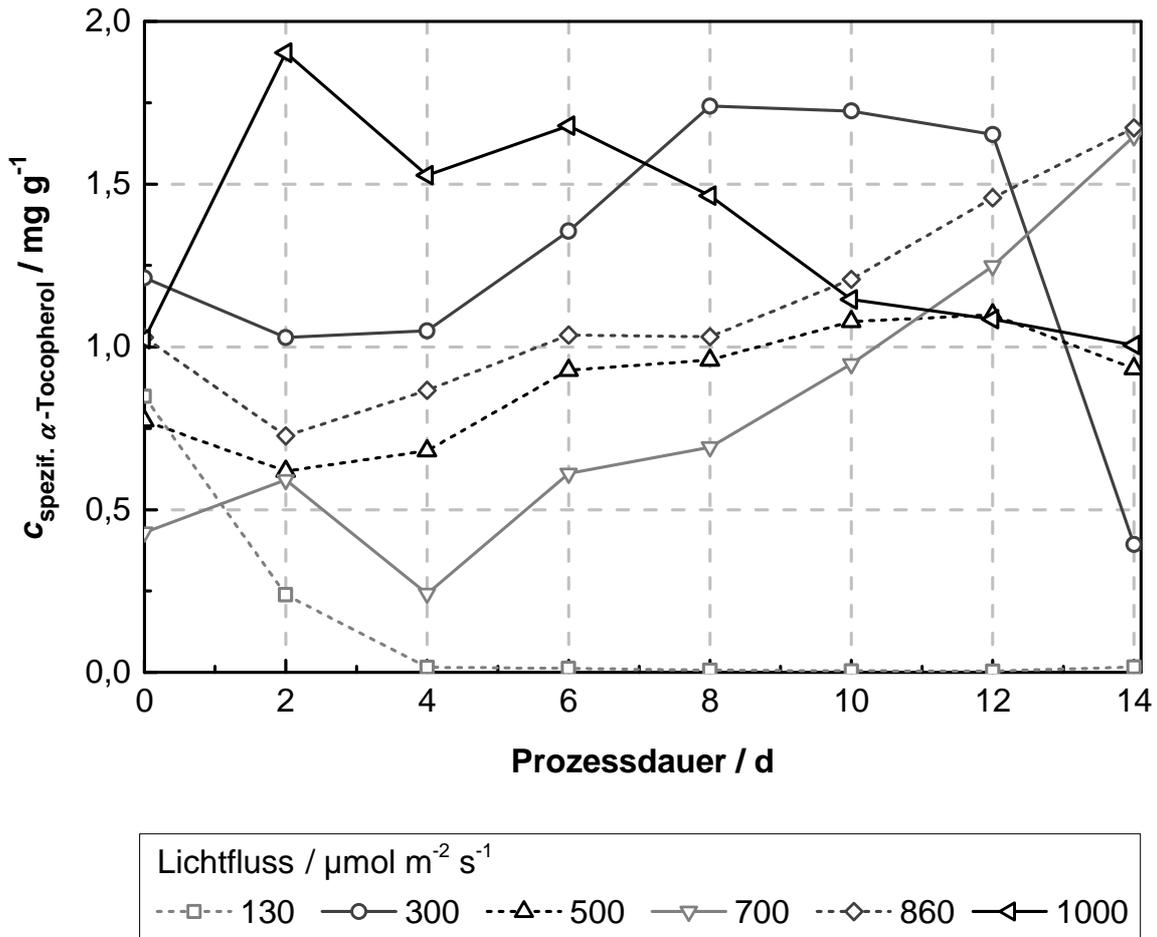


Abbildung 50: Spezifische α -Tocopherolkonzentrationen von *E. gracilis*-Kulturen in Schüttelkolben mit 1 cm Schichtdicke im Ruhezustand und verschiedenen Lichtflüssen im EG5.1-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von pH 3,0. Die Schichtdicken wurden alle zwei Tage mit Wasser korrigiert. Die Kulturen wurden bei 29 °C auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹ in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 6.

4.5.3 Paramylon

Wie aus Abbildung 51 ersichtlich wird, waren die Paramylonkonzentrationen aller Kultivierungsreihen zu Beginn sehr gering mit den Grenzwerten von 0,01 g L⁻¹ bei der Kultivierungsreihe mit 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und 0,06 g L⁻¹ bei der Kultivierungsreihe mit 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Bereits ab dem vierten Tag der Kultivierungen wird deutlich, wie stark sich die unterschiedlichen Lichtflüsse auf die Paramylonbildungsgeschwindigkeit auswirken. Es wird ersichtlich, dass mit zunehmenden Photonenfluss mehr Paramylon durch die Zellen aufgebaut werden konnte, was die Hypothese von Cook bestätigt [1963]. Die Kultivierungsreihe bei 130 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ zeigte bei der Auswertung geringe volumetrische Paramylonkonzentrationen mit einem Maximum am zwölften Tag mit 0,1 g L⁻¹. Bei der Kultivierungsreihe mit 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ war ab Tag acht ein signifikanter Konzentrationsanstieg zu verzeichnen und dauerte bis zum Ende dieser Kultivie-

rungsreihe, wo $1,3 \text{ g L}^{-1}$ vorlagen. Bei der Kultivierungsreihe mit $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ wurden deutlich höhere Konzentrationen bis zu $1,7 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Die höchsten Konzentrationen wurde bei den Kultivierungsreihen mit Lichtflüssen von 700 bis $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mit $3,2$ bis $4,0 \text{ g L}^{-1}$ erzielt. Insbesondere bei den Kultivierungsreihen von 500 bis $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ist ab dem achten Tag beim Eintritt in die Stationärphase ein Einbruch in der Produktionsgeschwindigkeit in Abbildung 51 erkennbar. Danach steigt die Paramylonkonzentration nur noch geringfügig an.

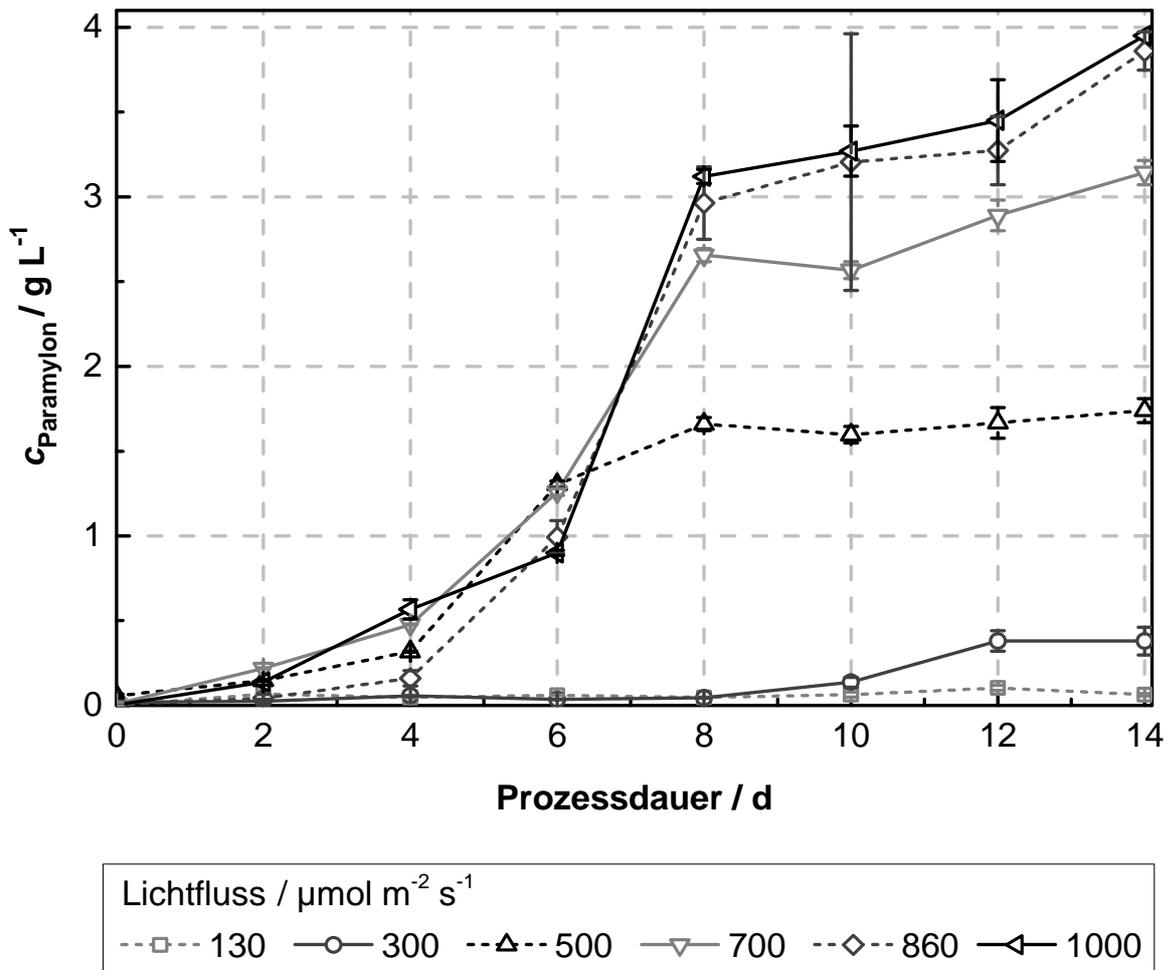


Abbildung 51: Paramylonkonzentrationen von *E. gracilis*-Kulturen in Schüttelkolben mit 1 cm Schichtdicke im Ruhezustand und verschiedenen Lichtflüssen im EG5.1-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von pH 3,0. Die Schichtdicken wurden alle zwei Tage mit Wasser korrigiert. Die Kulturen wurden bei $29 \text{ }^\circ\text{C}$ auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min^{-1} in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO_2 und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 6.

Da insbesondere beim stärksten Lichtfluss zunehmend tote Zellen während der Kultivierung mikroskopisch beobachtet wurden, ist ein Anteil der Paramylonzunahme ab Tag acht diesem Umstand zuzuschreiben. Bei toten Zellen war schnell nur noch die Zellhülle und Paramylongranula zu erkennen, welches den Anteil an der Biotrockenmasse entsprechend erhöhte, während die Biotrockenmassekonzentration wenig zunahm. Ein ähnliches Bild ist bei

der spezifischen Paramylonkonzentration bezogen auf die Biomasse in Abbildung 52 zu erkennen. Die Kultivierungsreihen bei 700, 860 und 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wiesen am Tag acht mit zunehmender Stickstofflimitierung im Vergleich die höchsten Paramylonanteile mit 0,47, 0,52 und 0,4 g g^{-1} auf, wobei den größten Anteil insgesamt die Kultivierungsreihe bei 860 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit 0,56 g g^{-1} am Tag 14 erreichte. Bei der Kultivierungsreihe mit 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ist anzumerken, dass die Zunahme des Paramylonanteils ab den zwölften Tag bedingt war durch die eingeleitete Absterbephase der Zellen. Hierdurch wurde der Paramylonanteil zusätzlich erhöht, da das Paramylon nicht vollständig abgebaut wurde. Bei Kultivierungen mit 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hingegen gingen deutlich mehr Zellen in das Cystenstadium über – hier lagen jedoch generell zu schwache Lichtflüsse vor, wodurch Paramylon nicht intrazellulär akkumulieren konnte. Ebenfalls konnte wiederholt beobachtet werden, dass am Tag zwei der Kultivierungen die Kulturen unabhängig von der Intensität des Lichtflusses einen temporären, deutlichen Anstieg im Paramylonanteil vorwiesen. Zu diesem Zeitpunkt herrschten noch optimale Bedingungen ohne Limitationen in den Schüttelkolben vor. Dass die Lichtquelle weitere Effekte auf die Paramylonproduktion haben kann, ist bekannt [Rosenberg, 1963; Baras und Stone 1968; Pohl, 1973]. Insgesamt wird deutlich, dass höhere Intensitäten des Lichtflusses einen zunehmend positiven Effekt auf die Paramylonakkumulation haben, was als Effekt überschüssiger Energie postuliert wurde [Cook 1963]. Zwar bewirkt die Grünung von heterotrophen *Euglena gracilis* durch Einfluss von Licht zunächst einen Abbau des Paramylons und von Lipiden [Rosenberg und Pecker 1964, Schwartzbach *et al.* 1975], jedoch ist dieser Effekt nicht der Chloroplasten-Bildung zuzuschreiben, da ein Paramylonabbau auch bei plastid- bzw. chloroplastenfreien Zellen zu beobachten war [Horrum und Schwartzbach 1980, Schwartzbach *et al.* 1975]. Durch die Wahl von photoautotrophen Vorkulturen wurde dieser Effekt entsprechend umgangen. Weiterhin ist der Abbildung 52 zu entnehmen, dass insbesondere bei den Kultivierungsreihen mit höheren Lichtflüssen der Paramylonanteil zwischen Tag vier und acht stark ansteigt. Hiermit verbunden ist der Übergang der Kulturen in die Stationärphase, was in Verbindung mit der Stickstofflimitierung steht. Stickstoffmangel, welcher mit Hilfe von Hach-Lange Tests zur Stickstoffbestimmung überprüft wurde, bedingt einen Anstieg des Paramylonanteils, [Edge und Ricketts, 1977; Schiffrin und Chisholm, 1981; Ben-Amotz *et al.*, 1985]. Hinsichtlich der Mengen an Paramylon wurden unter sehr identischen Bedingungen, allerdings im CM-Medium und nicht konstanten Schichtdicken, bei 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nach vier, sieben und zehn Tagen 0,08, 0,23, und 0,23 g g^{-1} an spezifischen Konzentrationen erreicht. Dies entsprach den volumetrischen Konzentrationen von 0,1, 0,7 und 0,8 g L^{-1} [Grimm *et al.*, 2015]. Verglichen mit der in diesem Kapitel präsentierten Kultivierungsreihe bei 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ergaben sich nach vier, acht und zehn Tagen Paramylonkonzentrationen von 0,6, 3,1 und 3,3 g L^{-1} bzw. spezifische Konzentrationen von 0,2, 0,5 und 0,4 g g^{-1} . Da bei Grimm *et al.* [2015] die initiale Schichtdicke bei 2,3 cm lag und je Probenahme 6 mL entnom-

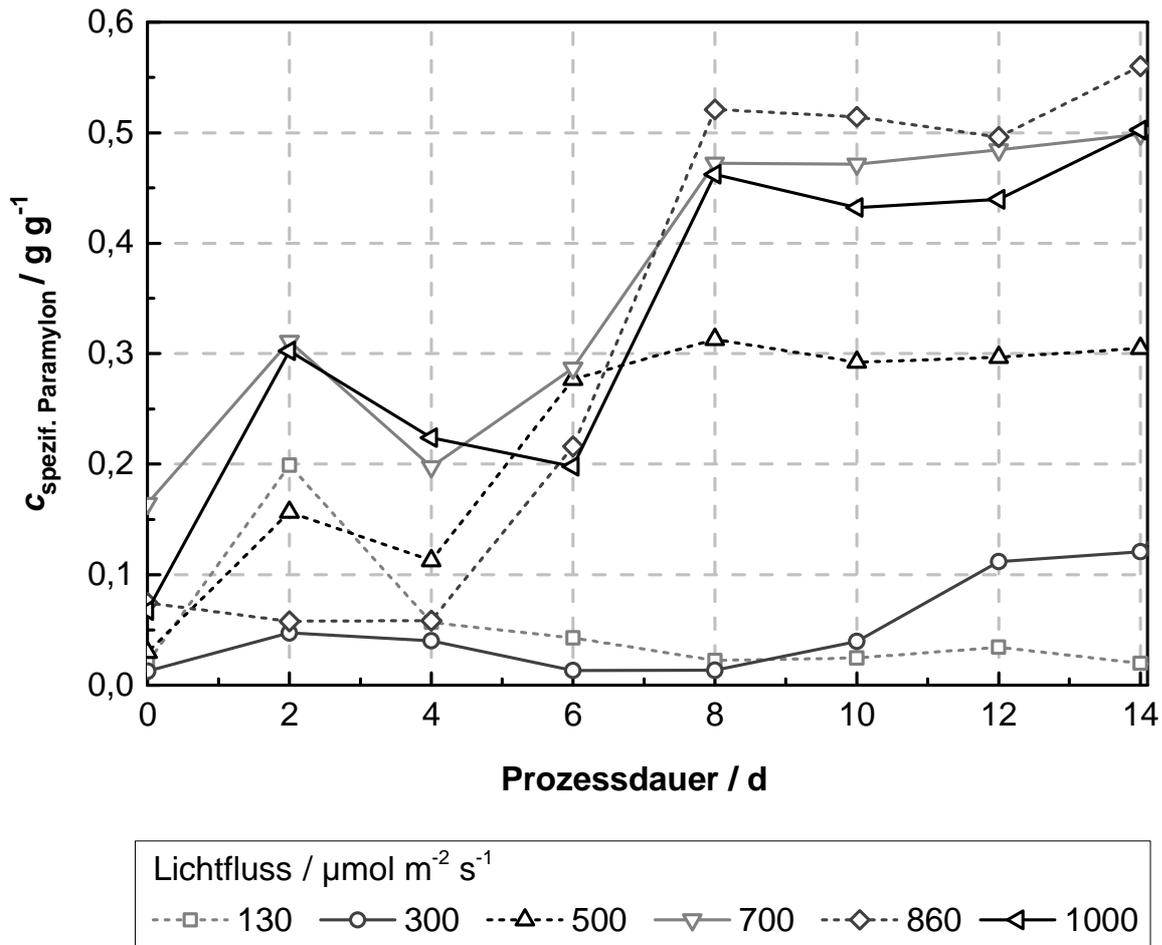


Abbildung 52: Spezifische Paramylonkonzentrationen von *E. gracilis*-Kulturen in Schüttelkolben mit 1 cm Schichtdicke im Ruhezustand und verschiedenen Lichtflüssen im EG5.1-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von pH 3,0. Die Schichtdicken wurden alle zwei Tage mit Wasser korrigiert. Die Kulturen wurden bei 29 °C auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹ in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 6.

men wurden, ohne die Verdunstungseffekte zu kompensieren, sind die Unterschiede der Ergebnisse auf die Schichtdicke und das Medium (mit pH 6,8) zurückzuführen. Die Literatur zu (spezifischen) Paramylonkonzentrationen in speziell photoautotroph gewachsenen *Euglena gracilis* Zellen ist sehr vage und selten in der Fachliteratur zu finden. Generell beschreibt Wolken [1961] den Anteil an Paramylon in photoautotrophen Zellen von *E. gracilis* var. *bacillaris* mit etwa sechsmal geringer, als in heterotrophen Zellen ohne die Kultivierungsbedingungen wie Lichtfluss oder Schichtdicke der Kultur zu erwähnen. Ebenfalls ohne nähere Angaben beziffert Becker [1994] den Paramylonanteil photoautotropher Zellen mit 18 %, was in etwa der Kultivierungsreihe bei 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aus Abbildung 52 entspricht. Leland und Edmunds [1965] fanden bei photoautotrophen *Euglena gracilis* Z., welche im Cramer-Myers-Medium bei 3500 lux kultiviert wurden, einen Anteil von 48 % an Speicherprodukten der Zelle bezogen auf die Biomasse, was den Selektivitäten bei hohen Lichtflüssen entspricht. Mit einer Umrechnung

nach McCree [1981] entsprechen 3500 lux etwa $63 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Da die Anteile der Speicher-
moleküle Paramylon und Wachsester jedoch abhängig sind von der Illumination [Barras und
Stone, 1968; Pohl 1973; Rosenberg 1963], der Temperatur [Kawabata *et al.*, 1982], allen Nähr-
stoffen [Barras und Stone, 1968; Guehler *et al.*, 1964; Rosenberg 1967] der Rheologie [Nagai
et al., 1971] und dem Alter der Kultur [Marcenko 1978], ist ein gleichwertiger Vergleich nicht
möglich.

4.5.4 Lipide und Fettsäuren

Werden die in Abbildung 53 dargestellten Lipidkonzentrationen der verschiedenen Kultivie-
rungsreihen betrachtet, so sind unabhängig von der Stärke des Lichtflusses ähnliche Verläufe
der Lipidkonzentrationen deutlich. Die Maxima der Lipidkonzentration bewegen sich für alle
Kulturen außer der Kultivierungsreihe bei $860 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ am Tag acht in einem relativ engen
Bereich zwischen $0,8$ und $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Die Kultivierungsreihe bei $860 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hatte eine ma-
ximale Lipidkonzentration am Tag 10 mit $1,1 \text{ g L}^{-1}$. Während der Kultivierungen konnte beo-
bachtet werden, dass umso schwächer der Lichtfluss war, desto intensiver die grüne Färbung
der Zellen unter dem Mikroskop und der Kulturen in den Schüttelkolben. Abhängig vom Ener-
giebedarf und Lichtmenge, aber auch Kulturalter kann *Euglena gracilis* die Anzahl der Chloro-
plasten zwischen sechs und etwa 25 regulieren – bei alternden Kulturen kann die Chloroplas-
tenanzahl weiter ansteigen [Cook, 1973]. Somit wäre die Konsequenz eines schwachen Licht-
flusses bei der Kultivierung die Produktion von mehr Chloroplasten, was sich letztendlich auch
in der Lipidkonzentration niederschlägt und einem Produktionsprozess eine gewisse Stabilität
bei Lichtlimitierung hinsichtlich der Produktmengen verleiht. Der Zusammenhang zwischen der
Lichtflussstärke und den Chlorophyll-, Carotinoid- und Lipidanteil wurde bereits von Cook
[1963] beobachtet, wo mit steigender Lichtstärke diese Stoffgruppen anteilig am Zellgewicht
sanken, während der Paramylonanteil anstieg. Diese Wechselwirkung wird deutlicher, wenn
die spezifischen Lipidkonzentrationen betrachtet werden. Abbildung 54 zeigt, dass die Kulti-
vierungsreihen bei schwachen Lichtflüssen mit 130 und $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ einen höheren Anteil
an Lipiden aufwiesen als Kultivierungen bei starken Lichtflüssen mit $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Wei-
terhin ist in Abbildung 54 bei allen Kultivierungsreihen außer bei der Reihe mit z.B.
 $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ein Maximum des Lipidanteils zwischen den Tagen zwei bis vier zu beobach-
ten mit spezifischen Konzentrationen von $0,46$ bis $0,77 \text{ g g}^{-1}$. Dieses Maximum wurde ebenfalls
in Satzkultivierungen in Photobioreaktoren beobachtet. Ein solch drastischer Anstieg des Lip-
idanteils ist wahrscheinlich durch die Fettsäuresynthese bedingt. Es wurde bereits in der Fach-
literatur gezeigt, dass *E. gracilis* nach einer Anpassungsphase unter photoautotrophen Bedin-
gungen im synthetischen Medium zunächst massiv die Synthese der Fettsäuren C16:0 und
C18:0 in den Vordergrund stellt - mit einem Maximum etwa am Tag zwei. Ebenfalls wurde

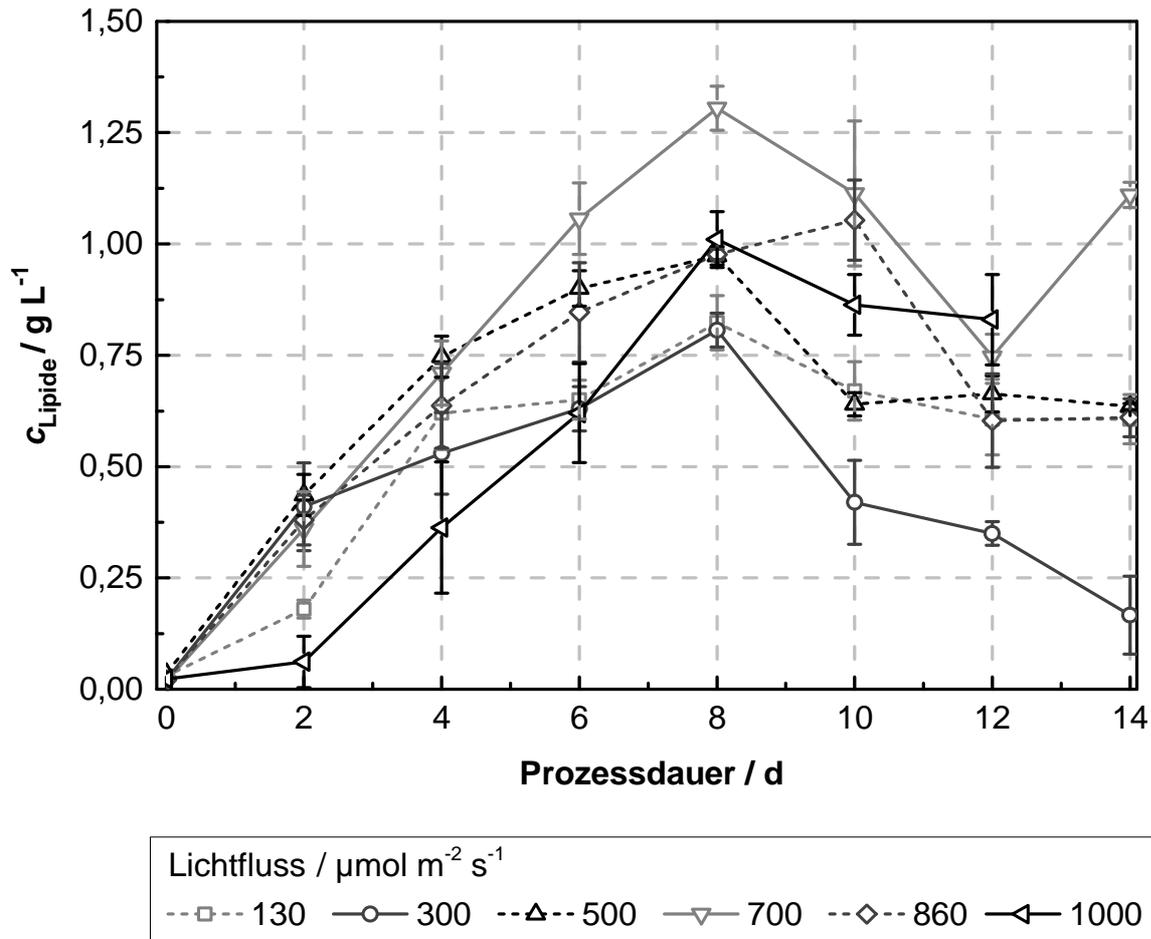


Abbildung 53: Verlauf der Lipidkonzentrationen von *E. gracilis*-Kulturen in Schüttelkolben mit 1 cm Schichtdicke im Ruhezustand und verschiedenen Lichtflüssen im EG5.1-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von pH 3,0. Die Schichtdicken wurden alle zwei Tage mit Wasser korrigiert. Die Kulturen wurden bei 29 °C auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹ in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 6.

berichtet, dass am Tag drei der C16:0 Anteil um rund 50 % und der C18 um 30 % sinkt, wobei mehrfach ungesättigten Fettsäureanteile ab dem zweiten Tag wiederum ansteigen und aus den zuvor synthetisierten C16:0 und C18:0 hergestellt werden [Regnault, 1995; Rosenberg und Parker, 1963]. Nichtsdestotrotz machten die Lipide zusammen mit dem Paramylon bei einigen Kultivierungen rund 95 % der gesamten Biomasse am Tag zwei aus, was kritisch betrachtet werden sollte. Im weiteren Kultivierungsverlauf sanken die spezifischen Lipidkonzentrationen und hatten beim Übergang in die Stationärphase einen Anteil von 15 bis 24 % was den Angaben von Becker [1994] mit 14 bis 20 % für photoautotroph gewachsenen *E. gracilis*-Kulturen entspricht. Die Werte für den Lipidgehalt liegen ebenfalls in dem von Tucci *et. al.* [2010] angegebenen Bereich für den Lipidgehalt von Wildtypstämmen von 10 bis 30 %, sofern die Akkumulation insbesondere der schwach illuminierten Kulturen innerhalb der ersten Tage außer Acht gelassen wird. Allerdings wurden keine näheren Angaben zu den Kultivierungsbedingungen bei Tucci *et al.* genannt. Zum Ende der Kultivierungen der eigenen Versuche zeigte

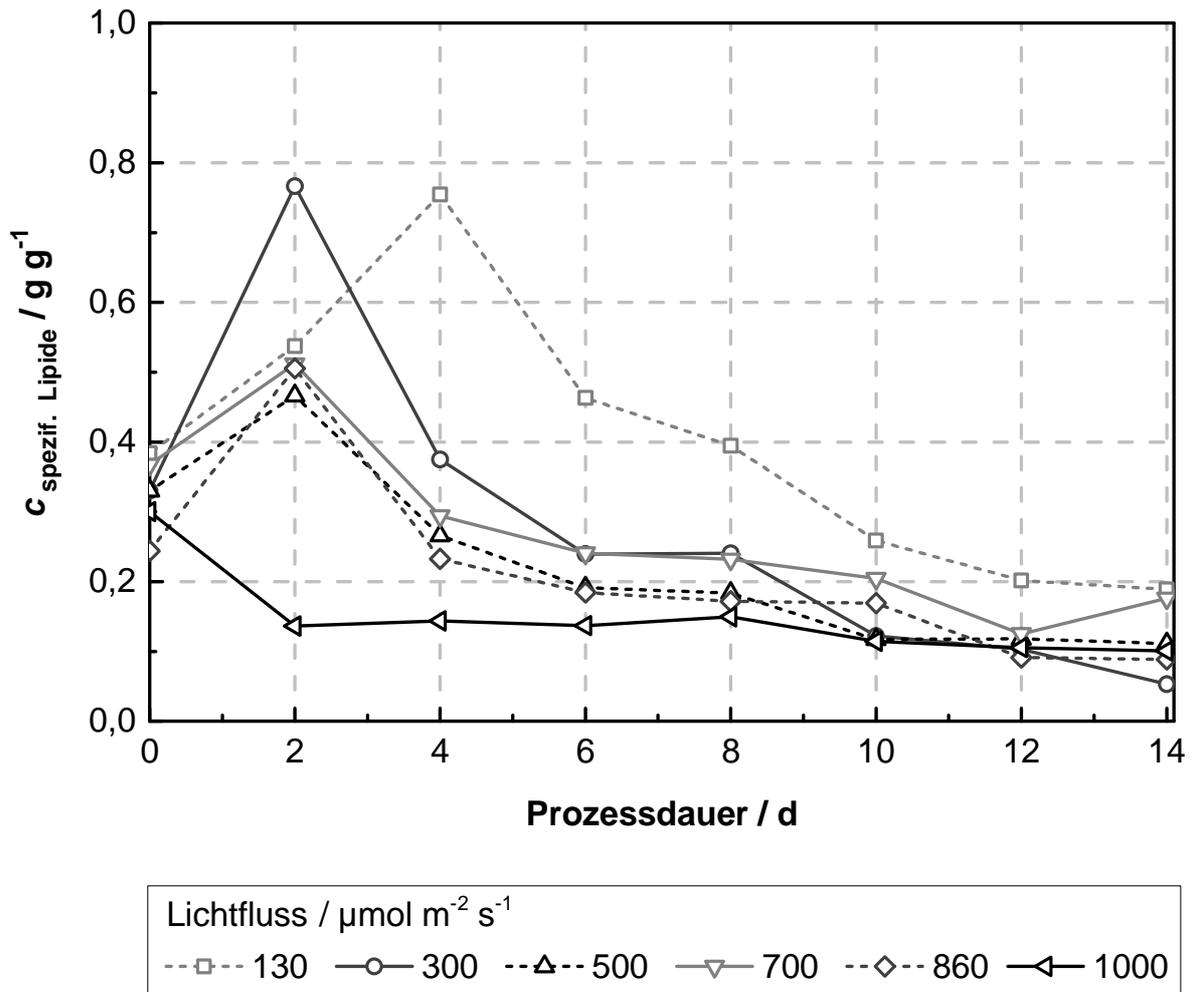


Abbildung 54: Spezifische Lipidkonzentrationen von *E. gracilis*-Kulturen in Schüttelkolben mit 1 cm Schichtdicke im Ruhezustand und verschiedenen Lichtflüssen im EG5.1-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von pH 3,0. Die Schichtdicken wurden alle zwei Tage mit Wasser korrigiert. Die Kulturen wurden bei 29 °C auf bodenilluminieren LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹ in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 6.

sich insbesondere bei Tag zwölf der Kultivierungen ein einheitliches Bild der Lipidgehalte aller Kulturen ausgenommen der Kulturen bei 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$: Diese befanden sich entgegen der anderen Kulturen noch nicht in der Stationär-/Absterbephase. Der höhere Lipidgehalt von Kulturen mit geringerem Lichtfluss erklärt sich durch die Kompensation des Lichtmangels mit der Bildung von mehr Chloroplasten, welche wiederum zum Teil aus Phospholipiden bestehen. Diese Reaktion von *E. gracilis* Z wurde auch von Constantopoulos und Bloch [1967] beschrieben, wo schwach illuminierte photoautotroph kultivierte Zellen bei 120 *foot candelas* (entsprechen etwa 23 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ein Lipidgehalt von 0,367 g g⁻¹ und stärker illuminierte Zellen (610 *foot candelas* entsprechen etwa 117 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) einen Gehalt von 0,218 g g⁻¹ aufwiesen, was im Bereich vieler Messergebnisse in Abbildung 54 liegt [McCree 1981].

Proportional zu den Lipidgehalten sanken auch die Chlorophyllgehalte in den Zellen bei höheren Lichtintensitäten [Constantopoulos und Bloch, 1967]. Es sei nochmals daran erinnert, dass die dargestellten Lipidgehalte in den Abbildungen 53/54 real höher ausgefallen waren. Es

wurde die umweltschonende Lipidextraktion nach Smedes durchgeführt, die im Vergleich zu Lipidextraktionen mit Chloroform nach Bligh und Dyer [1959] rund 20 % weniger Lipide extrahiert [Smedes, 1999].

Für die Betrachtung der Fettsäuren als FAME ist zusätzlich ein Standard aus Fischöl (Menhaden Fish Oil 4-7116 von Supelco, Bellefonte, USA) eingesetzt worden, um die fehlenden FAME aus dem Supelco 37 FAME-Standard zu ergänzen. Die in seltenen Fällen detektierten FAME C20:0 und C22:0 wurden nicht ausgewertet, da diese regulär nicht in *E. gracilis* vorkommen und Hydrierungsprodukte aus den Fettsäuren 20:4, 20:5, 22:5 und 22:6 darstellen [Korn, 1964]. Im Folgenden werden zunächst die Entwicklungen der Fettsäuren mit den Kohlenstoffkettenlängen 12, 14, 16, 18, 20 und 22 bei den Lichtflüssen 130, 700 und 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ näher betrachtet. Diese Spezies stellten den Großteil aller als FAME gemessenen Fettsäuren dar. Anschließend werden die Summen der gesättigten, als auch der ω 3- und ω 6-Fettsäuren bei allen untersuchten Lichtflüssen betrachtet. Sofern von Fettsäuren gesprochen wird, sind immer als FAME gemessenen Fettsäuren gemeint. Die Abbildung 55 zeigt in der linken Diagrammspalte die Entwicklung der C16-Fettsäuren (C16:0, C16:1, C16:2, C16:3n3 und C16:4n3) und in der rechten Diagrammspalte die Entwicklung der C18 Fettsäurekonzentrationen (C18:0, C18:1, C18:2, C18:3n3 und C18:3n6) als FAME. Es wird schnell deutlich, dass bei schwachen Lichtflüssen von 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ die beiden Omega 3-Fettsäuren C16:3n3 und C18:3n3 die höchsten Konzentrationen aufweisen und maximale Werte von 108 bzw. 143 mg L^{-1} am Tag zehn der Kultivierung erreichten. Bei den höheren Lichtflüssen wiesen diese Fettsäuren deutlich geringere Konzentrationen auf. Die Zellen kommen bei geringen Lichtflüssen deutlich schneller in einen lichtlimitierenden Bereich, was bei *E. gracilis* zu einer Erhöhung der Chloroplastenanzahl führt, um die Limitation möglichst zu kompensieren [Cook, 1973]. Dabei werden in den Thylakoiden vermehrt diese beiden Omega3-Fettsäuren eingebaut [Rosenberg 1963; Hugly und Somerville 1992; Mongrand *et al.*, 1998], was die Änderung der Konzentrationen abhängig von der Stärke des Lichtflusses erklärt. Ein Vergleich mit anderen Publikationen zu Fettsäuren in photoauto- und/oder photoheterotroph gewachsenen *E. gracilis* kann nur im Rahmen der relativen Anteile der Fettsäuren getätigt werden, da bis zu dieser Arbeit keine absoluten Werte in der Fachliteratur zu *E. gracilis* vorliegen [Rosenberg 1963; Hulanicka *et al.*, 1964; Korn, 1964; Constantopoulos und Bloch, 1967; Regnault *et al.*, 1995; Tucci *et al.*, 2010]. Ebenfalls wurden bislang in der Regel punktuelle Ergebnisse präsentiert, ohne den gesamten Kultivierungsverlauf zu betrachten. Zudem ist anzumerken, dass bisher veröffentlichte Daten bei geringen Lichtintensitäten durchgeführt wurden. Constantopoulos und Bloch [1967] beschrieben bei steigenden Lichtintensitäten eine prozentuale Zunahme von C16:4n3 und C18:3n3, während alle anderen erfassten Fettsäuren als FAME mit steigenden Lichtintensitäten konstant blieben oder fielen. Wurden die eigenen Ergebnisse in relative Anteile umgerechnet, konnten damit diese Ergebnisse nicht bestätigt wer-

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

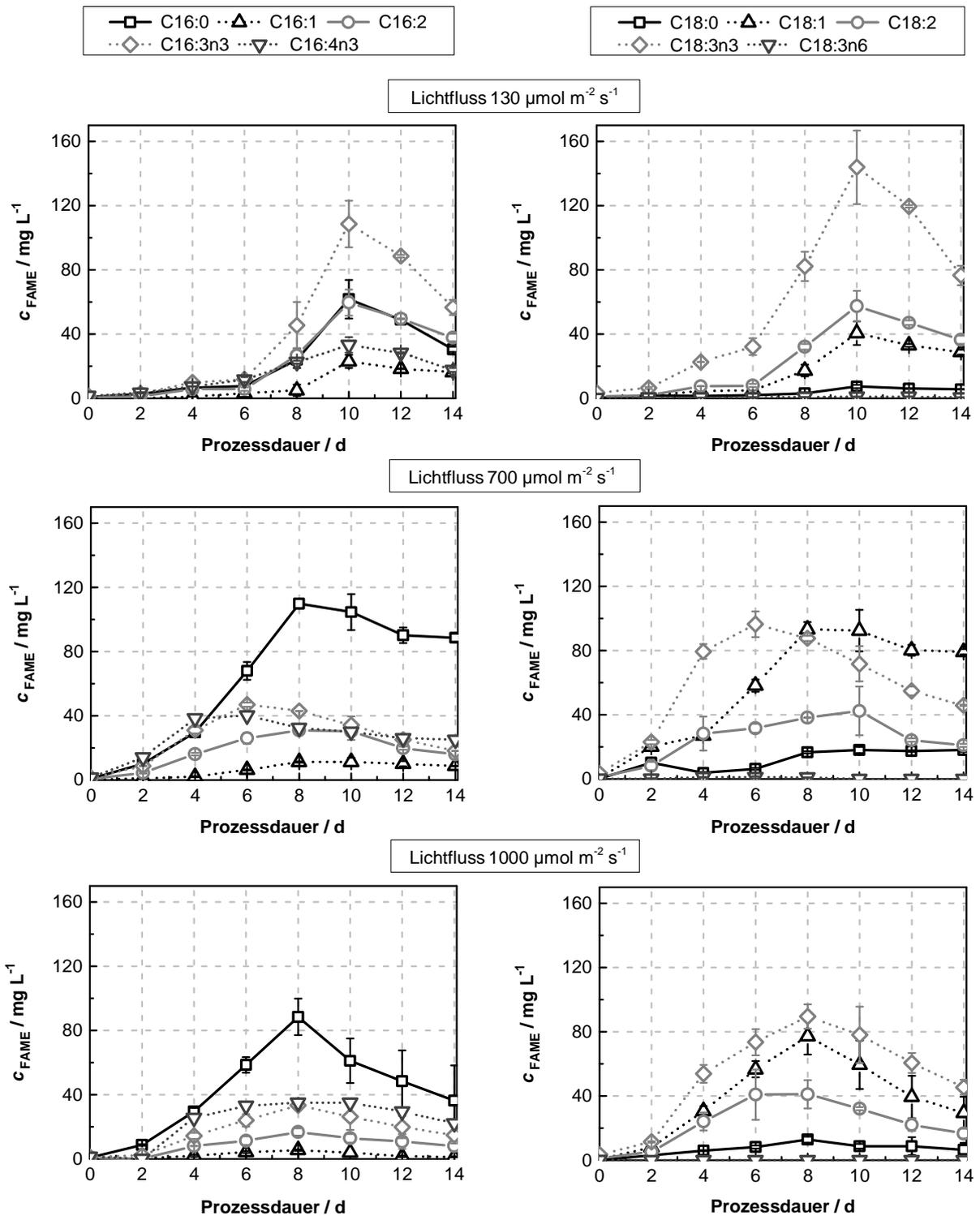


Abbildung 55: Verlauf der Fettsäurekonzentrationen als FAME von *E. gracilis*-Kulturen in Schüttelkolben mit 1 cm Schichtdicke im Ruhezustand und verschiedenen Lichtflüssen im EG5.1-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von pH 3,0. **Links:** alle C16 Spezies. **Rechts:** alle C18 Spezies Die Schichtdicken wurden bei den Kultivierungen alle zwei Tage mit Wasser korrigiert. Die Kulturen wurden bei 29 °C auf bodenilluminieren LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹ in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 6.

den. So bewegte sich der C16:4n3-Anteil bei 130 und 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sehr ähnlich zwischen 11 % zu Beginn und 4 % am Tag 14 der Kultivierung und bei 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zwischen 10 und 7 % im gleichen Zeitraum. Ein Anstieg von C18:3n3 kann ebenfalls nicht bestätigt werden, da eigene Ergebnisse bei allen Lichtstärken einen initialen Anteil von etwa 30 % aufwiesen und im Verlauf der Kultivierungen auf 19 bis 7 % abfielen. Bei Kultivierungen mit Lichtflüssen von 700 und 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dominierten die Fettsäuren C16:0 mit 110 bzw. 88 mg L^{-1} und C18:1 mit 93 bzw. 77 mg L^{-1} jeweils am Tag acht. Diese Ergebnisse und die der anderen Fettsäuren, wie C16:0 oder C18:3n3 umgerechnet in prozentuale Angaben, stimmen mit den meisten Publikationen überein. Hierbei muss beachtet werden, dass sich der relative Anteil der jeweiligen Fettsäuren auf die Anzahl der erfassten Fettsäuren bezieht und der Probenahmezeitpunkt, das Medium, als auch die Lichtintensität und Schichtdicke (wenn angegeben) einbezogen werden müssen [Hulanicka *et al.*, 1964; Korn, 1964; Regnault *et al.*, 1995; Rosenberg 1963]. Es sei erwähnt, dass die Fettsäure C18:1 durch zwei Spezies mit Doppelbindungen an Position 9 oder 11 repräsentiert wird [Korn, 1964], wobei erstere als Ölsäure bekannt ist und stets 85 bis 98 % der C18:1 Fraktion bei den eigenen Versuchen ausmachte.

Werden die Verläufe der Fettsäurekonzentrationen der C20-Familie und die verbleibenden dominant vorkommenden Fettsäuren C12:0, C14:0 und C22:6n3 in Abbildung 56 betrachtet, sticht die Kultivierungsreihe bei 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit höheren Fettsäurekonzentrationen heraus. Wie sich bereits in anderen Kapiteln in Bezug auf die Biosynthese potentieller Hochwertprodukte zeigte, war dies auch hier ein optimaler Bereich für die Lipidproduktion, wenn der achte Tag als Bezugspunkt herangezogen wird. Bei allen drei gezeigten Lichtflüssen sind die Fettsäuren C20:4n6 und 20:5n3 mit den höchsten Konzentrationen vertreten. Sie erreichen bei 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erst am Tag zehn maximale Konzentrationen mit 38 und 34 mg L^{-1} . Bei Kultivierungen mit 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurden mit 49 und 68 mg L^{-1} Maxima am Tag acht erreicht, wobei diese Konzentrationen im Folgenden schnell wieder sanken. Kultivierungen bei 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ demonstrierten bis Tag acht die höchsten Produktbildungsgeschwindigkeiten, welche danach nahezu auf null zurückgingen. Ein Abbau der Fettsäuren, wie bei Lichtflüssen von 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurde nicht beobachtet. Bemerkenswert ist die Akkumulation von C20:5n3, welches auch nach Tag acht bis zum Ende unentwegt fortgeführt wurde. Hier wurde am Tag acht eine Konzentration von 71 mg L^{-1} erreicht und stieg bis Tag 14 auf 104 mg L^{-1} weiter an. Die Fettsäurekonzentration als FAME von C20:4n6 blieb wiederum ab Tag acht in etwa konstant bei 60 mg L^{-1} . Zum Vergleich mit der vorliegenden Fachliteratur wurden die Konzentrationen in prozentuale Anteile umgewandelt. Die Ergebnisse bei 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sind identisch mit vielen Publikationen, während bei den höheren Lichtflüssen nur bis Tag sechs bei 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ oder vier bei 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit anderen Publikationen vergleichbare Werte vorgefunden wurden [Hulanicka *et al.*, 1964; Korn, 1964; Regnault *et al.*, 1995]. So war C20:2 mit durchschnittlich 2 % vertreten und erhöhte sich bei den beiden höheren

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

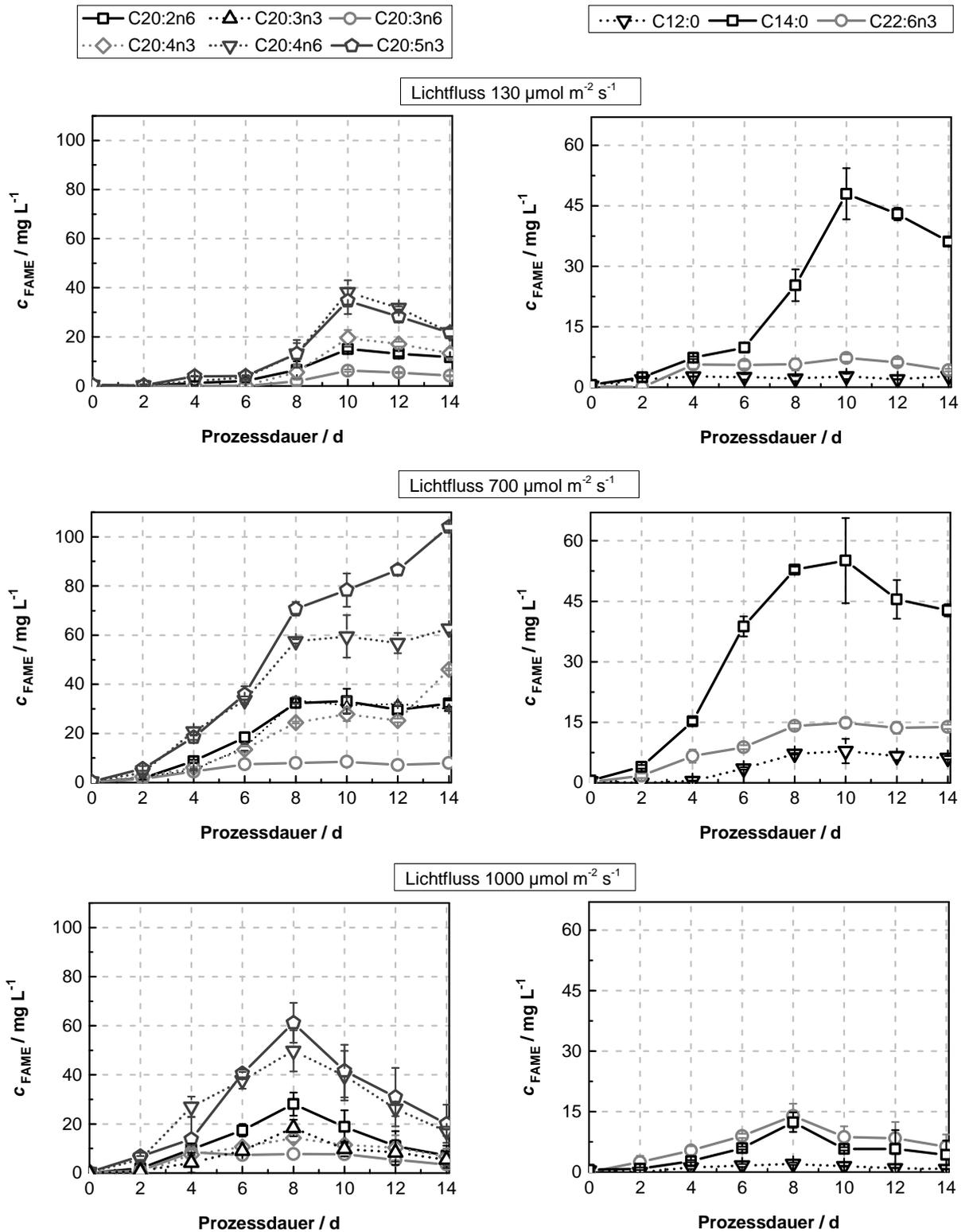


Abbildung 56: Erfasste Fettsäurekonzentrationen als FAME von *E. gracilis*-Kulturen in Schüttelkolben mit 1 cm Schichtdicke im Ruhezustand und verschiedenen Lichtflüssen im EG5.1-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von pH 3,0. **Links:** alle C20 Spezies. **Rechts:** C12:0, C14:0 und C22:6n3. Die Schichtdicken wurden bei den Kultivierungen alle zwei Tage mit Wasser korrigiert. Die Kulturen wurden bei 29 °C auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹ in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 6.

Lichtflüssen bis auf 4 % am Tag acht. Anteile von C20:4n3 und n6 gibt Korn [1967] mit 2 und 3 % an. Die eigenen Ergebnisse wiesen für C20:4n3 bei allen Lichtflüssen 3 bis 5 % vergleichbare Werte aus, während 20:4n6 bei den drei Lichtflüssen am Tag acht 3, 7 und 8 % einen deutlich größeren Anteil, als bei Korn ausmachte. Regnault [1995] gab einen allgemeinen Wert für C20:4 mit 9,6 % an, was sich wiederum mit den eigenen Ergebnissen deckt, wenn die n3- und n6-Form dieser Fettsäure addiert werden. Hulanicka und Mitwirkende [1964] geben C20:4n6 zusammen mit C20:3n3 mit 3,3 % an, was vergleichbare Werte wie auch bei Korn [1967] liefert. Der Anteil an C20:5n3 lag bei den drei Lichtflüssen am Tag acht bei 4, 10 und 10 % bzw. absolut betrachtet bei 13, 71 und 61 mg L⁻¹. Hier stimmen die Ergebnisse von Korn [1967] und Regnault *et al.* [1995] mit 4 bzw. 6 % gut überein. Der höhere Anteil von 10 % kann das Resultat der starken Illumination zwischen 700 und 1000 μmol m⁻² s⁻¹ sein, zumal der Anteil bei 1000 μmol m⁻² s⁻¹ ebenfalls nahezu 10 % ausmacht und die Anteile bei 300 und 500 μmol m⁻² s⁻¹ mit 7 und 8 % zunehmend das Niveau der Illumination bei 130 μmol m⁻² s⁻¹ erreichen. Vergleichswerte für die hohen Anteile bei entsprechend hohen Lichtflüssen sind in der Fachliteratur nicht vorhanden. Die Konzentration an C12:0 war bei den drei Lichtflüssen mit 2, 7 und 2 mg L⁻¹ recht schwach repräsentiert, stellte jedoch mit Anteilen bis 1 % ähnliche Werte, die auch von Rosenberg [1963], Constantopoulos und Bloch [1967] und Hulanicka *et al.* [1964] vorgestellt wurden. Die gleichen Autoren fanden einen C14:0 Anteil von 3 bis 7 %. Dieser stimmt mit den erhobenen Daten überein, wo am Tag acht bei 130 und 700 μmol m⁻² s⁻¹ 7 % und bei 1000 μmol m⁻² s⁻¹ 2 % ermittelt wurden. Das entspricht 25, 53 und 12 mg L⁻¹ in absoluten Konzentrationsangaben. Auch die höheren absoluten Werte von Tag 10 überschritten nicht den relativen Anteil von 7 %. Die als FAME gemessene Fettsäure C22:6n3 wurde bei den Kultivierungen in deutlich geringeren Konzentrationen vorgefunden als die auch für den Menschen wichtige ω3-Fettsäure C20:5n3. Weiterhin zeigte sich für C22:6n3 ein optimaler Produktionsbereich erneut beim Lichtfluss von 700 μmol m⁻² s⁻¹, wo am Tag acht nahezu 15 mg L⁻¹ vorgefunden wurden. Dieser Wert änderte sich in den Folgetagen der Kultivierungen kaum, während bei 1000 μmol m⁻² s⁻¹ am gleichen Tag ein Maximum von 14 mg L⁻¹ vorlag, jedoch bis Tag 14 auf 6 mg L⁻¹ sank. Bei 130 μmol m⁻² s⁻¹ wurden am Tag acht und zehn rund 6 bzw. 7 mg L⁻¹ erreicht, wobei ebenfalls ein sinkende Konzentrationen bis Tag 14 auf rund 4 mg L⁻¹ ermittelt wurden. Relativ betrachtet ergeben sich für alle Lichtflüsse Werte um rund 2 % und stimmen mit Ergebnissen aus der Fachliteratur mit 1 % für C22:6n3 bzw. C24:0, 2 % für C22:6n3 und 3,6 % für C22:6n3 bzw. C22:5n3 gut überein [Hulanicka *et al.*, 1964; Korn, 1964; Regnault *et al.*, 1995]. Das für die Fettsäureausbeute oftmals auftauchende Lichtflussoptimum bei 700 μmol m⁻² s⁻¹ zeigte sich ebenfalls bei der kumulativen Betrachtung der ω3-, ω6-Fettsäuren und deren Verhältnis, als auch den gesättigten Fettsäuren als FAME in Abbildung 57. Bis zum Tag acht wiesen die Kulturen bei den Lichtflüssen von 300 bis 1000 μmol m⁻² s⁻¹ dem Lichtfluss entsprechend zunehmend höhere Konzentrationen an ω3-,

ω 6-Fettsäuren auf, deren Anstieg teilweise sogar darüber hinaus anhielt. Bei den meisten Kulturen war ab Tag acht ein Abfall dieser Konzentrationen ermittelt worden. Die Kulturen bei $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verzeichneten zeitverzögert maximale Konzentrationen der ω 3-, ω 6-Fettsäuren am Tag zehn, wobei im Weiteren ein vergleichsweise schneller Abbau dieser Fettsäuren stark sinkende Konzentrationen bewirkte. Aufsteigend von 130 bis $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurden am Tag acht somit 178 , 197 , 231 , 306 , 288 und 251 mg L^{-1} an ω 3-Fettsäuren (FAME) vorgefunden. Zur gleichen Zeit lagen die ω 6-Fettsäuren in Konzentrationen von 81 , 89 , 137 , 168 , 163 und 143 mg L^{-1} vor – hier waren die Fettsäuren C18:2n6 und C20:4n6 am stärksten präsent, wobei bei $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ generell mehr C16:2n6 als C20:4n6 vorhanden war. Lediglich bei den gesättigten Fettsäuren wurden beim Lichtfluss von 700 bzw. $860 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ höhere Konzentrationen mit 168 bzw. 218 mg L^{-1} erreicht. Global betrachtet ergaben sich am Tag 10 für die ω 6- und gesättigten Fettsäuren geringfügig höhere Konzentrationen, wobei Kulturen bei schwachen Lichtflüssen sowohl bei den der ω 3- als auch den ω 6-Fettsäuren Höchstwerte von 366 und 177 mg L^{-1} erreichten. Dabei waren die Fettsäuren C16:3n3, C18:3n3 und C20:5n3 am meisten präsent, wobei C18:3n3 18 bis zu 30 % der gesamten erfassten Fettsäuren als FAME ausmachte. Generell ist zu erkennen, dass bei den schwachen und sehr starken Lichtflüssen die Fettsäuren nach einer maximalen Konzentration recht schnell wieder degradiert wurden, während bei Lichtflüssen von 500 und 700 und zum Teil auch bei $860 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ die maximalen Konzentrationen für zwei bis vier Tage relativ geringe Schwankungen in den Kulturen aufwiesen. Die Produktbildungsgeschwindigkeiten der einzelnen Fettsäuren zeigten einen lichtflussabhängigen Charakter, wobei zwischen Tag zwei und vier bei Lichtflüssen von 500 und $860 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ die höchsten Produktbildungsgeschwindigkeiten bei den ω 3-, ω 6-Fettsäuren erreicht wurden, während die gesättigten Fettsäuren zwischen Tag vier und sechs bei eben solchen Lichtflüssen die höchsten Produktbildungsgeschwindigkeiten aufwiesen. Wenn ein Vergleich zu anderen Mikroalgenspezies gezogen wird, ist das Bild sehr unterschiedlich, da je nach Spezies besondere Fettsäuren sehr abundant sein können. So kann beispielsweise bei *Cryptocodinium cohnii* eine starke Akkumulation von C22:6n3 mit 5 bis 20 % Anteil an der Biotrockenmassekonzentration beobachtet werden, wenn nährstoffreiche heterotrophe Kultivierungsbedingungen gewählt werden [De Swaaf *et al.*, 1999; Ward und Singh, 2005]. Bei der Betrachtung der ω 3/ ω 6-Fettsäuren-Verhältnisse wurden bei heterotroph gewachsenen *E. gracilis*-Kulturen niedrigere Verhältniswerte unter $0,2$ und bei photoheterotroph gewachsenen Kulturen bereits höhere Verhältnisse von $0,8$ bis $1,8$ je nach Medienwahl vorgefunden, was im Folgenden dargestellt wird [Schwarzhan und Cholewa *et al.*, 2015]. Bei Kultivierungen unter photoautotrophen Bedingungen hat sich dieses Bild weiter zu Gunsten der ω 3-Fettsäuren verbessert, was auch der Abbildung 57 zu entnehmen ist. Insgesamt wurden Werte des ω 3/ ω 6-Fettsäuren-Verhältnisses zwischen $1,6$ und $3,7$ ermittelt, wobei der Durchschnitt aller Kulturen über alle Zeitpunkte bei $2,2$ lag. Am Tag acht erreichten die Kultu-

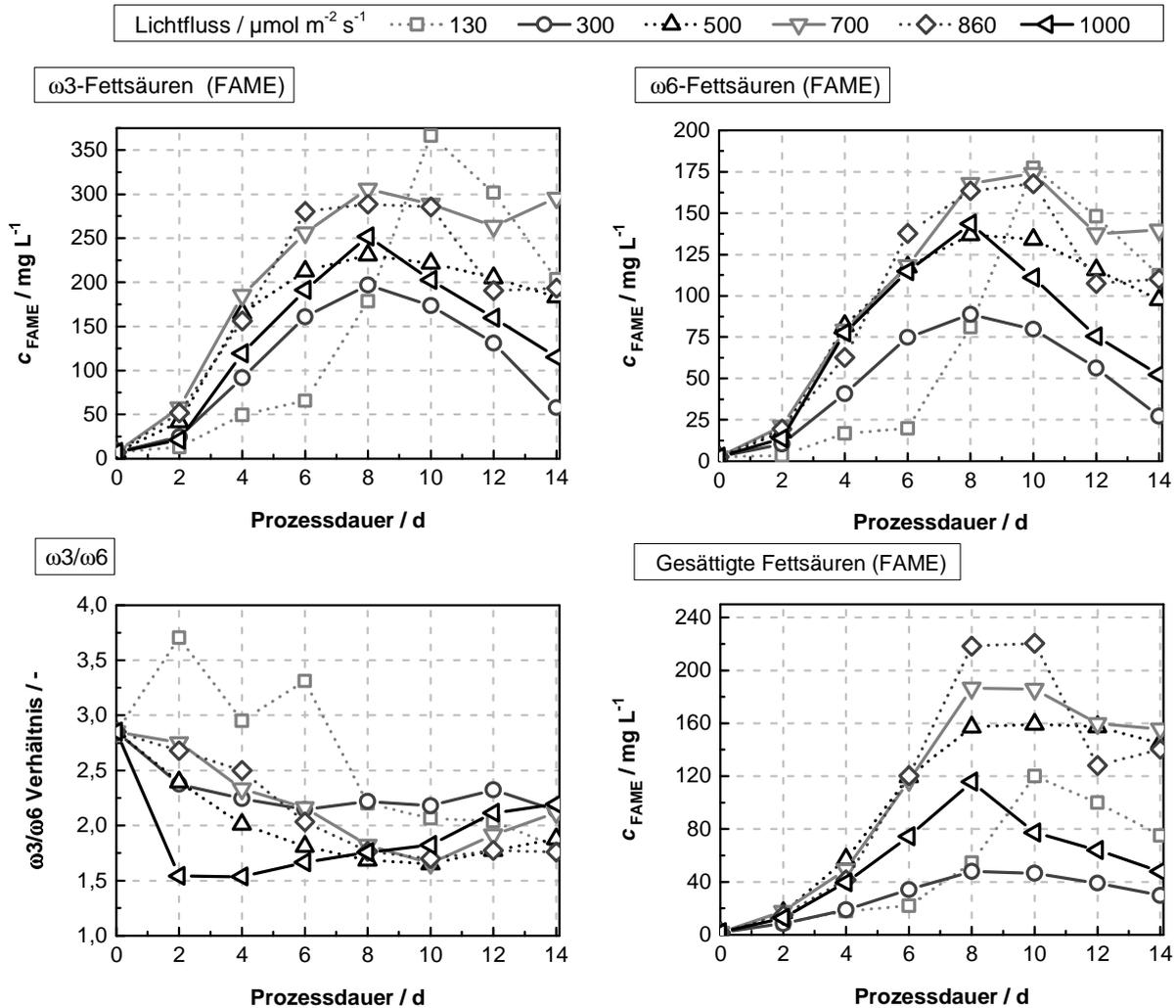


Abbildung 57: Erfasste Fettsäurekonzentrationen als FAME von *E. gracilis*-Kulturen in Schüttelkolben mit 1 cm Schichtdicke im Ruhezustand und verschiedenen Lichtflüssen im EG5.1-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von pH 3,0. Entsprechend beschriftet sind die zeitlichen Verläufe der ω3-, ω6- und gesättigten Fettsäuren als FAME und dem Verhältnis ω3/ω6. Die Schichtdicken wurden bei den Kultivierungen alle zwei Tage mit Wasser korrigiert. Die Kulturen wurden bei 29 °C auf bodenilluminieren LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹ in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 6.

ren bei 130 und 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ähnliche Werte mit 2,2, während die übrigen Kulturen (aufsteigend) ebenfalls fast identische Werte von 1,7, 1,8, 1,8 und 1,8 erzielten. Damit weist *E. gracilis* ω3/ω6-Fettsäuren-Verhältnisse auf, die sich im Vergleich zu jenen aus anderen Mikroalgen spezie im Mittelfeld befinden, womit sich das Fettsäuregemisch von *E. gracilis* für die Nahrungsmittelindustrie gut eignen würde. Hier gibt es Mikroalgen die ein Verhältnis von nahezu 1 aufweisen wie *Schizochytrium aggregatum*. Es gibt auch Isolate (ATCC20892) mit 80 % ω3-Fettsäureanteil an allen Fettsäuren, wobei diese Werte in der Regel unter heterotrophen Bedingungen bei verschiedenen Spezie erreicht wurden [Barclay *et al.*, 1994; Ward und Singh, 2005]. Ein zu hoher Anteil von ω6-Fettsäuren in Lebensmitteln kann sich negativ auf die menschliche Gesundheit auswirken (Simopoulos, 2002). Aus dieser Perspektive sind Lipidgemische mit hohem ω3-Anteil, wie die hier präsentierten, von großem Interesse für die

Nahrungsmittelindustrie. So könnten sie beispielsweise dazu genutzt werden in Lebensmitteln mit hohem ω 6-Anteil diesen auf ein niedrigeres Niveau zu senken und gleichzeitig wertvolle ω 3-Fettsäuren hinzufügen.

4.6 Partielle Charakterisierung von photoheterotroph und heterotroph gewachsenen *E. gracilis*-Kulturen

Für ein Bioraffineriekonzept wäre die Nutzung von Abwässern oder industriellen Prozesswässern denkbar. Je nach Quelle können diese unterschiedliche Nährstoffgehalte aufweisen, wobei primär die Kohlenstoff- und Stickstoffquelle von Interesse ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deutlich, dass *E. gracilis* Z ein Wachstum auf vielen Substraten aufwies. Ein gutes Wachstum von *Euglena* mit Kartoffelbruchwasser zur Produktion von Paramylon [Šantek *et al.*, 2010; 2012] oder Lipiden mit anthropogenem Abwasser wurde bereits demonstriert [Mahapatra *et al.*, 2013]. Ein großes Problem liegt jedoch vor, wenn die Qualität dieser Substrate sehr schwankt. Eine ständige Prüfung der Qualitäten für einen optimalen Betrieb würde die Betriebskosten bzw. Laborkosten für ein solches Bioraffineriekonzept erhöhen. Dies kann ein K.O.-Kriterium sein, zumal die Labor-, insbesondere Personalkosten, derzeit einen der größten Posten bei kleinen und mittleren Anlagen ausmachen können [Norsker *et al.*, 2011].

Da seitens der Fachliteratur nur wenig über die absoluten Konzentrationen der einzelnen Fettsäuren in photoheterotroph und heterotroph gewachsenen *E. gracilis*-Kulturen bekannt ist, wurden die Zusammenhänge hierzu näher betrachtet. Die Produkte α -Tocopherol und Paramylon sind für photoheterotrophe und heterotrophe Kultivierungen gut in absoluten Konzentrationen dokumentiert [Šantek *et al.*, 2009; 2010; 2012; Grimm *et al.*, 2015]. In dieser Arbeit wurde insbesondere der Einfluss des Verhältnisses von Kohlenstoff zu Stickstoff untersucht. Verwendet wurde hierzu ein mit wenigen Komponenten zusammengesetztes Medium auf Proteosepepton-Basis mit Glucose bei pH 8,0. Proteosepepton kann ebenfalls aus Abfällen/Nebenprodukten gewonnen werden. Generell wird die bisherige kommerzielle Verwendung von Schlachtabfällen in Form von Fleisch- oder Knochenmehl beispielsweise für NP-Dünger als zu verschwenderisch diskutiert. Proteosepepton kann in großem Maßstab aus Schlachtabfällen gewonnen werden. Dabei fallen jährlich in Deutschland mehrere Millionen Tonnen Schlachtabfälle mit dem unbedenklichen Status K2 und K3 an [Umweltbundesamt, 2004]. Diese Nische hat beispielsweise die Firma Animox (Animox GmbH, Berlin, BRD) genutzt und bietet hydrothermal aufgeschlossene Hydrolysate aus Schlachtabfällen im Tonnen-Maßstab an. Es sei angemerkt, dass die in den folgend beschriebenen Kultivierungen eingesetzten Glucose x H₂O-Konzentrationen von 5,5, 11,0 und 22,0 g L⁻¹ den reinen Glucose-Konzentrationen ohne Massenanteil des Hydrates von 5,0, 10,0 und 20,0 g L⁻¹ entsprechen.

4.6.1 Photoheterotroph und heterotroph gewonnene Biomasse und Lipide

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus Kultivierungen von *E. gracilis* im Proteosepepton-(PP)-Medium dargestellt, wobei beim Medium sowohl die Stickstoffquelle (1 bzw. 2 g L⁻¹ Proteosepepton) als auch die Kohlenstoffquelle (5,5, 11 und 22 g L⁻¹ Glucose × H₂O) variiert wurden. Für jeden Messpunkt wurden stets drei biologische Replikate für die Auswertungen verwendet mit jeweils zwei oder drei technischen Replikaten. Die verwendeten Vorkulturen wurden 4-6 Tage in Proteosepepton-Medium mit 1,0 bzw. 2,0 g L⁻¹ und 11,0 g L⁻¹ Glucose × H₂O photoheterotroph bzw. heterotroph kultiviert. In der folgenden Abbildung 58 sind die Biotrockenmassekonzentrationen, Lipidkonzentrationen und Lipidselektivitäten der photoheterotrophen Kultivierungen mit verschiedenen Medienvariationen gegen die Prozessdauer dargestellt. Tabelle 12 listet zur Verdeutlichung die hierzu entsprechenden Maximalwerte der in Abbildung 58 wiedergegebenen Kultivierungsverläufe. Die spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten ergeben sich aus den Mittelwerten der jeweiligen exponentiellen Phasen. Hierbei ist zu beachten, dass für die maximale Lipidselektivität Werte vom Tag zwei aller Kultivierungen vernachlässigt wurden, da der temporäre Anstieg nicht repräsentativ für den gesamten Verlauf gewesen ist. Dieses Phänomen wurde bereits im vorigen Kapitel diskutiert. Die angegebenen Werte der maximalen Wachstumsgeschwindigkeiten sind aufgrund der großen Abstände zwischen den Probenahmen nur bedingt aussagekräftig hinsichtlich der wahren maximalen Wachstumsgeschwindigkeiten unter diesen Bedingungen.

Generell ist zunächst der Abbildung 58 zu entnehmen, dass die steigende Konzentration der Kohlenstoffquelle eine höhere Biotrockenmassekonzentration bewirkt, was bei höherem Proteosepeptonkonzentrationen noch deutlicher wird. Im Schnitt wiesen die Kulturen mit der Verdopplung der Kohlenstoffquelle eine Erhöhung der Biotrockenmassekonzentration um 60 % (w/w) mit einhergehender leichter Steigerung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit auf. Insbesondere bei Kulturen mit 2 g L⁻¹ Proteosepepton wurde eine Erhöhung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit um 0,1 d⁻¹ verglichen mit den jeweiligen Kulturen bei 1 g L⁻¹ Proteosepepton beobachtet. Dies wird durch den höheren Aminosäure- bzw. Stickstoffgehalt bedingt, zumal im Proteosepepton 87,9 % Aminosäuren und 12,6 % Gesamtstickstoff zur Verfügung stehen [Conda Laboratorios, 2013; Oda *et al.*, 1982]. Ab dem vierten Tag sank die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit bei allen Kombinationen. In anderen Arbeiten bei ähnlich hohen Lichtflüssen konnten im Vergleich spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten von 0,96 d⁻¹ beobachtet werden, wobei hier mit photoautotrophen Cramer-Myers-Medium gearbeitet wurde [Chae *et al.*, 2006]. Im Allgemeinen wurden bei den photoheterotrophen Kultivierungen geringe Biotrockenmassekonzentrationen erreicht, wenn diese mit der Fachliteratur verglichen werden. Tani und Tsumura [1989] erreichten mit 20 g L⁻¹ Glucose und 12 g L⁻¹ Pepton im Basalmedium nach zehn Tagen eine Biotrockenmassekonzentration von rund

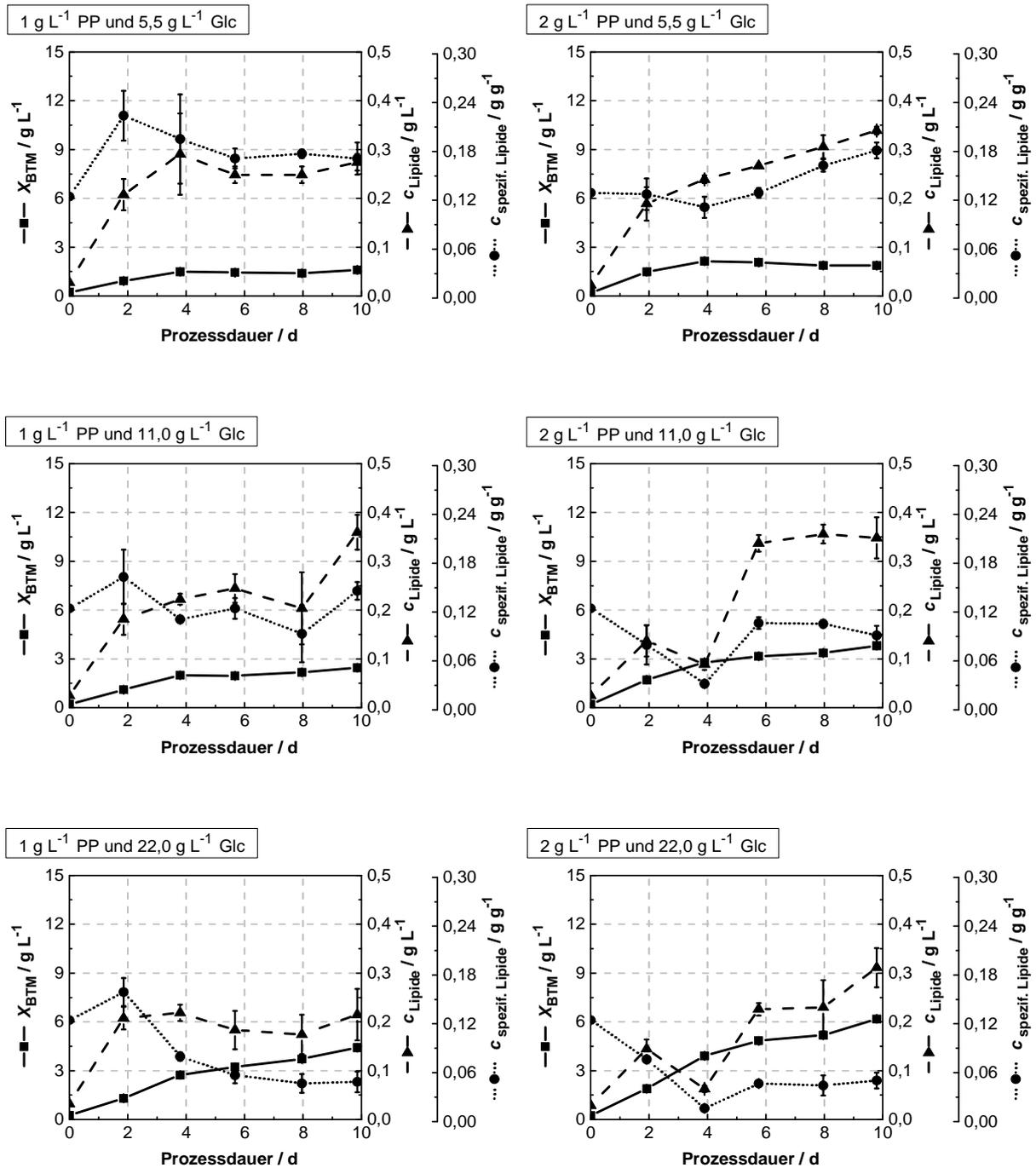


Abbildung 58: Verlauf der Biotrockenmasse- und Lipidkonzentration sowie der spezifischen Lipidkonzentration von photoheterotrophen Kultivierungen mit *E. gracilis* im Proteosepepton-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von 8,0. **Linke Spalte:** 1,0 g L⁻¹ Proteosepepton (PP). **Rechte Spalte:** 2,0 g L⁻¹ PP. **Obere Reihe:** 5,5 g L⁻¹, **mittlere Reihe:** 11,0 g L⁻¹ und **untere Reihe:** 22,0 g L⁻¹ Glucose x H₂O (Glc). Die Probenahmen minderten die zu illuminierende Schichtdicke ($t_0 = 2,3$ cm im Ruhezustand). Die Kulturen wurden bei 28 °C auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹, einem Lichtfluss von 570 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. Die initiale Volumen lag bei 110 mL und sank mit jeder Probenahme um 9 mL und lag final bei rund 50 mL. N=9.

Tabelle 12: Maximalwerte der Biotrockenmassekonzentration $\max. X_{BTM}$, der Biomasseausbeute $Y_{X/S}$, der Lipid-konzentration L_{Max} , der Lipidspezifität $Y_{L / \max. X_{BTM}}$ der in Abbildung 58 dargestellten photoheterotrophen Kultivierungen von *E. gracilis*. Weiterhin sind die mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ und die durchschnittliche volumetrische Lipidproduktivität P_{LV} dargestellt.

Proteosepepton / g L ⁻¹	Glucose x H ₂ O / g L ⁻¹	Max. X_{BTM} / g L ⁻¹	μ / d ⁻¹	$Y_{X/S}$ / %	L_{Max} / g L ⁻¹	$Y_{L / \max. X_{BTM}}$ / %	P_{LV} / mg L ⁻¹ d ⁻¹
1,0	5,5	1,6	0,5	32,0	0,3	19,5	8,5
	11,0	2,5	0,6	24,6	0,4	14,6	24,3
	22,0	4,4	0,6	22,1	0,2	8,00	1,1
2,0	5,5	2,1	0,7	42,8	0,3	18,1	19,0
	11,0	3,8	0,7	38,1	0,4	10,7	28,5
	22,0	6,2	0,7	30,9	0,3	5,0	23,2

10 g L⁻¹ mit etwa 10 mg L⁻¹ α -Tocopherol im Photobioreaktor. Mit 12 g L⁻¹ Glucose und 7 g L⁻¹ Maleinsäure wurden nach drei Tagen rund 7 g L⁻¹ Biotrockenmasse bei Satzkultivierungen erreicht. In Zwei-Phasen-Kultivierungen wurden unter photoheterotrophen und mixotrophen Bedingungen Lipidselektivitäten von 28 bis 44 % ermittelt [Takeyama *et al.*, 1996]. Die in dieser Arbeit erreichten maximalen Biotrockenmassekonzentration (Abbildung 58) liegen bei 6,2 g L⁻¹ mit 20 g L⁻¹ Glucose und 2 g L⁻¹ Proteosepepton am Tag zehn, während die Lipidselektivitäten oftmals über 30 % liegen. Auch wenn die Kohlenstoffkonzentrationen der anderen Medien der Vergleichsliteratur variieren und sich die Ergebnisse nicht direkt vergleichen lassen, kann eine mögliche Ursache der geringen erzielten Biotrockenmassekonzentration in der Wahl der Lichtintensität liegen. Dass bei photoheterotrophen Wachstumsbedingungen mit Glucose im Vergleich zu photoautotrophen oder heterotrophen Bedingungen hohe Lichtflüsse die Wachstumsgeschwindigkeit negativ beeinflussen können ist in der Fachliteratur erwähnt [Ogbonna *et al.*, 2002]. Zudem kann Licht durch die Änderung der Membranpermeabilität die Glucoseaufnahme bei *E. gracilis* (vermutlich negativ) beeinflussen [Nicolas *et al.*, 1980; Ogbonna *et al.*, 2002]. Dabei ist zu bedenken das Nicolas und Mitwirkende bei sehr geringen Lichtflüssen von 40 bis 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit 8,5 g L⁻¹ Glucose Experimente durchgeführt haben, während die hier durchgeführten Experimente bei 570 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ stattfanden. Umgekehrt ist die Hemmung der lichtabhängigen Chloroplasten-Bildung in *E. gracilis* durch Glucose ebenfalls ein bekanntes Phänomen [Koll *et al.*, 1980]. Sowohl die Vorkulturen als auch die Versuchskulturen wiesen eine Grünfärbung auf, wenn auch nicht so intensiv, wie es bei rein photoautotrophen Kulturen beobachtet wurde. Zudem konnte man eine Abstufung erkennen, so dass die photoheterotroph gewachsenen Kulturen mit 22 g L⁻¹ Glucose x H₂O nur eine schwach grüne Färbung aufwiesen. Für alle photoheterotroph gewachsenen Kulturen galt, dass der Lichtstimulus mit dem Fortschritt der Kultivierungsdauer größer wurde, da durch die Entnahme von 9 mL Probe alle zwei Tage und Verdunstungseffekte von durchschnittlich ermittelten 1,35 mL alle zwei Tage die Schichtdicke im Schüttelkolben sank. Dieser Effekt wirkte

der zunehmenden Lichtlimitation durch die zunehmende Zelldichte entgegen. Bezüglich der Lipide konnte ein zur Biomasse- und Kohlenstoffkonzentration antiparalleles Verhalten beobachtet werden. Im gesamten zeitlichen Verlauf sank für alle Medienkompositionen die Lipidselektivität mit steigender Konzentration der Kohlenstoffquelle zu Beginn. Die Akkumulation der Lipide erscheint damit antiparallel gekoppelt an die vorliegende Kohlenstoffkonzentration. Wie bei den heterotrophen Kultivierungen gilt auch für die photoheterotrophen Kultivierungen, dass *E. gracilis* ein größeres Glucoseangebot in das Reservespeicherpolysaccharid Paramylon umsetzt, was entsprechend höhere Paramylonkonzentrationen der jeweiligen Kulturen bedingte – was im Folgenden noch gezeigt wird. Im Detail wird sichtbar, dass die maximalen Lipidkonzentrationen bei den Kultivierungen mit $11,0 \text{ g L}^{-1}$ Glucose \times H_2O im Vergleich zu denen mit $5,5 \text{ g L}^{-1}$ stiegen, jedoch nahmen die Paramylonkonzentrationen signifikant stärker zu. Bei den Kulturen mit höheren Glucose- und Proteosepeptonkonzentrationen fiel sehr deutlich auf, dass die Lipidkonzentrationen und deren Selektivität ab Tag vier sprunghaft anstiegen, während die Wachstumsgeschwindigkeiten ab diesem Zeitpunkt sanken. Wahrscheinlich liegt hier eine zunehmende Stickstofflimitierung und gleichzeitige Umstellung auf ein photoautotrophes Wachstum vor [Edge und Ricketts, 1977; Schifrin und Chisholm, 1981; Ben-Amotz *et al.*, 1985]. Zumal phototroph gewachsene *E. gracilis* eine höhere Lipidselektivität besitzen und ein Großteil ihrer Lipide in der Pigmentfraktion zu finden ist [Hulanicka *et al.*, 1964]. Möglicherweise indiziert der Anstieg der Lipidkonzentration eine Umstellung heterotropher Zellen auf photosynthetische Energiegewinnung. Diese Erkenntnis sollte mit den nachfolgend dargestellten Analysen der Fettsäuren bestätigt werden. Ein sichtlich anderer Verlauf der Lipidkonzentrationen und deren Selektivitäten konnte bei heterotroph gewachsenen Zellen beobachtet werden, wie den Diagrammen aus Abbildung 59 entnommen werden kann. Werden hier die Biotrockenmassekonzentrationen hinsichtlich der steigenden Kohlenstoffkonzentration bei gleichen Proteosepeptonkonzentrationen betrachtet, lässt sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Glucose- und Biotrockenmassekonzentration erkennen. Eine Verdopplung der Glucosekonzentration bewirkte einen Anstieg der Biotrockenmassekonzentration um durchschnittlich 57 % - geringfügig weniger im Vergleich zu den photoheterotrophen Bedingungen. Der Abbildung 59 lässt sich entnehmen, dass Kulturen mit $5,5$ bzw. $11,0 \text{ g L}^{-1}$ Glucose \times H_2O an den Tagen vier bis acht aus der exponentiellen Wachstumsphase in die Stationärphase übergingen, wobei Kulturen mit höherer Proteosepeptonkonzentration die Stationärphase durchschnittlich zwei Tage früher erreichten. Ebenfalls wiesen die Kulturen mit höheren Proteosepeptonkonzentrationen eine im Durchschnitt um $0,13 \text{ d}^{-1}$ höhere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit auf. Die Biotrockenmassekonzentrationen unterscheiden sich wiederum wenig bis auf die Kulturen mit 22 g L^{-1} Glucose \times H_2O – die erhöhte Proteosepeptonkonzentration beeinflusste somit hauptsächlich die Wachstumsgeschwindigkeit der Kulturen. Hierbei spielten die erhöhten Aminosäurekonzentrationen eine große Rolle und hatten einen positiven Ein-

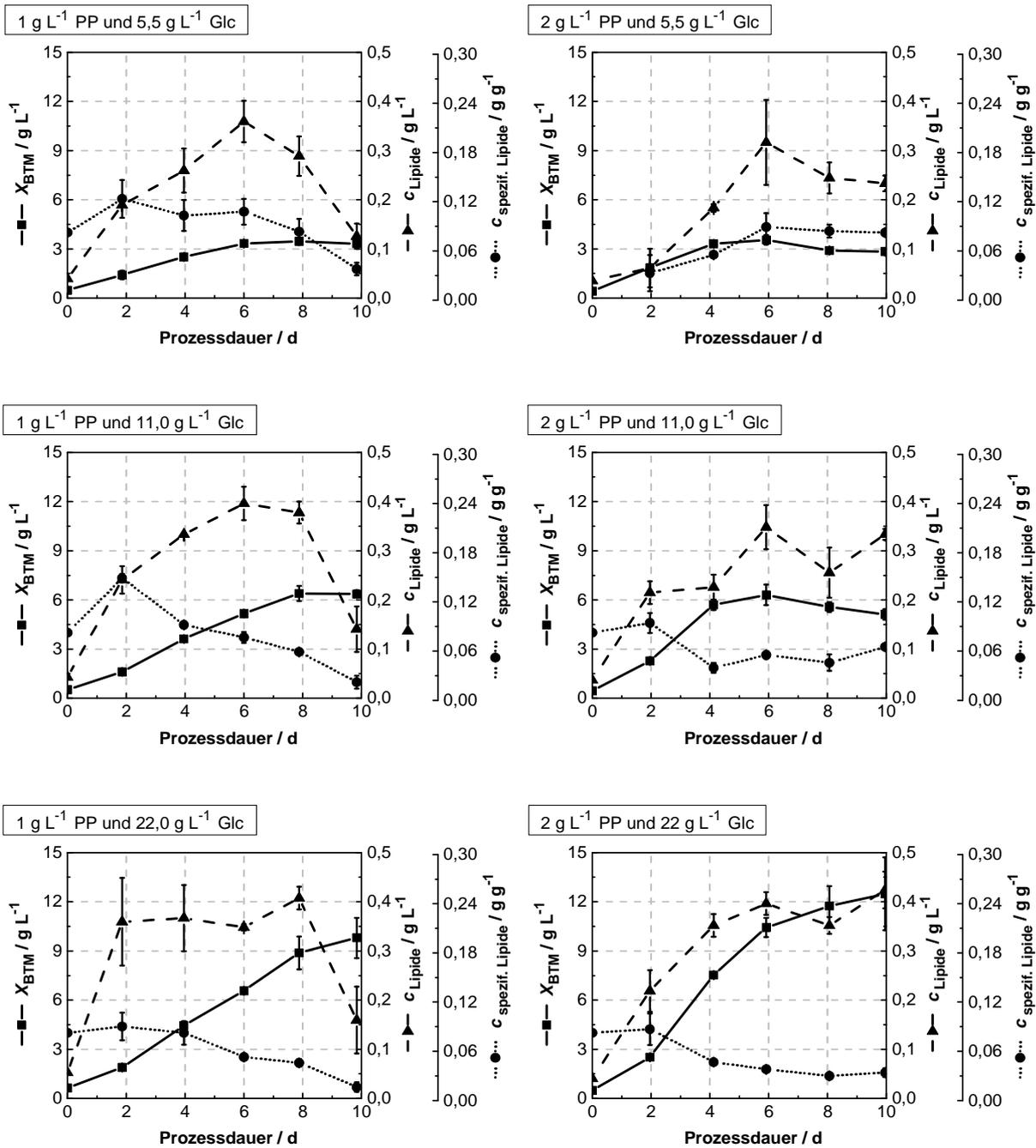


Abbildung 59: Darstellung der Biotrockenmasse- und Lipidkonzentration als auch der Lipidselektivität von heterotrophen Kultivierungen mit *E. gracilis* Proteosepepton-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von 8,0. **Linke Spalte:** 1,0 g L⁻¹ Proteosepepton (PP). **Rechte Spalte:** 2,0 g L⁻¹ PP. **Obere Reihe:** 5,5 g L⁻¹, **mittlere Reihe:** 11,0 g L⁻¹ und **untere Reihe:** 22,0 g L⁻¹ Glucose x H₂O (Glc). Die Probenahmen minderten die zu illuminierende Schichtdicke ($t_0 = 2,3$ cm im Ruhezustand). Die Kulturen wurden bei 28 °C auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹, einem Lichtfluss von 570 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. Die initiale Volumen lag bei 110 mL und sank mit jeder Probenahme um 9 mL und lag final bei rund 50 mL. N=6.

fluss auf das Wachstum bei *E. gracilis* [Hutner *et al.*, 1966; Oda *et al.*, 1982]. Wie aus der Tabelle 13 zu entnehmen ist, sind die spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten mit steigender Kohlenstoffkonzentration geringfügig höher, jedoch stellen sie im Vergleich zu anderen

aktuellen heterotrophen Kultivierungen einen eher niedrigen Wert dar. Hierbei ist zu beachten, dass für die maximale Lipidselektivität Werte vom Tag zwei aller Kultivierungen aufgrund der nicht für den gesamten Verlauf repräsentativen Werte vernachlässigt wurden. Werte der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten stellen den Mittelwert für die exponentielle Phase der jeweiligen Kultivierung dar.

Tabelle 13: Maximalwerte der Biotrockenmassekonzentration X_{BTM} , der Biomasseausbeute $Y_{X/S}$, der Lipidkonzentration L_{Max} , der Lipidspezifität $Y_{L/Max} \cdot X_{BTM}$ der in den in Abbildung 59 dargestellten heterotrophen Kultivierungen von *E. gracilis*. Weiterhin sind die mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ und die durchschnittliche volumetrische Lipidproduktivität P_{LV} dargestellt.

PP / g L ⁻¹	Glucose x H ₂ O / g L ⁻¹	Max. X_{BTM} / g L ⁻¹	μ / d ⁻¹	$Y_{X/S}$ / %	L_{Max} / g L ⁻¹	$Y_{L/Max} \cdot X_{BTM}$ / %	P_{LV} / mg L ⁻¹ d ⁻¹
1,0	5,50	3,5	0,4	69,2	0,4	10,8	15,0
	11,0	6,4	0,5	64,0	0,4	9,2	21,7
	22,0	9,8	0,5	49,0	0,4	8,2	8,7
2,0	5,5	3,6	0,5	71,0	0,3	8,9	22,8
	11,0	6,3	0,6	63,0	0,4	6,5	17,8
	22,0	12,5	0,7	62,4	0,4	4,3	25,9

Ogbonna *et al.* [1998] beschreibt für die heterotrophe Kultivierungen von *E. gracilis* im amino-säurehaltigen Hutner-Medium mit 15,0 g L⁻¹ Glucose eine spezifische Wachstumsgeschwindigkeit von 1,08 d⁻¹, wobei anzumerken ist, dass die Kultivierungen in einem Bioreaktor stattgefunden haben. Cramer und Myers berichteten bei synthetischen Medien unter heterotrophen Bedingungen von spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten von 0,39 bis 0,46 d⁻¹.

Weiterhin ist in Abbildung 59 zu erkennen, dass die Kulturen mit 22,0 g L⁻¹ Glucose x H₂O die Stationärphase während der gesamten Prozessdauer nicht erreicht hatten und bei längerer Kultivierung gegebenenfalls höhere Biotrockenmassekonzentrationen hätten erzielt werden können. Ebenfalls wie bei den photoheterotrophen Kultivierungen wird auch bei heterotrophen Kultivierungen der Trend deutlich, dass sich mit steigender Glucosekonzentration ebenfalls die Lipidkonzentrationen erhöhten, während ihre spezifischen Konzentrationen sanken. Beispielsweise verdreifachte sich die maximale Biotrockenmassekonzentration der Medienkompositionen 5 g L⁻¹ zu 22,0 g L⁻¹ Glucose x H₂O und 2,0 g L⁻¹ Proteosepepton, während sich die maximale Lipidkonzentration nur um etwa 30 % erhöhte. Ähnliche Ergebnisse zum Verhalten von *E. gracilis* und dem Zusammenhang zwischen dem Nährstoffangebot und der resultierenden Biotrockenmassekonzentration und der Konzentration an Paramylon zeigte auch Šantek und Kollegen [2010] mit einem Komplexmedium auf Basis von Kartoffelfruchtwasser.

4.6.2 Fettsäurespektren von photoheterotrophen und heterotrophen *E. gracilis*

Bei der Analyse der Fettsäuren als FAME ergab sich auf Basis der PP-Medien ein anderes Bild als bei photoautotrophen Kultivierungen im EG5.1-Medium. Die Fettsäuremethylester mit den größten Anteilen werden aus Kulturen bei photoheterotrophen als auch heterotrophen Kultivierungen durch die gesättigten Fettsäuren C14:0 und C16:0 repräsentiert, was aus den Abbildungen 60 und 61 hervorgeht. Zunächst werden Verläufe der stark abundanten Myristin (C14:0)- und Palmitinfettsäureester (C16:0) der photoheterotrophen Kultivierungen dargestellt. Der Tabelle 14 ist zu entnehmen, dass die beiden Fettsäuren bei beiden Kultivierungsmodi ca. 40 bis 50 % aller zugeordneten Fettsäuren anteilig ausgemacht haben. Der hohe Anteil stimmt mit Ergebnissen von Hulanicka und Kollegen [1964] überein. Bei entsprechenden Bedingungen wurden bei Regnault *et al.* für beide Fettsäuren 35 % ausgewiesen – es wurden jedoch auch Fettsäurespezies detektiert, die bei eigenen Versuchen nicht präsent waren. Bei den eigenen Versuchen ist weiterhin aufgefallen, dass der C16:0-Anteil während der Kultivierungen sank, während der C14:0 Anteil zunahm. In den Abbildungen ist auch das Verhältnis dieser beiden FAME-Spezies dargestellt. Hierbei wurde erkannt, dass dieses Verhältnis von den Medienzusammensetzungen und Kultivierungsbedingungen abhängig war. Generell nahm bei beiden Kultivierungsmodi das Verhältnis mit zunehmender Kohlenstoffkonzentration im Medium ab und war bei den heterotroph gewachsenen Kulturen mit 1,0 bis 1,5 höher, als bei photoheterotroph gewachsenen Kulturen mit 0,5 bis 1,0. Interessanter Weise konnten für die photoautotrophen Kultivierungen von 300 bis 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aus Kapitel 4.6.4. Verhältnisse von 0,2 bis 0,5 ermittelt werden. Es ergibt sich somit ein sinkendes C14:0/C16:0-Verhältnis über die verschiedenen Kultivierungsmodi. Unterstützt wird diese Aussage durch Ergebnisse von Rosenberg, wo *E. gracilis* Zellen in Proplasten Anteile von 33 und 16 % an C14:0 und C16:0 aufwiesen, während in Chloroplasten Anteile von 4 und 9 % dieser Fettsäuren ermittelt wurden [Rosenberg 1963]. Aus der Tabelle 14 ist zu entnehmen, dass bei allen Kultivierungen die Fettsäuren C12:0 bis C18:1 60 bis 70 % (*w/w*) aller Fettsäuren ausmachten. Diese gehören zu den für die Biodieselherstellung empfohlenen Fettsäurespezies [Maag 1984; Knothe 2008]. Bei den photoheterotrophen Kulturen ist zudem die mehrfach ungesättigte Fettsäure C20:3n3 dominant mit durchschnittlich 10 % (*w/w*) im erfassten Spektrum vertreten. C18:1 und C20:5n3 (EPA) haben jeweils einen Anteil von durchschnittlich 9 % (*w/w*). Die FAME aus heterotrophen Kulturen werden neben den oben genannten FAME primär anteilig von C20:2n6 und C20:4n6 vertreten. Der hohe Anteil von Arachidonsäure C20:4n6 ist ein bekanntes Verhalten von *E. gracilis*, da es unter heterotrophen Bedingungen in der Pellikula akkumuliert [Rosenberg 1967]. Dieser Fettsäure wird ein positiver Einfluss in Bezug auf die Entwicklung des Gehirns bei Kleinkindern zugesprochen, somit findet sie Einsatz in der Nahrungsmittel- und Pharmaindustrie. Dies jedoch in geringerem Umfang als die ω 3-Fettsäuren C20:5n3 (EPA) und

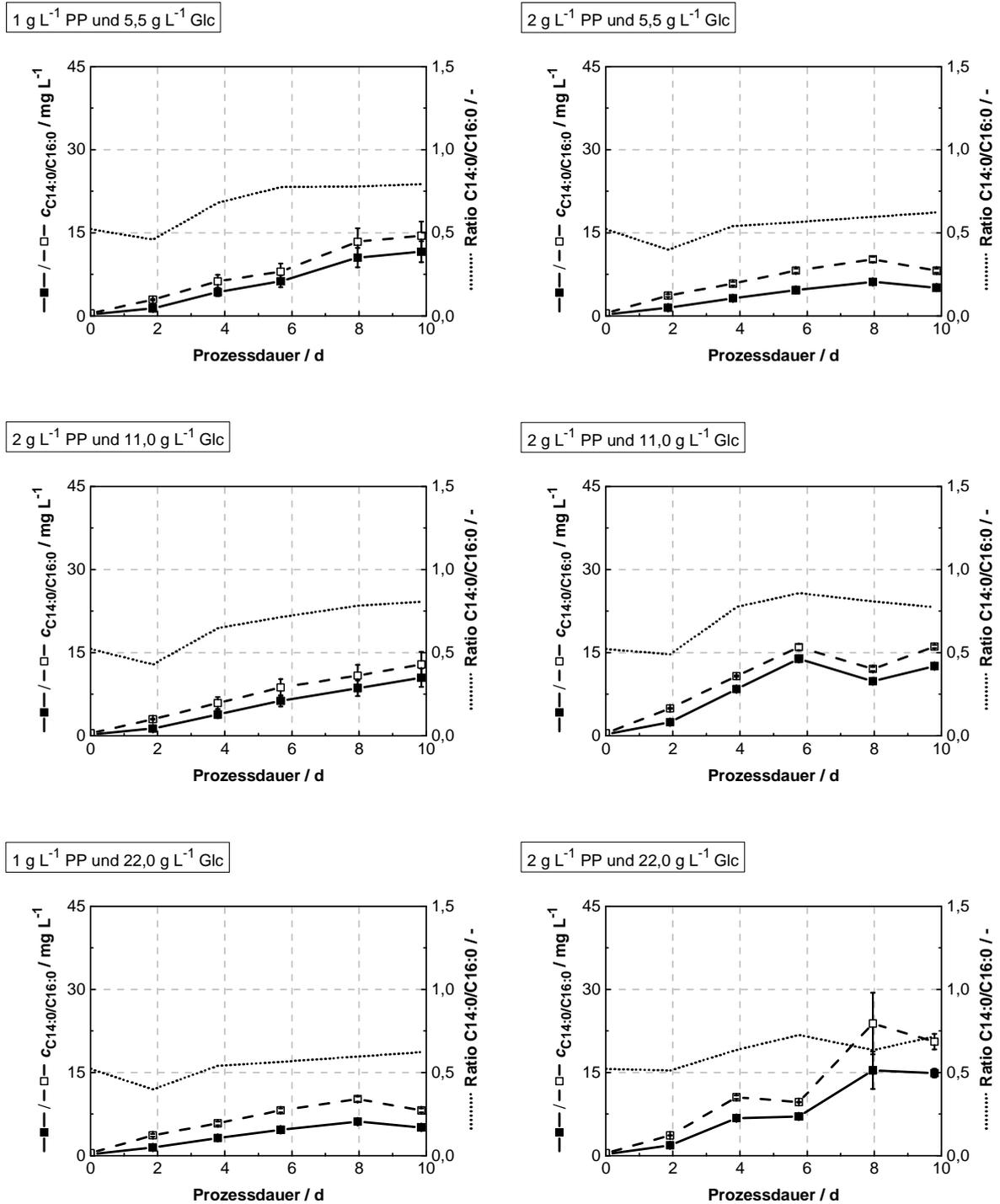
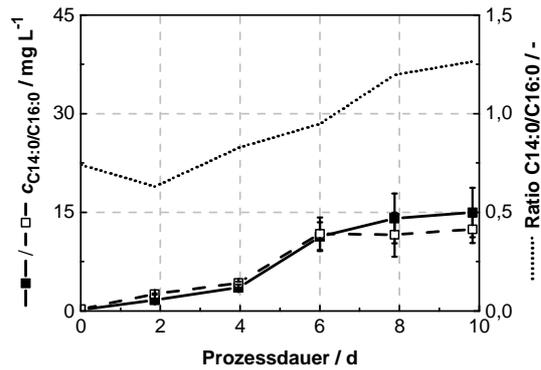
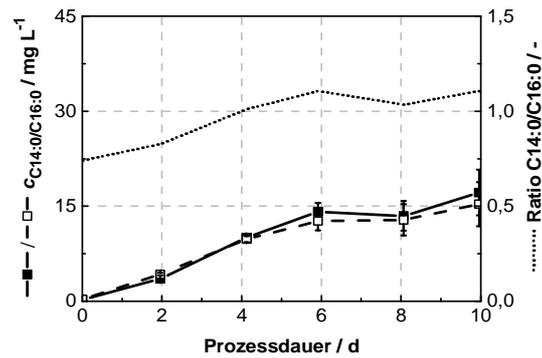


Abbildung 60: Darstellung der C14:0- und C16:0-Konzentration als auch des Verhältnisses C14:0/C16:0 von photoheterotrophen Kultivierungen mit *E. gracilis* im Proteosepton-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von 8,0. **Linke Spalte:** 1,0 g L⁻¹ Proteosepton (PP). **Rechte Spalte:** 2,0 g L⁻¹ PP. **Obere Reihe:** 5,5 g L⁻¹, **mittlere Reihe:** 11,0 g L⁻¹ und **untere Reihe:** 22,0 g L⁻¹ Glucose x H₂O (Glc). Die Probenahmen minderten die zu illuminierende Schichtdicke ($t_0 = 2,3$ cm im Ruhezustand). Die Kulturen wurden bei 28 °C auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹, einem Lichtfluss von 570 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N=6.

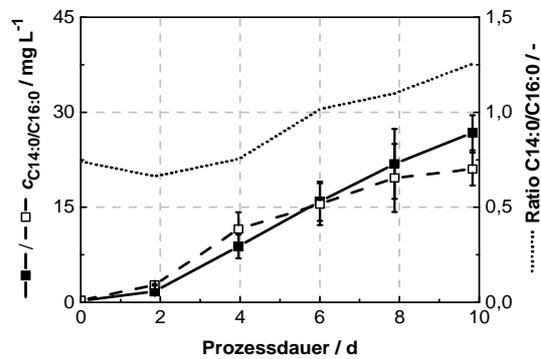
1 g L⁻¹ PP und 5,5 g L⁻¹ Glc



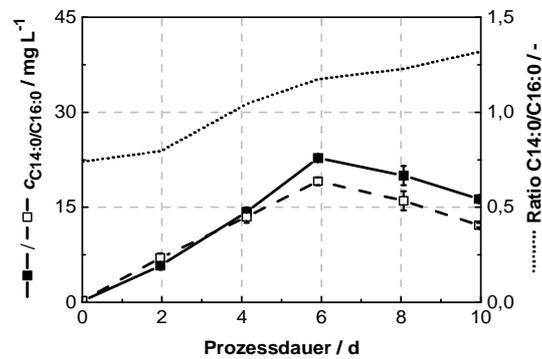
2 g L⁻¹ PP und 5,5 g L⁻¹ Glc



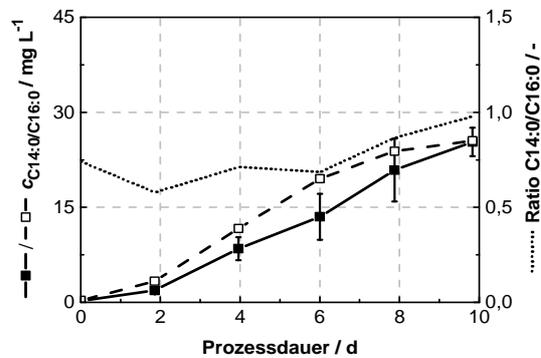
1 g L⁻¹ PP und 11,0 g L⁻¹ Glc



2 g L⁻¹ PP und 11,0 g L⁻¹ Glc



1 g L⁻¹ PP und 22,0 g L⁻¹ Glc



2 g L⁻¹ PP und 22,0 g L⁻¹ Glc

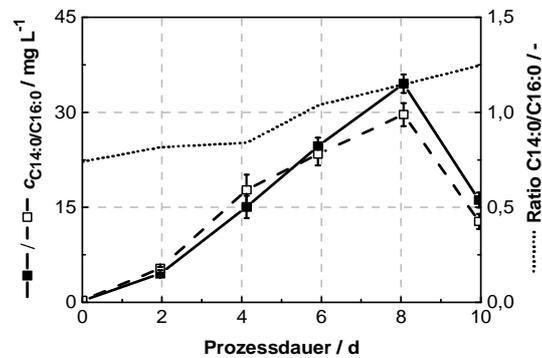


Abbildung 61: Darstellung der C14:0- und C16:0-Konzentration als auch des Verhältnisses C14:0/C16:0 von heterotrophen Kultivierungen mit *E. gracilis* Proteosepepton-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von 8,0. **Linke Spalte:** 1,0 g L⁻¹ Proteosepepton (PP). **Rechte Spalte:** 2,0 g L⁻¹ PP. **Obere Reihe:** 5,5 g L⁻¹, **mittlere Reihe:** 11,0 g L⁻¹ und **untere Reihe:** 22,0 g L⁻¹ Glucose × H₂O (Glc). Die Probenahmen minderten die zu illuminierende Schichtdicke (t₀ = 2,3 cm im Ruhezustand). Die Kulturen wurden bei 28 °C auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹, einem Lichtfluss von 570 μmol m⁻² s⁻¹ und einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N=6.

C22:6n3 (DHA), die im Folgenden diskutiert werden [Ward und Singh, 2005]. Insgesamt sind wenige ω3-Fettsäuren und viele gesättigte Fettsäuren zu finden. Bei den weiteren in Tabelle

14 gelisteten FAME ist unabhängig vom Kultivierungsmodus, Proteosepepton- oder Glucosekonzentration bis auf wenige Ausnahmen ein ähnliches Verhalten zu erkennen. Explizit konnte C22:6n3 (DHA) photoheterotroph nur bei Einsatz von 2,0 g L⁻¹ PP nachgewiesen werden, während es bei den heterotrophen Kultivierungen stets präsent war. In photoheterotrophen Kulturextrakten wurden die FAME C14:1, C22:0 und C23:0 nicht detektiert, während heterotrophe Kultivierungen bei den FAME kein C16:3 und C20:3n3 aufwiesen.

In Bezug auf die eingesetzten Glucose-Konzentrationen zeigten sich bei beiden Kultivierungsmodi – insbesondere bei den photoheterotrophen Bedingungen – das bestimmte FAME-Konzentrationen mit steigender Konzentration der Kohlenstoffquelle sinken. Als Beispiel seien hier für die photoheterotrophen Kulturen die Fettsäuren C14:0, C18:2n6, C18:3n3, C20:4n6 und C20:5n3 genannt. Hingegen sind die Fettsäuren C18:1, C20:2n6, C20:3n6 und C20:3n3 besonders in den Ansätzen mit 22,0 g L⁻¹ Glucose x H₂O zu finden. Die ebenfalls von Hulanicka *et al.* [1964] erfassten FAME weisen ähnliche Trends auf.

Bezüglich der ω3-Fettsäuren sind C18:3n3, C20:5n3 und C22:6n3 von sehr großem Interesse hinsichtlich des bestehenden wirtschaftlichen Potenzials [Ward und Singh, 2005]. In den folgenden Abbildungen 62 und 63 werden explizit diese drei Fettsäuren bei beiden Kultivierungsmodi verglichen. Anbetracht der Ergebnisse in Abbildungen 62 kann bestätigt werden, dass die Fettsäure C18:3n3 als Indikator für photosynthetisches Gewebe genutzt werden kann [Hugly und Somerville, 1992; Mongrand *et al.*, 1998]. Unter diesem Aspekt können die Medienkompositionen mit verschiedenen Glucose-Monohydrat-Konzentrationen unabhängig von der PP-Konzentration gut miteinander verglichen werden. Je niedriger die Konzentration der Kohlenstoffquelle war, desto mehr C18:3n3 wurde im Kultivierungsverlauf gebildet. Bei geringen Konzentrationen an Kohlenstoff hatten die Zellen offensichtlich mehr Zeit den Photosynthese-Apparat voll auszubilden. Mit Ausnahme des Mediums mit 1,0 g L⁻¹ Proteosepepton und 11,0 g L⁻¹ Glucose x H₂O, nahm die C18:3n3-Konzentration bei allen Ansätzen mit weniger als 22,0 g L⁻¹ Glucose x H₂O am Ende der Kultivierung maximale Werte an, zumal sich bei längerer Kultivierung ein weiterer Anstieg vermuten lässt. Die zunehmende Produktion von C18:3n3 bei der Bildung von Chloroplasten in grünenden *E. gracilis*-Zellen ist ein bereits beschriebenes Phänomen [Rosenberg und Pecker, 1964]. Es existiert die Annahme, dass die Lipide, auf denen die Chlorophylle in den Thylakoiden präsentiert werden, zum Großteil aus den Fettsäuren C18:3n3 und C16:3n3 bestehen [Siebertz *et al.*, 1980]. Die Verläufe der FAME dieser Fettsäuren wären somit ein gutes Indiz dafür, inwiefern *E. gracilis* Chloroplasten ausbildet und den Metabolismus auf photosynthetische Energiegewinnung umstellt. Es kam daher beim Einsatz von 22,0 g L⁻¹ Glucose x H₂O vermutlich nur zu einer geringen Bildung von Chloroplasten, was die Ergebnisse von Koll *et al.* [1980] widerspiegelt. Die Entwicklungen der Konzentration der n3-Fettsäuren C18:3n3, C20:5n3 und C22:6n3 bei heterotrophen Kultivierungen von *E. gracilis*

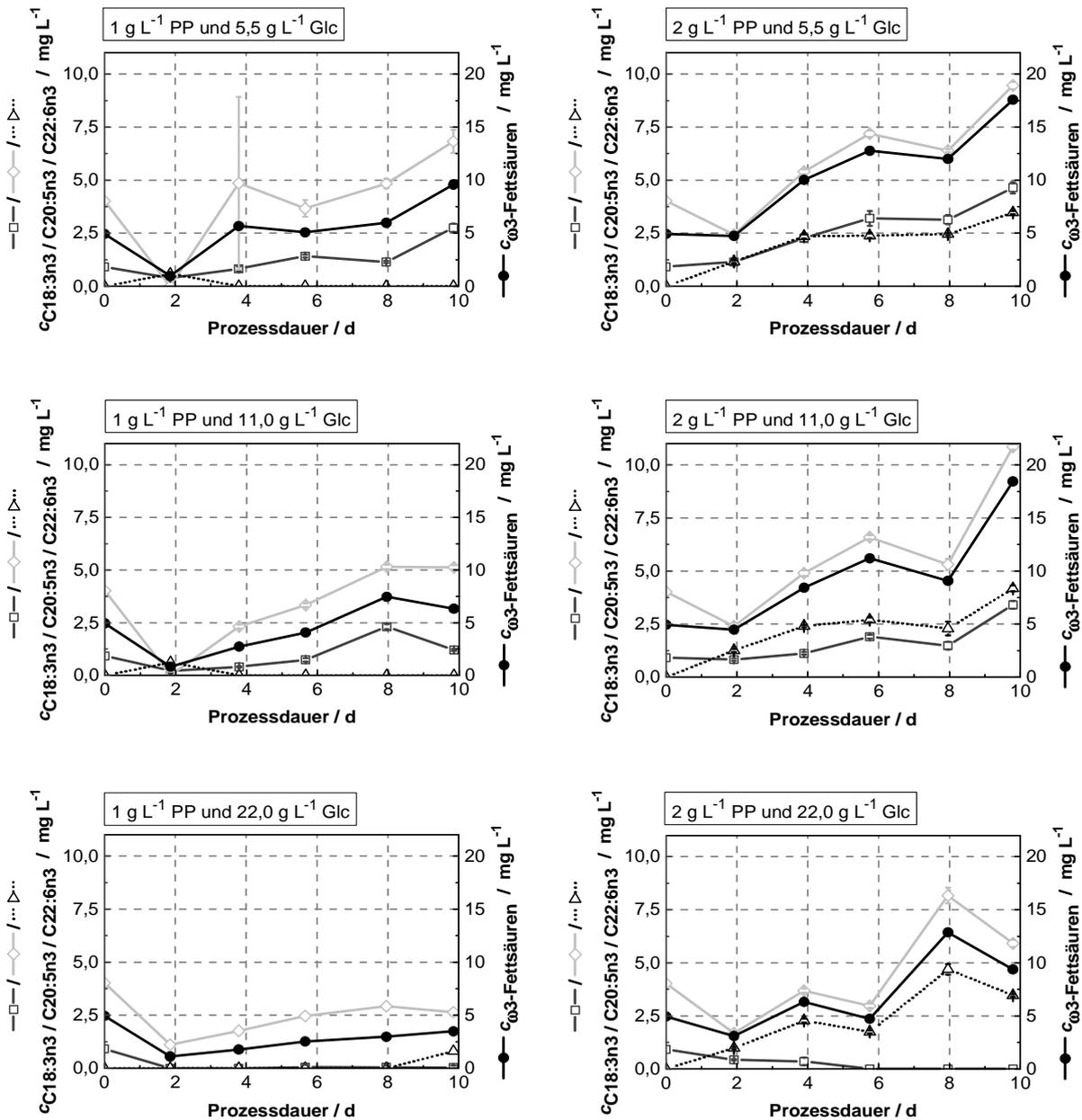


Abbildung 62: Darstellung der C18:3n₃-, C20:5n₃- (EPA) und C22:6n₃- (DHA) Konzentrationen, als auch der Gesamtkonzentration dieser ω₃-Fettsäuren von photoheterotrophen Kultivierungen mit *E. gracilis* im Proteosepepton-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von 8,0. **Linke Spalte:** 1,0 g L⁻¹ Proteosepepton (PP). **Rechte Spalte:** 2,0 g L⁻¹ PP. **Obere Reihe:** 5,5 g L⁻¹, **mittlere Reihe:** 11,0 g L⁻¹ und **untere Reihe:** 22,0 g L⁻¹ Glucose × H₂O (Glc). Die Probenahmen minderten die zu illuminierende Schichtdicke (t₀ = 2,3 cm im Ruhezustand). Die Kulturen wurden bei 28 °C auf bodenilluminieren LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹, einem Lichtfluss von 570 μmol m⁻² s⁻¹ und einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N=6.

sind in Abbildung 63 zu sehen. Es wird schnell klar, dass bei heterotropher Kultivierung von *E. gracilis* nur geringe Mengen der n₃-Fettsäuren produziert werden. Wie Barsanti *et al.* [2000] zeigen konnte, synthetisiert *E. gracilis* in Abwesenheit von Licht insgesamt weniger PUFA und somit auch weniger n₃-Fettsäuren. Verglichen mit anderen Mikroalgenspezies können C20:5n₃ und C22:6n₃ von bestimmten Mikroalgen auch unter heterotrophen Bedingungen in

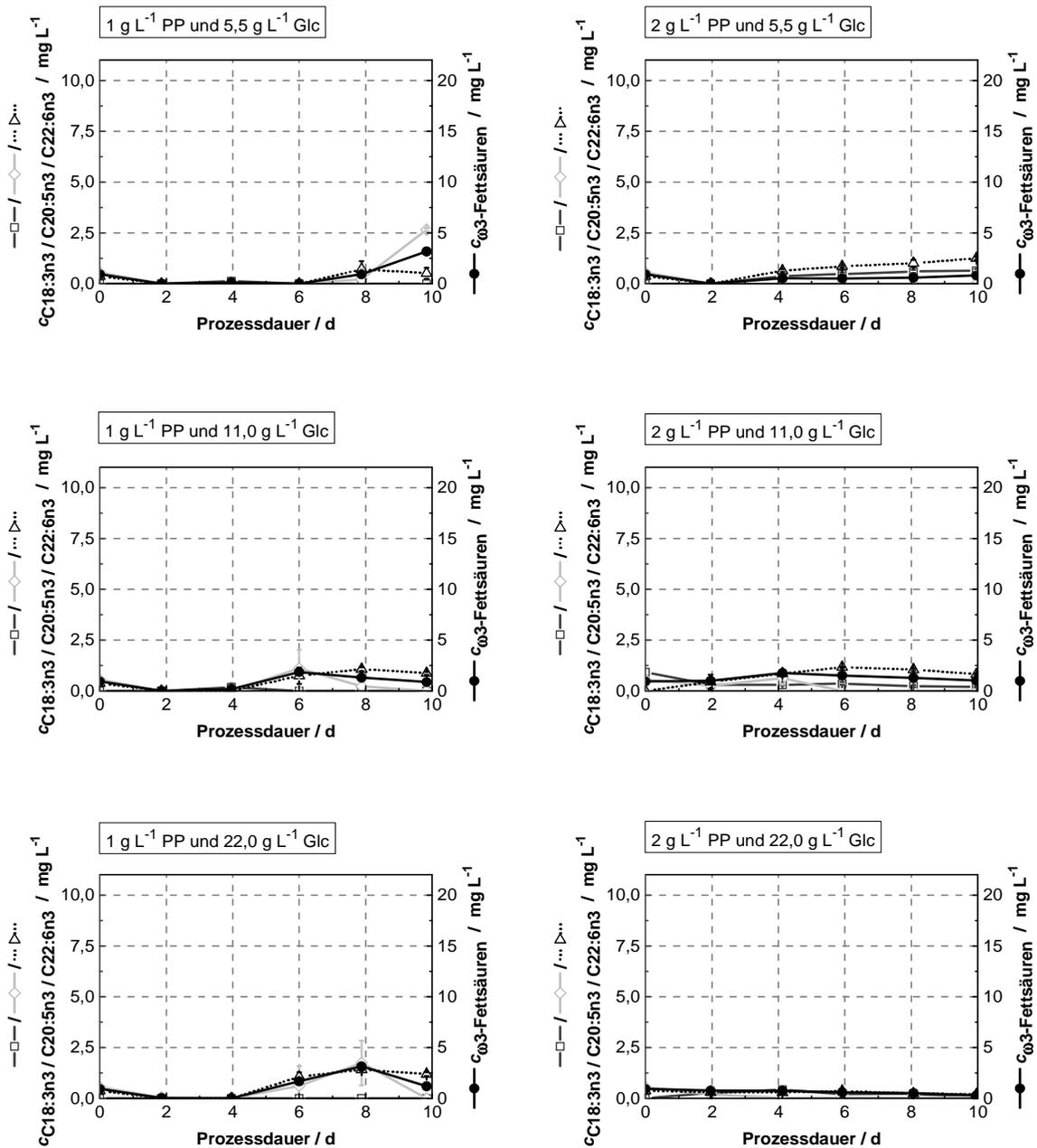


Abbildung 63: Darstellung der C18:3n3-, C20:5n3- (EPA) und C22:6n3- (DHA) Konzentrationen, als auch der Gesamtkonzentration dieser ω 3-Fettsäuren von heterotrophen Kultivierungen mit *E. gracilis* Proteosepepton-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von 8,0. **Linke Spalte:** 1,0 g L⁻¹ Proteosepepton (PP). **Rechte Spalte:** 2,0 g L⁻¹ PP. **Obere Reihe:** 5,5 g L⁻¹, **mittlere Reihe:** 11,0 g L⁻¹ und **untere Reihe:** 22,0 g L⁻¹ Glucose x H₂O (Glc). Die Probenahmen minderten die zu illuminierende Schichtdicke ($t_0 = 2,3$ cm im Ruhezustand). Die Kulturen wurden bei 28 °C auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹, einem Lichtfluss von 570 μ mol m⁻² s⁻¹ und einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N=6.

größeren Mengen produziert werden, wobei kein allgemeiner Zusammenhang zwischen Chloroplastengehalt und der Produktion dieser Fettsäuren vorliegt [Barsanti *et al.*, 2000; Sijtsma und de Swaaf, 2004; Wen und Chen, 2003]. Da jedoch unter heterotrophen Bedingungen insgesamt weniger PUFA von *E. gracilis* synthetisiert werden, sinkt auch die Konzentration von

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 14: FAME-Spektren am achten Tag der photo- und heterotrophen Kultivierung von *E. gracilis* im Schüttelkolben. Dargestellt wurden die Ergebnisse anteilig in Gewichtsprozent bei den jeweiligen Kulturbedingungen mit 1 oder 2 g L⁻¹ Proteosepepton (PP) und 5,5, 11,0 oder 22,0 g L⁻¹ Glucose x H₂O. Die Werte wurden auf eine Stelle hinter dem Komma gerundet.

FAME	photoheterotroph						heterotroph					
	1,0 g L ⁻¹ PP			2,0 g L ⁻¹ PP			1,0 g L ⁻¹ PP			2,0 g L ⁻¹ PP		
	Glucose x H ₂ O / g L ⁻¹											
	5,5	11,0	22,0	5,5	11,0	22,0	5,5	11,0	22,0	5,5	11,0	22,0
Anteil / %												
C11:0	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,5	-	-	-
C12:0	3,8	3,1	3,8	2,7	4,3	3,7	4,6	4,8	4,3	3,2	5,0	5,7
C13:0	2,6	2,0	2,9	0,9	5,7	2,1	2,5	1,6	1,7	2,6	2,0	1,7
C14:0	19,1	18,2	14,6	16,8	19,9	15,3	23,1	22,4	18,7	22,6	26,9	26,3
C14:1	-	-	-	-	-	-	0,3	0,3	0,3	-	0,2	0,4
C15:0	0,5	0,5	-	0,5	1,1	0,5	0,8	0,3	0,4	1,5	0,9	0,6
C16:0	24,5	23,2	24,5	20,8	21,4	23,9	19,3	20,4	21,6	21,9	21,9	22,9
C16:1	2,0	2,0	1,2	2,1	2,3	1,7	5,4	5,3	4,2	3,4	4,7	4,9
C17:1	1,1	2,1	-	2,9	0,9	-	-	-	-	-	-	-
C18:0	2,7	2,5	3,1	1,8	1,6	1,7	2,1	1,6	1,9	2,3	1,8	1,3
C18:1	8,1	8,1	9,7	8,3	7,8	9,5	6,0	6,1	7,6	5,9	5,4	6,2
C18:2n6	2,4	3,9	-	3,7	2,3	1,0	2,5	2,2	2,3	2,6	2,3	1,9
C18:3n6	-	-	0,8	-	-	-	-	2,2	0,1	-	-	-
C18:3n3	1,9	4,4	0,1	5,3	2,1	-	-	-	-	0,9	0,3	0,2
C20:2n6	7,2	6,1	10,1	5,8	6,6	8,6	8,0	9,1	10,1	8,8	7,5	7,8
C20:3n6	0,9	1,1	2,3	0,8	1,1	2,2	4,5	4,6	3,7	4,6	4,3	4,4
C20:3n3	11,2	8,2	17,4	7,0	8,6	15,7	-	-	-	-	-	-
C20:4n6	4,0	4,8	2,7	5,6	3,3	3,0	15,6	15,0	16,7	18,4	15,5	14,5
C20:5n3	7,9	9,8	6,8	10,8	7,6	7,0	0,3	0,1	1,3	-	-	-
C22:0	-	-	-	-	-	-	3,9	3,0	3,2	-	-	-
C22:6n3	-	-	-	4,2	3,3	4,1	1,0	0,8	1,1	1,5	1,3	1,2
C23:0	-	-	-	-	-	-	0,2	0,1	0,2	-	-	-
Summe	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

C20:5n3 und C22:6n3. Generell besitzt *E. gracilis* im Vergleich zu vielen anderen Mikroalgen einen geringen Anteil von C20:5n3 und C22:6n3 in Bezug auf Gesamtmenge aller Fettsäuren [Singh und Ward, 1997]. Im Vergleich der ω 3/ ω 6-Verhältnisse der beiden Kultivierungsmodi zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Verhältnis der gesättigten zu den ungesättigten Fettsäuren. In allen Medienkompositionen bei photoheterotrophen Bedingungen mit 1,0 g L⁻¹ Proteosepepton waren unabhängig von der Glucose-Monohydrat-Konzentration stets deutlich mehr gesättigte als ungesättigte Fettsäuren vorhanden, wodurch sich ein Verhältnis von ca. 1,5 ergab. Lediglich im Ansatz mit 22,0 g L⁻¹ Glucose-Monohydrat und 1,0 g L⁻¹ Proteosepepton war eine deutliche Zunahme des Anteils ungesättigter Fettsäuren im Kultivierungsverlauf messbar. Bei photoheterotrophen Bedingungen mit 2,0 g L⁻¹ Proteosepepton lag das ω 3/ ω 6-Verhältnis bei etwa 0,75 bis 1,0. Das ω 3/ ω 6-Verhältnis ist bei allen heterotrophen Bedingungen wiederum kleiner 0,1 gewesen. Im Durchschnitt war der Anteil der ω 6-Fettsäuren mit 29 % nahezu 20mal so hoch wie der von ω 3-Fettsäuren. Dies lag vor allem an C20:4n6, welches

unter heterotrophen Bedingungen von *E. gracilis* vermehrt synthetisiert und in die Zellmembran eingebaut wird (Hulanicka *et al.*, 1964; Rosenberg 1967).

4.7 Photoautotrophe Satzkultivierungen mit *E. gracilis* im Flachplattenbioreaktor und der Einfluss des Gasvolumenstromes

Ein minimaler Gasfluss-Bedarf war von Interesse, da die Begasung einen Großteil der Betriebskosten bei technischen Photobioreaktor-Anlagen ausmachen kann [Norsker *et al.*, 2011] und die Anfälligkeit von *E. gracilis* bei Scherkräften den optimalen Begasungsbereich zur Produktivitätssteigerung erforderte. Hierbei wurde mit unterschiedlichen Gasvolumenströmen deutlich, dass der Gasfluss ein wichtiges Kriterium für die Entwicklung der Viabilität darstellt und somit auch die Prozessstabilität beeinflusst. Inwiefern dies den gesamten Kultivierungsverlauf beeinflussen kann, wird nun im Folgenden anhand von acht Satzkultivierungen im Flachplattenphotobioreaktor dargestellt, bei denen ein Gasvolumenstrom von 0,04 vvm und 0,20 vvm mit 95 % (v/v) Luft und 5 % (v/v) CO₂ gewählt wurde. Geringere Gasflüsse wiesen eine sehr inhomogene Gasverteilung (0,02 vvm) und CO₂ Limitierung (0,03 vvm) in der Wachstumsphase auf. Es wurden die Auswirkungen bezüglich der Biomasseentwicklung betrachtet und im Weiteren mit der Entwicklung der Viabilität, der α -Tocopherol-, der Paramylon- und der Lipidkonzentration verglichen. Alle Kultivierungen verliefen unter sonst gleichen Bedingungen im Flachplattenphotobioreaktor (vergleiche Abschnitt 4.2.5) mit einer beidseitigen Illumination von 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in 5 L EG5.1-Medium bei einem pH von 3,0 zu Beginn. Inokuliert wurde der Reaktor auf eine optische Dichte bei 540 nm von 0,1. Beim Beenden der Kultivierungen wurde der Stickstoffgehalt in der Kulturbrühe mit Hilfe eines Hach-Lange Tests bestimmt. Für alle dargestellten Kultivierungen in Bioreaktoren in den kommenden Abschnitten gilt, dass drei technische Replikate je Probenahmezeitpunkt zur Analyse entnommen wurden. Sofern die Übersichtlichkeit dadurch beeinträchtigt ist, wird in den folgenden Abbildungen darauf verzichtet den Fehler darzustellen. Lediglich in Fällen mit großer Abweichung wurden die Fehlerbalken trotzdem aufgetragen. In Abbildung 64 wird deutlich, dass die Satzkultivierungen mit identischen Zelldichten zwischen 0,06 bis 0,08 g L⁻¹ begonnen hatten. Die Kulturen erreichten allesamt am ersten Kultivierungstag maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten von 1,0 bis 1,6 d⁻¹, wobei sich der Großteil der ermittelten Werte um 1,4 d⁻¹ bewegte. In der Literatur sind spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten bei identischen Bedingungen 0,96 bis 1,44 d⁻¹ beschrieben [Kitaya *et al.*, 2005; Chae *et al.*, 2006]. Jedoch erfolgte die Bestimmung beispielsweise bei Kitaya und Mitwirkenden in Tröpfchenkultivierungen mit sehr dünnen Schichtdicken im Millimeterbereich bei 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Mit deutlich höherer Schichtdicke von 20 cm unter ähnlichen Lichtflüssen sind die Ergebnisse der Kultivierungen von Chae *et al.* mit den hier gezeigten Ergebnissen vergleichbar. Etwas geringere maximale spezifische Wachs-

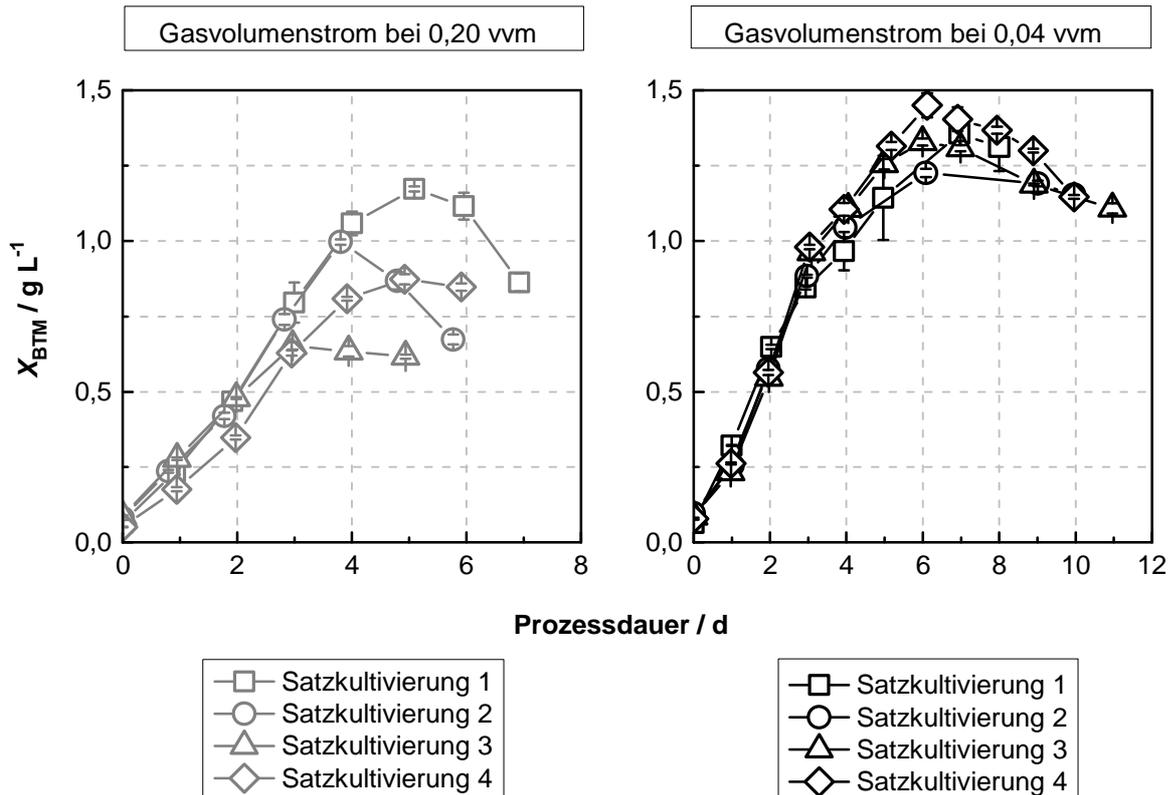


Abbildung 64: Entwicklung der Biotrockenmassekonzentrationen bei photoautotrophen Satzkultivierungen von *E. gracilis*-Kulturen mit 5 L EG5.1-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von 3,0 und konstantem beidseitigen Lichtfluss von $850 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ und $29 \text{ }^{\circ}C$ in Abhängigkeit vom Gasvolumenstrom: **links:** 0,20 vvm und **rechts:** 0,04 vvm. Kulturschichtdicke: 5 cm. Der entsprechend angegebene Gasvolumenstrom bestand aus 5 % CO_2 (v/v) und 95 % (v/v) Luft.

tumsgeschwindigkeiten um den Wert $0,97 d^{-1}$ wurden bei Schüttelkolbenkultivierungen erreicht, wie im Abschnitt 4.6.1 dargestellt wurde, wobei dieser Maximalwert mit unterschiedlichen Lichtflüssen ermittelt wurde. Dies spricht gegebenenfalls für eine mögliche Transportlimitierung in Bezug auf das Substrat CO_2 . In beiden Diagrammen der Abbildung 64 ist den Kultivierungen ein identisches Wachstum bis zum dritten Tag zu entnehmen. Ab dem dritten Tag wird deutlich, dass die Satzkultivierungen mit einem Gasvolumenstrom von 0,20 vvm das Wachstum allmählich einstellten, wobei die Kulturen unterschiedliche Biotrockenmassekonzentration von 0,6 bis $1,2 g L^{-1}$ erreichten. Weiterhin wurde bei Endpunktbestimmungen dieser Kultivierungen Stickstoff in Form von Ammonium im Medium vorgefunden, welches zum Teil noch 30 % des Gesamtstickstoffs im Frischmedium entsprach. Ein Abbruch des Wachstums durch Stickstoffmangel lag somit nicht vor. Die Satzkultivierungen bei 0,04 vvm demonstrierten trotz rund viermal längeren Mischzeiten einen recht uniformen Verlauf des Wachstums mit maximalen Biotrockenmassekonzentrationen von 1,2 bis $1,5 g L^{-1}$ zwischen Tag sechs und sieben der jeweiligen Kultivierung und maximal 6 bis 14 % vom ursprünglich vorgelegten Gesamtstickstoff im Medium bei der Endpunktbestimmung. Die Differenz von bis zu $0,3 g L^{-1}$ inner-

halb dieser Kultivierungen kann im Wesentlichen durch verschiedene Einflüsse entstehen: zum einen hat, wie später gezeigt wird, die Viabilität der Zellen einen entsprechenden Einfluss auf die Populationsdynamik. Zum anderen können Abweichungen von der Probenahmezeit jeweils am Morgen leichte Unterschiede in der Biotrockenmassekonzentration aufgrund des Sedimentationsverhaltens entstehen, da auch bei Dauerillumination die Zellen einen circadianen Rhythmus entwickeln, wie aus den folgenden Kapiteln ersichtlich wird. Wesentlich größer waren die Unterschiede in der α -Tocopherolproduktion in Abhängigkeit vom Gasvolumenstrom, was aus Abbildung 65 hervorgeht. Bereits in den ersten drei Tagen zeichnete sich ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen in der Produktbildungsgeschwindigkeit ab. War bei den mit 0,20 vvm begasten Kultivierungen eine α -Tocopherolbildungsgeschwindigkeit von maximal 0,2 bis 0,3 mg L⁻¹ d⁻¹ bestimmbar, so erreichten die Satzkultivierungen bei 0,04 vvm Gasvolumenstrom Bildungsgeschwindigkeiten bis zu 0,8 mg L⁻¹ d⁻¹ wobei vornehmlich 0,5 mg L⁻¹ d⁻¹ bestimmt werden konnte. Insgesamt nahm die Konzentration an α -Tocopherol bei Kulturen mit 0,20 vvm Gasvolumenstrom ab dem dritten Tag kaum noch zu – es wurden maximale Konzentrationen von 0,4 bis 0,7 mg L⁻¹ ermittelt. Demgegenüber nahmen die α -Tocopherolkonzentrationen bei Kultivierungen mit 0,04 vvm Gasvolumenstrom bis zur

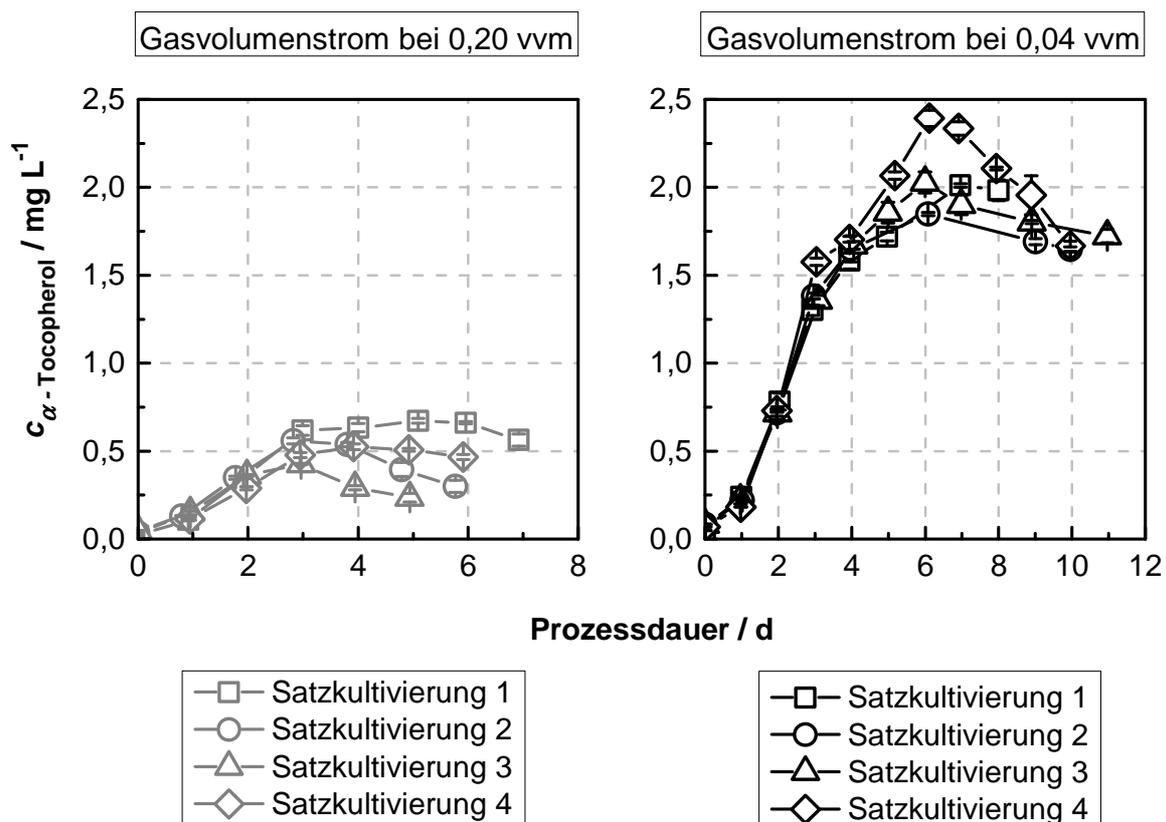


Abbildung 65: Entwicklung der α -Tocopherolkonzentrationen bei Satzkultivierungen von *E. gracilis*-Kulturen mit 5 L EG5.1-Medium bei einem Anfangs-pH-Wert von 3,0 und konstantem beidseitigen Lichtfluss von 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und 29 °C in Abhängigkeit vom Gasvolumenstrom: **links:** 0,20 vvm und **rechts:** 0,04 vvm. Kulturschichtdicke: 5 cm. Der entsprechend angegebene Gasvolumenstrom bestand aus 5 % CO₂ (v/v) und 95 % (v/v) Luft.

Absterbephase der Kulturen zu und erreichten Werte zwischen 1,8 und 2,4 mg L⁻¹. Da Tocopherole als intrazelluläres Antioxidans fungieren, ist ein höherer Bedarf bei einem entsprechenden Scherstress bei zu starker Begasung mit 0,2 vvm denkbar.

Die Paramylonproduktion der zwei Gruppen wies ebenfalls Unterschiede bei den beiden Begasungsströmen auf. Wie aus Abbildung 66 hervorgeht, war bei beiden Gruppen am ersten Tag ein Anstieg des Paramylongehaltes zu verzeichnen, wobei dieses Verhalten bei Kultivierungen mit einem Gasvolumenstrom von 0,20 vvm deutlich ausgeprägter war. Dieses Phänomen wurde bei zahlreichen Kultivierungen in Reaktoren und in Schüttelkolben an den ersten Tagen beobachtet, wobei im Folgenden die Paramylongehalte wieder in etwa auf die Ausgangskonzentrationen sanken. Im Verlauf sanken die spezifischen Konzentrationen bei Kultivierungen mit einem Gasvolumenstrom von 0,20 vvm weiter ab und wiesen ab Tag vier einen leichten Trend zum Anstieg. Zum Ende der Kultivierungen wurden Maxima zwischen 0,07 und

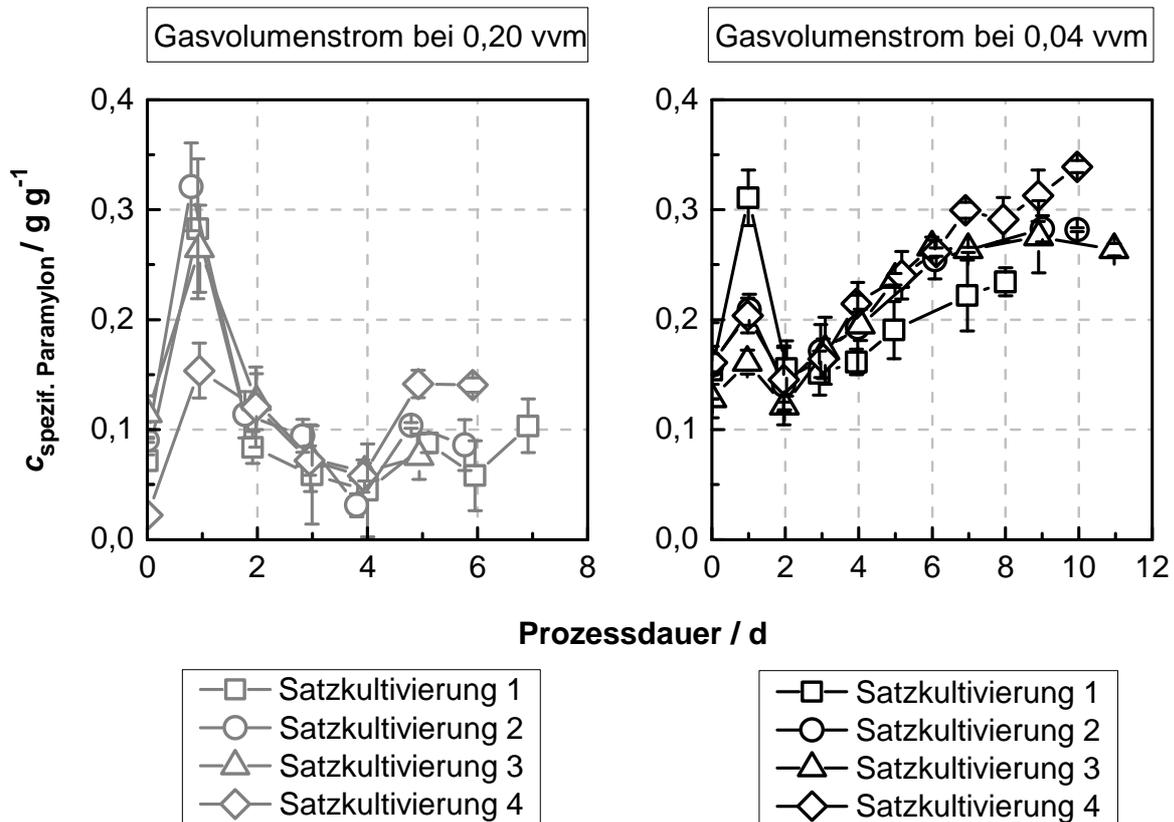


Abbildung 66: Entwicklung der Paramylonselektivitäten bei Satzkultivierungen von *E. gracilis*-Kulturen mit 5 L EG5.1-Medium bei einem Anfangs-pH-Wert von 3,0 und konstantem beidseitigen Lichtfluss von 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und 29 °C in Abhängigkeit vom Gasvolumenstrom: **links:** 0,20 vvm und **rechts:** 0,04 vvm. Kulturschichtdicke: 5 cm. Der entsprechend angegebene Gasvolumenstrom bestand aus 5 % CO₂ (v/v) und 95 % (v/v) Luft.

0,14 g g⁻¹ vorgefunden. Bei Kultivierungen mit Gasvolumenströmen von 0,04 vvm konnte ab dem zweiten Tag eine Akkumulation des Paramylons beobachtet werden. Es wurden Paramylonselektivitäten zwischen 0,24 und 0,34 g g⁻¹ erreicht, welche verglichen mit den Kultivierungen mit einem Gasvolumenstrom von 0,20 vvm nahezu eine Verdopplung der Anteile darstellten. Auch ist bei Kultivierungen mit 0,04 vvm Gasvolumenstrom der Verlauf innerhalb der einzelnen Kultivierungen identischer, was bereits bei der Biotrockenmassekonzentration und der α -Tocopherolkonzentration zu beobachten war. Dieser Trend setzte sich ebenfalls bei den Lipidgehalten fort, was der Abbildung 67 zu entnehmen ist. So war am Tag eins der Kultivierungen bei beiden Gruppen ein hoher Lipidgehalt zu Beginn zu beobachten. Bei Schüttelkolbenkultivierungen wurde ein solch hoher initialer Gehalt am Tag zwei ermittelt, wobei das Probenahmeintervall jeweils zwei Tage umfasste. Zu bemerken ist, dass die Satzkultivierungen im Bioreaktor mit Vorkulturen aus Schüttelkolben inokuliert wurden und im Bioreaktor ersten Kontakt mit Gasbläschen hatten. Die initiale Probenahme erfolgte in der Regel etwa 30 Minuten nach der Inokulation, wenn eine homogene Verteilung der Kultur im Reaktor gewährleistet werden konnte. Im Verlauf sanken bei beiden Gruppen mit 0,20 und 0,04 vvm die Lipidgehalte,

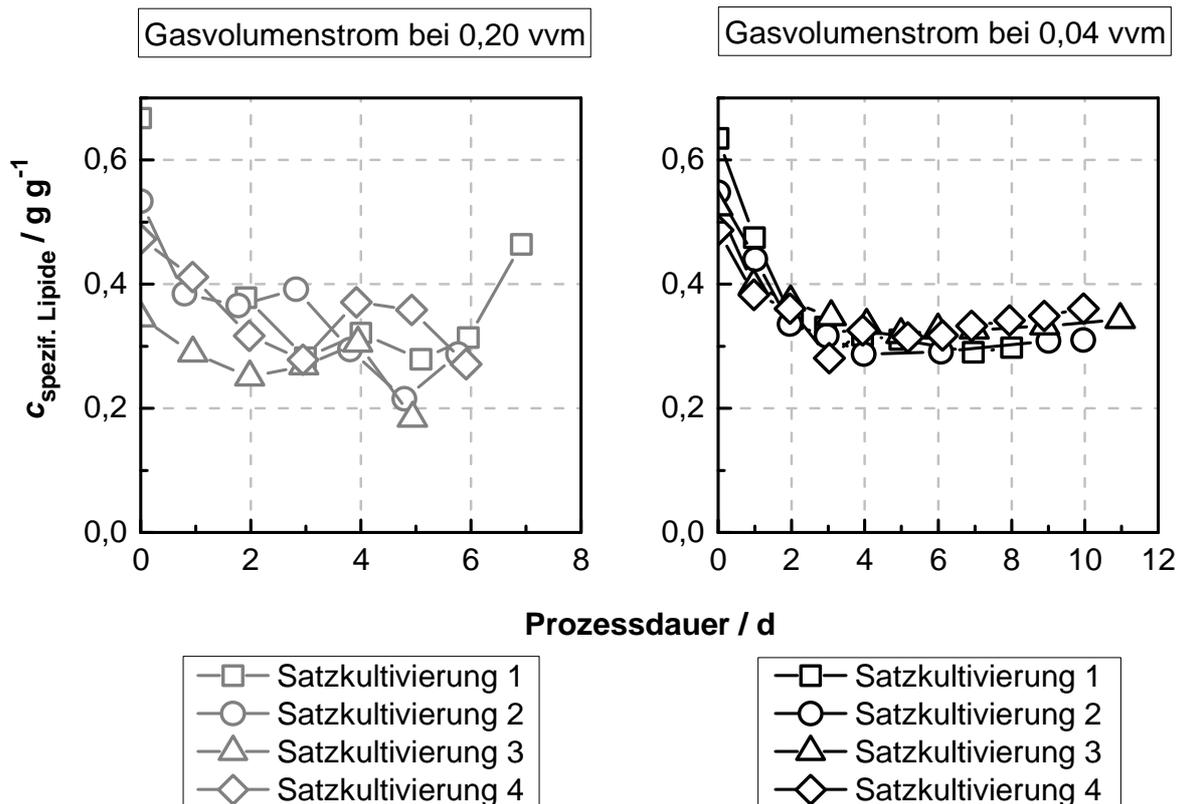


Abbildung 67: Entwicklung der Lipidselektivitäten bei Satzkultivierungen von *E. gracilis*-Kulturen mit 5 L EG5.1-Medium bei einem Anfangs-pH-Wert von 3,0 und konstantem beidseitigen Lichtfluss von 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und 29 °C in Abhängigkeit vom Gasvolumenstrom: **links:** 0,20 vvm und **rechts:** 0,04 vvm. Kulturschichtdicke: 5 cm. Der entsprechend angegebene Gasvolumenstrom bestand aus 5 % CO₂ (v/v) und 95 % (v/v) Luft.

wobei die Kultivierungen bei 0,20 vvm nicht reproduzierbare Werte bezüglich der spezifischen Mengen lieferten. Nur schwer ist hier in der Abbildung eine Akkumulation der Lipide ab dem dritten bis vierten Tag erkennbar, wenn auch zum Ende der Kultivierungen bei zwei Kulturen ein sinkender Verlauf vom Gehalt festgestellt wurde. Die Kultivierungen wiesen zum Ende Selektivitäten von 0,18 bis 0,46 g g⁻¹ auf. Das inhomogene Bild ist höchstwahrscheinlich mit einem massiven Absterben der Zellen zu erklären, wobei bei Zellzählungen mikroskopisch tote Zellen mit intakter Zellstruktur zu erkennen waren und stark zerstörte/zerfetzte Zellen mit zerrissener Zellstruktur. Je nachdem, welcher Zustand dominierte, konnten Lipide akkumulieren oder waren nicht mehr mit der Zellernte zu erfassen. Allgemein betrachtet spricht vor Allem die höhere Viabilität der Zellen für die besseren Ergebnisse bei geringeren Begasungen mit 0,04 vvm, welche der Abbildung 68 zu entnehmen sind. Es wird schnell deutlich, dass bei höheren Gasvolumenströmen die Zellviabilität wesentlich schneller sinkt und so im Zusammenhang mit der zunehmenden Nährstofflimitation die Biomassebildung zunehmend ausbremst. Dabei liefert die Pellikula der Zellen wahrscheinlich nicht genug Schutz vor Scherkräften, wie es bei Organismen mit einer Zellwand der Fall ist.

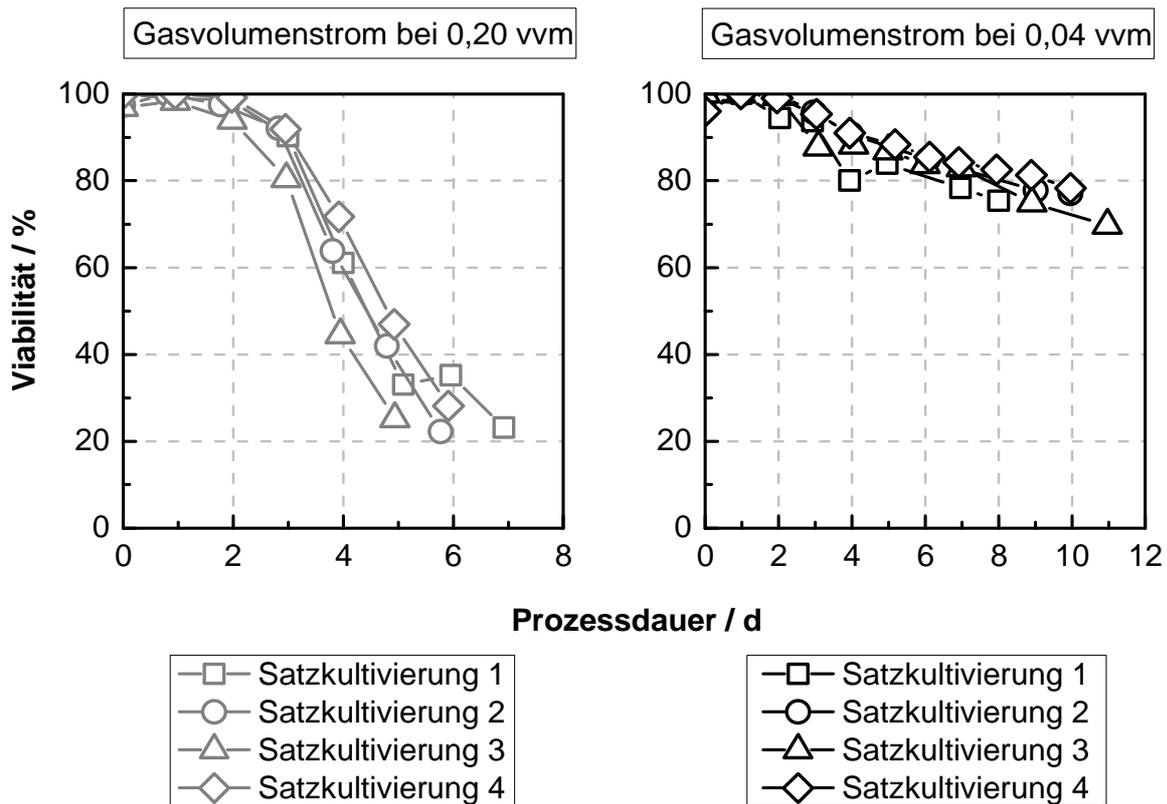


Abbildung 68: Entwicklung der Viabilitäten der Zellen bei Satzkultivierungen von *E. gracilis*-Kulturen mit 5 L EG5.1-Medium bei einem Anfangs-pH-Wert von 3,0 und konstantem beidseitigen Lichtfluss von 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und 29 °C in Abhängigkeit vom Gasvolumenstrom: **links:** 0,20 vvm und **rechts:** 0,04 vvm. Kulturschichtdicke: 5 cm. Der entsprechend angegebene Gasvolumenstrom bestand aus 5 % CO₂ (v/v) und 95 % (v/v) Luft.

4.8 Photoautotrophe kontinuierliche Kultivierungen im Flachplattenreaktor

Kontinuierliche Kultivierungen von *E. gracilis* unter rein photoautotrophen Bedingungen sind in der Literatur erwähnt, jedoch in nur sehr geringem Maße beschrieben [Cramer und Myers, 1952]. Cook [1968] demonstrierte in einem selbst konstruierten System mit konstanter Schichtdicke das Wachstum von *E. gracilis* im stationären Zustand nach einer Einlaufphase über rund zehn Tage. Innerhalb dieser zehn Tage mit stationärem Betrieb wurden sowohl konstante Werte für die Zellzahlen, als auch für die Protein-, RNA- und Paramylonanteile pro Zelle ermittelt. Kontinuierliche Kultivierungen mit unterschiedlichen hydraulischen Verweilzeiten und dem CM-Medium für photoautotrophes Wachstum wurde von Chae und Kollegen [2006] beschrieben. Hierbei wurde Rauchgas als CO₂-Quelle mit einem Volumenanteil von 10 bis 11 % eingesetzt. Die beidseitig mit Leuchtstoffröhren illuminierte hohe Schichtdicke von 20 cm mit einem Lichtfluss von 490 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ des in dieser Publikation eingesetzten Reaktors bedingte im Schnitt relativ geringe Biotrockenmassekonzentrationen von rund 0,7 g L⁻¹ bei den täglichen Probenahmen. Diese Ergebnisse wurden bei Raumzeiten von acht bis zehn Tagen und einem Arbeitsvolumen von 1 m³ erreicht [Chae *et al.*, 2006].

In dieser Arbeit wurde zunächst bei einer instationären kontinuierlichen Kultivierung ein Augenmerk auf die Prozessstabilität hinsichtlich des neu entwickelten EG5.1-Mediums gelegt. So wurde beobachtet, wie stark der Einfluss auf die Biotrockenmassekonzentration der Kultur bei schwankender Temperatur und Zulaufgeschwindigkeit des Mediums war. Im Weiteren wurde beobachtet, welche technischen Probleme entstehen können, wenn ein Reaktor über einen längeren Zeitraum ohne Reinigung mit einer *E. gracilis*-Kultur betrieben wird. Nach über 120 Tagen Kultivierungsdauer zeigte die Kultur keinerlei Ausbleichungseffekte oder andere Phänomene, womit sich der Organismus durchaus für langwierige Prozesse in einer nicht natürlichen Umgebung als sehr geeignet herausstellte. Der Reaktor wurde in der Betriebszeit mehrmals geöffnet, was keinerlei Auswirkungen auf den axenischen Zustand der Kultur zeigte. Der durchschnittliche pH-Wert von 2,5 im Prozess sowie die strikt autotrophe Auslegung der Medienkomponenten trugen dazu bei die Kontaminationsanfälligkeit im Betrieb gering zu halten. Ein Problem bei derart langen Betriebszeiten stellte die Abluft dar, die trotz Abluftkühlung zunehmend mit Biomasse und Paramylon zugesetzt wurde. Eine mögliche Lösung des Problems in großen Anlagen wäre die Wahl von ausreichend dicken Rohren oder eine teilweise Spülung im kritischen Bereich unmittelbar am Reaktor. So könnte bei einer repetitiven Kultivierung – wie später beschrieben wird – das Frischmedium über ein T-Ventil durch die Abluftstrecke gepumpt werden, wenn für diese Zeit die Begasung deaktiviert wird. Ein positiver Nebeneffekt wäre zudem die Einsparung von Rohrmaterial. Die Kultivierungsparameter und -ergebnisse der instationären kontinuierlichen Kultivierung werden hier nicht weiter im Detail erörtert, können aber im Anhang unter Abschnitt 7.1 betrachtet werden.

Für die Bestimmung weiterer Parameter des Kultivierungsprozesses bei Tageslichtbedingungen wurde eine Kultivierung mit beidseitiger Illumination bei einem Lichtfluss von je $1250 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ durchgeführt. In der Summe entsprach dies einem Sonnenlicht zur Mittagszeit mit wolkenfreiem Himmel. Die beidseitige Illumination erlaubte einheitliche Lichtbedingungen, wobei das Licht von jeder Seite rund 2,5 cm durchdringen musste, um von dem eigens konstruierten Photosensor detektiert zu werden. Der Zulauf vom Frischmedium (pH 3,0) erfolgte seitlich in der Mitte der Reaktorhöhe, während der Ablauf ansaugend über ein Rohr von oben installiert war. Das Rohr endete auf der Höhe, bei der das Arbeitsvolumen des Reaktors bei 5,0 L lag. Die Kultivierung erfolgte mit kontinuierlicher Illumination zur Ermittlung von maximalen Selektivitäten und Produktivitäten für Biomasse, α -Tocopherol, Paramylon und Lipide ohne Tag/Nacht-Rhythmus. Weiterhin wurde ein Augenmerk auf Prozessparameter gelegt, die sich zur Beschreibung des aktuellen Zustandes der Kultur im Reaktor eignen. Diese kontinuierliche Kultivierung über 73 Tage ist in den folgenden Abbildungen 69 und 70 dargestellt. Nach einer Satzphase von sechs Tagen wurde der Zu- und Ablauf zunächst mit einer Verdünnungsgeschwindigkeit von $0,73 \text{ d}^{-1}$ gestartet und anschließend stufenweise abgesenkt, bis sich eine Akkumulation der Zellen und Produkte über mehr als sechs Tage eingestellt hat. Anschließend wurde die Raumgeschwindigkeit in kleinen Schritten erhöht, bis die Biotrockenmassekonzentration einen relativ konstanten Verlauf mit geringer Abweichung aufwies. So wurden von Tag 25 bis 73 bei einer Raumgeschwindigkeit von $0,43$ bis $0,47 \text{ d}^{-1}$ volumetrische Biotrockenmassekonzentrationen im Bereich von $1,8$ bis $2,2 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Die spezifische α -Tocopherolkonzentration bewegte sich bereits ab Tag 20 im Bereich von $2,5$ und $3,9 \text{ mg L}^{-1}$ bzw. spezifisch um $2,2$ und $2,7 \text{ mg g}^{-1}$ und lieferte überproportional hohe Werte, wenn die Biotrockenmassekonzentration ebenfalls hoch war. Diesen Effekt konnte man auch bei Satzkultivierungen beobachten, wenn die Kultur bedingt durch ihre Dichte und der Lichtlimitierung das Maximum in der Biotrockenmassekonzentration erreichte und nochmals einen Anstieg in der α -Tocopherolkonzentration nach sich zog. Die Hintergründe hierzu wurden bereits erwähnt. Eine Ausnahme jedoch lag zwischen Tag 63 und 65 vor, wo bei sinkenden Biotrockenmassekonzentration steigende spezifische α -Tocopherolkonzentration ermittelt wurden. Die Ursache konnte nicht spezifiziert werden. Die Lipid- und Paramylonkonzentrationen hingegen wiesen stabile Werte mit leichten Schwankungen erst ab Tag 30 auf und beliefen sich bei Paramylon auf $0,7$ bis $1,0 \text{ g L}^{-1}$ und bei den Lipiden auf $0,5$ bis $0,8 \text{ g L}^{-1}$. Die Schwankungen der Werte ergaben sich durch verschiedene Einflüsse. Zum einen wurde der Vorratsbehälter für den Zulauf etwa alle 10 Tage gewechselt. Trotz baugleicher Behälter und identischer Schlauchanbindung musste bei jedem Wechsel die Geschwindigkeit über die Pumpe in der Regel geringfügig korrigiert werden, um einen konstanten Zufluss zu erhalten. Zum anderen erfolgten die Probenahmen in den meisten Fällen nachmittags, wurde jedoch auch einige Male morgens oder abends durchgeführt. Da auch kontinuierlich illuminierte Kulturen einen circadianen Rhythmus

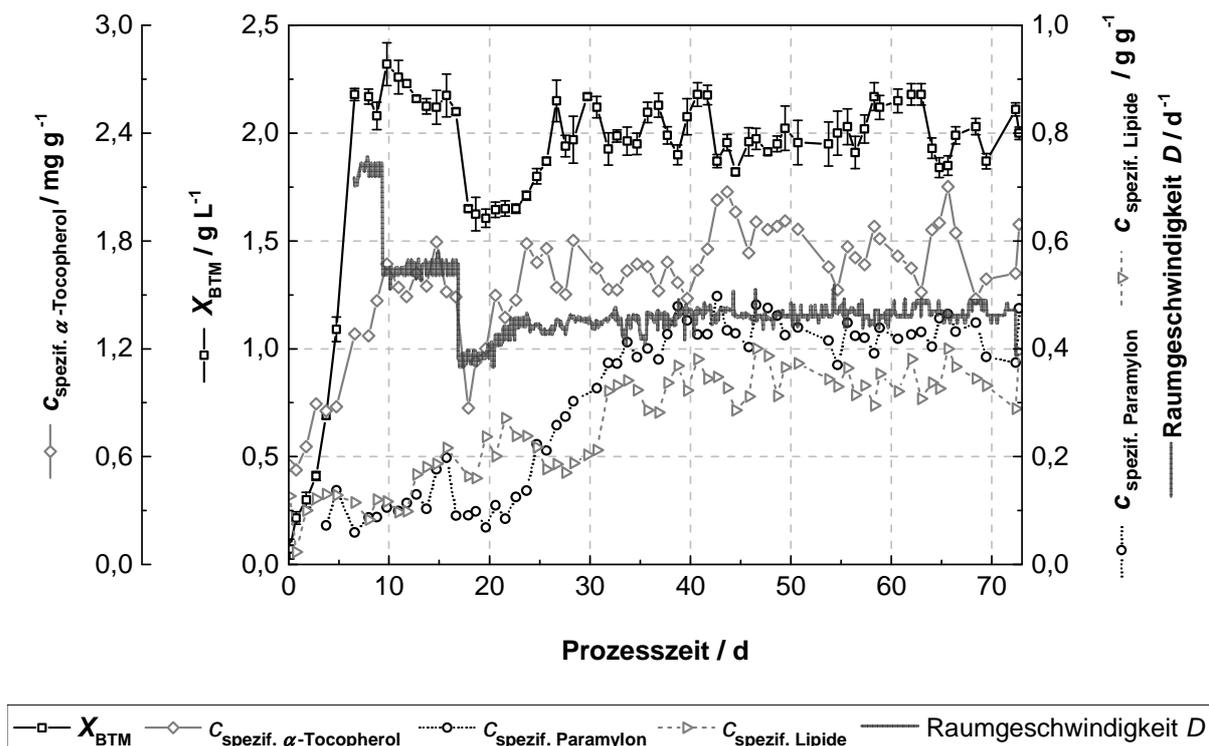


Abbildung 69: Verlauf verschiedener gemessener Parameter einer kontinuierlichen, photoautotrophen Kultivierung von *E. gracilis* mit konstantem Volumen von 5 L EG5.1-Medium. Der Anfangs-pH-Wert sowie der pH-Wert vom Zulauf lagen bei pH 3,0. Der Lichtfluss lag beidseitig bei $1250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, die Kulturschichtdicke bei 5 cm und die Temperatur bei 29°C . Der Gasvolumenstrom mit 5 % CO_2 (v/v) und 95 % (v/v) Luft lag bei 0,04 vvm.

ausbilden, nach dem sich beispielsweise die Teilung der Zellen richtet, kann dieses Unterschiede in der Zellzusammensetzung hervorrufen [Brinkmann 1966; Yee und Bartholomew, 1988]. Dementsprechend bedingt die Probenahme zu verschiedenen Tageszeiten mögliche Schwankungen, die sich sogar in der Biotrockenmassekonzentration niederschlagen, da bei der circadianen Rhythmik der Zellen tageszeitlich bedingt ein Maximum an Agilität oder im Absetzverhalten vorzufinden ist [Terry und Leland, 1970]. Insofern ist mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass ab Tag 30 ein nahezu stationärer Zustand des Prozesses erreicht wurde. Werden die Ergebnisse aus Sicht der volumetrischen Produktivitäten betrachtet, so wird deutlich, dass ab Tag 40 für die Biotrockenmasse, das α -Tocopherol, die Lipide und das Paramylon die Werte um einen Mittelwert schwankten, was aus Abbildung 70 ersichtlich wird. So ergaben sich ab Tag 40 folgende Mittelwerte bei einer mittleren Raumgeschwindigkeit von $0,46 \text{ d}^{-1}$: eine Biotrockenmasseproduktivität von $0,93 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, eine α -Tocopherolproduktivität von $1,66 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, eine Paramylonproduktivität von $0,40 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und eine Lipidproduktivität von $0,32 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Generell wird deutlich, dass die Produktivitäten von α -Tocopherol, Paramylon und den Lipiden Maximalwerte annahmen, wenn die Biotrockenmasseproduktivität Höchstwerte von $1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreichte, wie bei Tag 40 bis 42. Umgekehrt wurden entsprechend Mini-

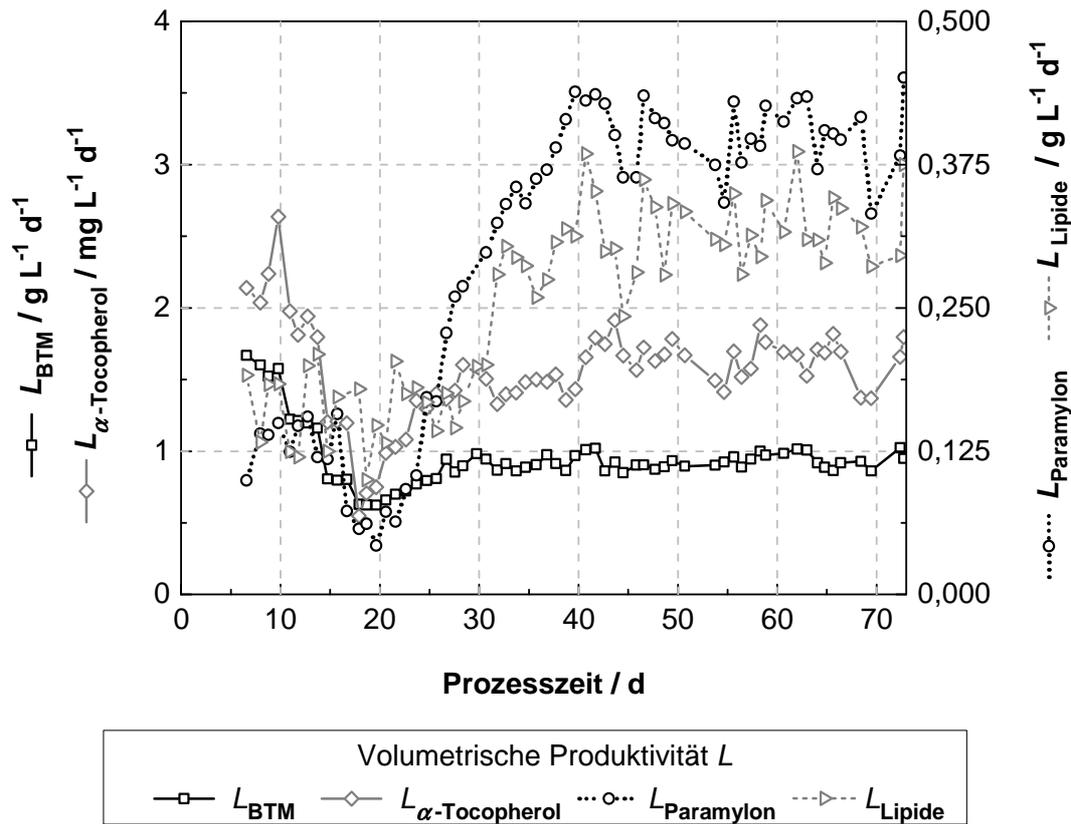


Abbildung 70: Verlauf der Produktivitäten einer kontinuierlichen, photoautotrophen Kultivierung von *E. gracilis* mit konstantem Volumen von 5 L EG5.1-Medium. Der Anfangs-pH-Wert sowie der pH-Wert vom Zulauf lagen bei pH 3,0. Der Lichtfluss lag beidseitig bei $1250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, die Kulturschichtdicke bei 5 cm und die Temperatur bei 29 °C. Der Gasvolumenstrom mit 5 % CO_2 (v/v) und 95 % (v/v) Luft lag bei 0,04 vvm.

malwerte bei geringen Biotrockenmasseproduktivitäten erreicht, wobei hier die Lipide und zum Teil auch das Paramylon von den Werten her sehr deutlich im Vergleich zu α -Tocopherol sanken. Vergleichsweise wurden im Kubikmeter-Maßstab, wie oben beschrieben, mit hydraulischen Verweilzeiten von acht bis zehn Tagen tägliche Biotrockenmassekonzentrationen zwischen 0,8 und 0,9 g L^{-1} beschrieben. Die geringsten von Chae und Mitwirkenden untersuchten Verweilzeiten von drei Tagen ergaben tägliche Biotrockenmassekonzentrationen von 0,4 bis 0,5 g L^{-1} . Bei der in Abbildung 69 und 70 dargestellten Kultivierung wurden ab Tag 30 Raumzeiten von bis zu zwei Tagen ermittelt. Die hier erzielte deutlich höhere Biotrockenmassekonzentration war hauptsächlich der geringeren Schichtdicke der Kultur geschuldet, welche beim Flachplattenreaktor bei 5 cm und bei Versuchen von Chae und Kollegen bei 20 cm lag [Chae *et al.*, 2006]. Weiterhin wird – verglichen mit den eigenen Experimenten mit Schüttelkolbenkultivierungen bei verschiedenen Lichtflüssen und 1 cm Schichtdicke – klar, dass die Ergebnisse vom Flachplattenreaktor hier hinsichtlich der Selektivitäten hohe Werte ergaben. So sind die Selektivitäten für Paramylon ähnlich, wie sie bei Schüttelkolbenkultivierungen unter starken Lichtflüssen ab Tag acht der Kultivierungen erreichen wurden. Dieser schon zuvor als optimaler Produktionsbereich beschriebene Punkt wurde auch angestrebt, um durch die eintretende

Lichtlimitierung und Photoakklimation der Zellen die α -Tocopherol- und Lipidausbeute zu erhöhen sowie durch die geringe Stickstoffkonzentration im Medium die Paramylonproduktion zu fördern. Bei der gebildeten Lipidfraktion der kontinuierlichen Kultivierung wurden ähnliche Selektivitäten erreicht, wie von Tag vier bis sechs der Schüttelkolbenkultivierungen mit verschiedenen Lichtflüssen und 1 cm Schichtdicke. Auch bei der spezifischen α -Tocopherolkonzentration können Parallelen in Bezug auf Werte bei den Schüttelkolbenkultivierungen bei verschiedenen Lichtflüssen und verschiedenen Zeiten abhängig von der Biomasseentwicklung gezogen werden.

Da es für das Bioraffineriekonzept vorgesehen ist Kohlenstoffdioxid als C-Quelle – beispielsweise aus Rauchgasen – einzusetzen wäre es von großem Interesse, wieviel Kohlenstoffdioxid durch die gebildete Biomasse tatsächlich assimiliert wurde. Das *E. gracilis* Rauchgase als C-Quelle verwenden kann und Konzentrationen von 26 ppm Stickoxide (NO_x) toleriert, haben Chae und Kollegen bei kontinuierlichen Kultivierungen bewiesen [Chae *et al.*, 2006]. Hinsichtlich des Kohlenstoffdioxidkonsums von Mikroalgen wurde ein Verbrauch von $1,83 \text{ kg kg}^{-1}$ Biomasse stöchiometrisch errechnet, sofern von einem Kohlenstoffgehalt von ca. 50 % ausgegangen wird. Sofern die Mikroalgen stark kohlenstoffhaltige Produkte akkumulieren, was bei *E. gracilis* zutrifft, steigt der CO_2 -Konsum auf 2 kg CO_2 pro kg Biomasse an [Sastre und Posten, 2010]. Wenn das täglich verbrauchte Volumen reinen CO_2 – errechnet aus dem kalibrierten Volumenstrom vom CO_2 -Durchflussregler und der Abgasanalytik unter der Annahme einer Volumenkonstanz und das ideale Gasgesetz angewendet wird ($p V = n R T$), ergibt sich dann mit dem Molekulargewicht von CO_2 ein Verbrauch von $2,04$ bis $2,35 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bei einer Biomasseproduktivität von rund $1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ im Kultivierungszeitraum von Tag 30 bis 73. Dieser Wert liefert aufgrund von vielen Annahmen, wie dem idealen Gaszustand, nur eine Abschätzung. Weiterhin wurde angenommen, dass sich das Gas in der Mischstrecke an die Temperatur der Örtlichkeit angleicht und der Druck im Reaktor dem Druck vor dem Sintermetallrohr zur Begasung entspricht. Trotzdem wird der angegebene Wert von Rosello Sastre und Posten mit der eigenen Abschätzung gut bestätigt. Die ermittelten Verbrauchswerte sind unter anderem in der folgenden Abbildung 71 gemeinsam mit der Biotrockenmassekonzentration wiedergegeben. Die weiteren Werte stellen Prozesswerte als mögliche Kandidaten zur Verfolgung der Biomasseentwicklung bzw. des Wachstums im zukünftigen technischen Maßstab dar. Hier ist zunächst der pH-Wert zu nennen, da die permanente Ansäuerung des Mediums einen eindeutigen Hinweis für das Wachstum von *E. gracilis* bietet, da Ionen wie Ammonium oder Sulfat dem Medium entzogen werden. Der pH-Wert im Zulauf lag bei pH 3,0 während sich im Ablauf zunehmend ein pH um $2,1 \pm 0,1$ (bei $D = 0,47 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$) eingestellt hatte, womit sich der Prozess ab Tag 20 nahezu pH-auxostationär verhielt. Allerdings stellt der Arbeitsbereich konventioneller Prozesselektroden um pH 2,0 ein Problem in Bezug auf die einwandfreie Funktionalität dar. Deshalb wurde in den Abbildungen oftmals der *offline* pH aufgetragen, während die *online* pH-

Werte lediglich verwendet wurden, um den tageszeitlichen Trend und somit vorhandenes Wachstum oder kein Wachstum zu bewerten. In der Laborpraxis ergab sich damit insgesamt ein nützliches und wenig anfälliges „Werkzeug“. In Satzkultivierungen bietet der Verlauf des pH-Werts in der Regel ein leicht versetztes antiproportionales Abbild bezüglich der Werte zur Biotrockenmassekonzentration. In Satzkultivierungen wurde deutlich, dass die Zellen offensichtlich die entsprechenden Ionen intrazellulär akkumulierten und die Biotrockenmassekonzentrationen konstante Werte in der Stationärphase annahmen, nachdem die pH-Werte schon ein bis drei Tage zuvor stationär wurden. Ebenfalls antiproportionale Signale zum Verlauf der Biotrockenmassekonzentration mit leichten Abweichungen konnten sowohl mit Hilfe der Photodiode, als auch dem CO₂-Signal aus der Abluft ermittelt werden. Beide zeigen robuste Werte, wenn auch manche Schwankungen in der Biomasse nicht direkt als Reaktion im Signal der Photodiode oder dem CO₂-Signal der Abluft wiedergefunden werden konnten. Interessanterweise ließen sich bei höherer Auflösung der Skalierungen sogar periodisch wiederkehrende, Tageszeit bedingte Schwankungen beider Signale beobachten, was ein Hinweis auf einen recht synchronen Circadianrhythmus der Population gibt. Zu erwähnen ist, dass beide Signale als *online* Trend zum Verlauf der Biomasseentwicklung durchaus verwendbar sind. Die Sensorik ist wartungsarm und benötigt keine ständige Kalibrierung. Die Photodiode kann um eine weitere Diode ergänzt werden, welche zusätzlich das tägliche Sonnenlicht ohne Kulturab-

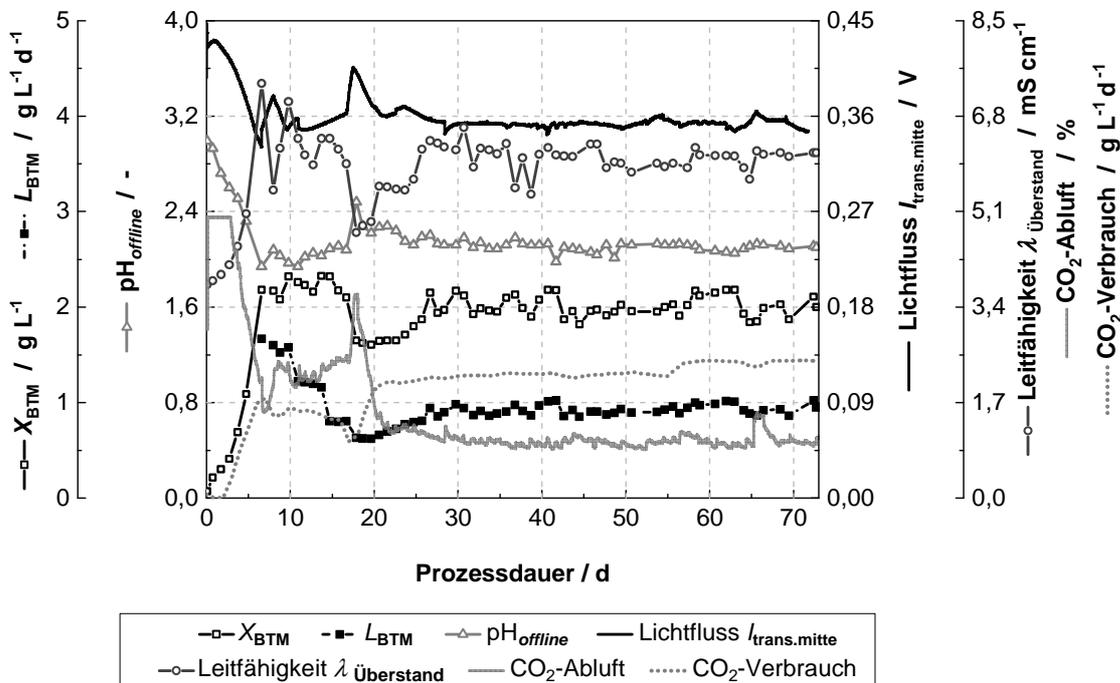


Abbildung 71: Darstellung verschiedener Verläufe von Parametern einer kontinuierlichen, photoautotrophen Kultivierung von *E. gracilis* mit konstantem Volumen von 5 L EG5.1-Medium. Der AnfangspH-Wert sowie der pH-Wert vom Zulauf lagen bei pH 3,0. Der Lichtfluss lag beidseitig bei 1250 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$, die Kulturschichtdicke bei 5 cm und die Temperatur bei 29 °C. Der Gasvolumenstrom mit 5 % CO₂ (v/v) und 95 % (v/v) Luft lag bei 0,04 vvm.

schattung aufnimmt. So könnte bei einem charakterisierten System der Quotient beider Werte einem Tageslichtstärke-unabhängigen Wert ergeben. Ebenfalls kann der CO₂-Wert der Abluft zusammen mit der Temperatur und dem Volumenstrom von CO₂-haltigem Gas ein zur Biotrockenmassekonzentration proportionalen Wert des CO₂-Verbrauchs zur Abschätzung der Biomasseentwicklung bieten. Ein ebenfalls verwertbares und der Biotrockenmassekonzentration proportionales Signal liefert die Leitfähigkeit des zellfreien Mediums aus dem Erntestrom. Nachteilig ist hier jedoch, dass das Medium von den Zellen abgetrennt werden muss, sofern keine Möglichkeit einer *online*-Lösung mit entsprechenden Sieb- oder Membrantrennung vorliegt. Die Leitfähigkeit der Kulturbrühe ist zur Abschätzung des Prozesses wenig dienlich, da mit steigender Zelldichte ein Isoliereffekt durch die Zellen entsteht, der nicht proportional zu der steigenden Leitfähigkeit des zellfreien Mediums steht, in das die Zellen leitfähige Substanzen abgeben. Auch die Kombination beider Parameter in unterschiedlichen mathematischen Kombinationen war wenig hilfreich (Daten nicht gezeigt). Eine *inline* Leitfähigkeitsmessung konnte ebenso kaum genutzt werden, da wie bei der Trübungsmessung ein Bewachsen des Sensors mit der Kultur (Biofilm) festgestellt worden ist.

4.9 Kultivierungen mit circadianem Rhythmus

Das Bioraffineriekonzept soll Kultivierungen in Freiland-Photobioreaktoren ermöglichen. Durch den Tag/Nacht Rhythmus ist mit einer Minimierung der bislang ermittelten Produktivitäten im photoautotrophen Kultivierungsmodus zu rechnen, da nur das Tageslicht für die Zellen zur Generierung der Energie zur Verfügung steht. Die Besonderheiten der circadianen Rhythmik wurden bei *E. gracilis* bereits ausführlich untersucht. So wurden bislang bei Kulturen Effekte des circadianen Rhythmus, wie Phototaxis, Dunkelbeweglichkeit, nächtliches Absetzverhalten, nächtliches Abwerfen der Geißel oder die nächtliche Zellteilung beachtet [Brinkmann 1966; Cook 1966; Schnabel 1968a; Schnabel 1968b; Yee *et al.*, 1988; Lebert *et al.*, 1999]. Es existieren jedoch keine Daten in der Fachliteratur, die das Verhalten von *E. gracilis* in diesem Zusammenhang mit dem Sauerstoff- bzw. Kohlenstoffdioxidverbrauch oder der Sauerstoffsynthese mit *online* gemessenen Werten beschreiben. Bei den im Folgenden beschriebenen Kultivierungen wurden lediglich Tag/Nacht-Zyklen eingeführt, wobei morgens und abends halbstündliche Dämmerungszeiten bei halben Lichtfluss des Tageszeitlichtflusses simuliert wurden. Diese Änderung stellt den wichtigsten Parameter dar, weil eine vollkommen andere Dynamik der Population in der Kultur entsteht [Brinkmann 1966; Schnabel 1968a]. Temperaturverläufe wurden bei den in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen nicht simuliert. Es wurde bereits gezeigt, dass nächtlich bedingte niedrigere Temperaturen im Vergleich zum Tagesverlauf im Freiland einen günstigen Effekt für eine Ernte der Biomasse bei Nacht ergäben. Terry und Leland [1970] demonstrierten hierzu ein verstärktes Absetzverhalten von *E. gracilis*

bei Kultivierungen mit einem Temperaturzyklus von 18/25 °C im Rhythmus von 12/12 h. Abgesehen einer geringeren spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit bei geringeren Temperaturen als dem Optimum [Cook und Li, 1973; Jones und Cook, 1978; Kitaya *et al.*, 2005] hätten geringere Temperaturen auch positive Effekte, wie höhere Paramylonanteile [Kawabata *et al.*, 1982; Kawabata und Kaneyama, 1989], sowie höhere spezifische α -Tocopherol- und Lipidkonzentrationen [Ruggeri *et al.*, 1985]. Die folgenden Kultivierungen wurden in einem Hell/Dunkel-Rhythmus von 14:10 Stunden durchgeführt, wobei die entsprechenden Phasen an den realen Tagesverlauf angepasst wurden, um kein Störlicht bei den Kultivierungen zuzulassen. Bereits relativ schwache Intensitäten von 1000 lux, was über die Umrechnung nach McCree [1981] einem Lichtfluss von $55,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entspräche, können bei einer Dauer von zwei Stunden eine Störung des Rhythmus hervorrufen [Schnabel 1968b]. So wurde darauf geachtet, dass die Räumlichkeiten, in denen die Kultivierungen stattfanden, nach 22 Uhr ebenfalls nicht beleuchtet waren. Weiterhin wurden für die Kultivierungen kontinuierlich illuminierte Vorkulturen verwendet, da bekannt ist, dass sich *E. gracilis* innerhalb von ein bis zwei Tagen auf den jeweiligen Hell/Dunkel-Stimulus hinsichtlich ihrer circadianen Rhythmik optimal einstellt [Brinkmann 1966, Schnabel 1968a]. Durch diesen Vorteil einer schnellen Adaption konnten Vorkulturen gleicher Qualität verwendet werden, ohne das während der Inokulationsphase eventuelle Störgrößen die Kultur beeinträchtigen, zumal zur Inokulation Kulturen in einer frühen Wachstumsphase verwendet wurden.

4.9.1 Satzkultivierungen mit circadianem Rhythmus 14:10 h

Bei den Satzkultivierungen wurde im Allgemeinen auf das Verhalten von *E. gracilis* im circadianem Rhythmus geachtet. Sofern ein Zusammenhang mit Ergebnissen aus vorhandener Literatur besteht, so sollte sich beispielsweise beim Zellzyklus mit nächtlichen Teilungen dies auch mit einer starken Zellatmung am pO_2 -Signal (theoretisch) bemerkbar machen. Derartige Beobachtungen zum O_2 -Verbrauch sind nicht in der Fachliteratur zu finden. In den folgenden Abbildungen 72 bis 74 ist eine Satzkultivierung im EG5.1-Medium mit reduziertem Vitamin Gehalt (vgl. Abschnitt 4.5.4) über zehn Tage bei beidseitiger Illumination mit je $850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dargestellt. In Abbildung 72 sind die Ergebnisse der Biotrockenmassekonzentration und der Selektivitäten bezüglich α -Tocopherol, Paramylon und den Lipiden präsentiert. Mit der Darstellung der spezifischen Konzentrationen wird deutlich, dass sich die biomassebezogenen Mengen der beobachteten Stoffe abhängig vom Biorhythmus änderten, während sich die Biotrockenmassekonzentration aufgrund des Sedimentationsverhaltens im Reaktor änderte. Erwartungsgemäß verlief die Biomassebildung entsprechend langsamer, als bei kontinuierlich illuminierten Kulturen und erreichte am Tag acht ihr Maximum mit $1,1 \text{ g L}^{-1}$, was in etwa der Hälfte der Biotrockenmassekonzentration verglichen mit dauerhaft beleuchteten Kulturen unter sonst gleichen Bedingungen im Flachplattenphotobioreaktor entsprach.

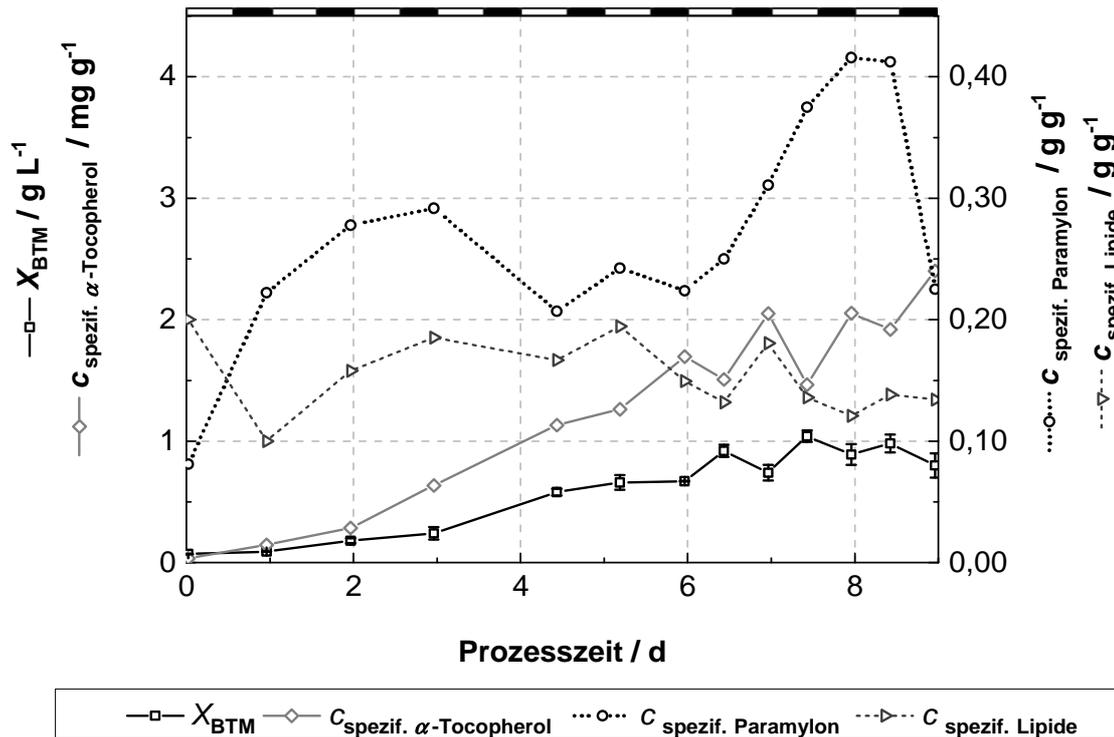


Abbildung 72: Verlauf verschiedener gemessener Parameter einer Satzkultivierung von *E. gracilis* mit circadianem Rhythmus im EG5.1-Medium bei pH 3,0 zu Beginn. Der Lichtfluss der Lichtperioden lag bei $850 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ mit Hell-/Dunkelphasen von 14/10 h und jeweils halbstündlichen Dämmerungsphasen bei halben Lichtfluss. Die Kulturschichtdicke lag bei 5 cm und die Temperatur bei 29 °C. Der Gasvolumenstrom mit 5 % CO₂ (v/v) und 95 % (v/v) Luft lag bei 0,04 vvm. Der alternierend weiß-schwarze Balken oberhalb des Diagramms verdeutlicht die Hell- und Dunkelphasen.

Ab dem sechsten Tag wurden morgens und abends jeweils zwei Stunden nach Beginn oder vor dem Ende der Illumination Proben entnommen. Aus diesem Grund ist bei den Werten – insbesondere bei der Biotrockenmassekonzentration aber auch bei der spezifischen α -Tocopherolkonzentration ein deutliches Wellenmuster zu erkennen, nachdem sich die Population auf den Tag/Nacht-Rhythmus eingestellt hatte. So war morgens stets eine geringere Biotrockenmassekonzentration zu verzeichnen als abends. Beim α -Tocopherol ist wiederum unerwarteter Weise ein der Biotrockenmassekonzentration umgekehrtes Verhalten festgestellt worden. Beim Paramylon und bei den Lipiden sind derartige Schwankungen nicht zu identifizieren – diese spezifischen Konzentrationen stiegen mit der Kultivierungsdauer an. Die Lipide erreichten am Tag fünf eine maximale Selektivität von rund $0,2 g g^{-1}$ beziehungsweise eine Konzentration von $0,14 g L^{-1}$ und zeigten nach Tag fünf einen zunehmend sinkenden Trend auf ein Minimum von $0,11 g g^{-1}$. Betrachtet man bei den Probenahmen am Morgen und Abend nur die Lipid-Konzentrationen, so wird ebenfalls ein schwaches Wellenverhalten deutlich mit $0,10/0,12 g L^{-1}$, $0,13/0,14 g L^{-1}$, $0,09/0,11 g L^{-1}$, $0,10/0,11 g L^{-1}$ und $0,10/0,11 g L^{-1}$. Ein ähnlicher Trend ist bei den Ergebnissen der spezifischen Paramylonkonzentrationen zu erkennen. In

Abbildung 72 ist zunächst ein leichter Anstieg zu erkennen, worauf ein Absinken der Werte um Tag vier folgte. Sobald die Kultur in die stationäre Phase eintrat, akkumulierte das Paramylon und erreichte eine maximale spezifische Konzentration von $0,42 \text{ g g}^{-1}$. Werden die Paramylonkonzentrationen ab Tag sechs mit Probenahmen am Morgen/Abend betrachtet, so ergibt sich ebenfalls ein wellenartiges Verhalten: $0,15/0,23 \text{ g L}^{-1}$, $0,23/0,39 \text{ g L}^{-1}$, $0,37/0,40 \text{ g L}^{-1}$, $0,18/0,24 \text{ g L}^{-1}$ und $0,16/0,17 \text{ g L}^{-1}$. Somit ergeben sich für die Biomasse, das Paramylon und die Lipide nachvollziehbare Werte für eine Kultur, deren Zellen sich nachts teilen. Das Paramylon als zellulärer Reservespeicher muss über Nacht die Energie für die Zellteilung liefern und wird tagsüber wieder entsprechend aufgebaut, sofern genügend Ressourcen zur Verfügung stehen. Identische Ergebnisse erhielt auch Cook [1966] bei photoautotrophen Kulturen mit circadianem Rhythmus im CM-Medium. Bei den Lipiden wiederum läge die Vermutung nahe, dass diese auch bei Zellteilung hinsichtlich der Gesamtkonzentration identische Werte über den Verlauf von 24 Stunden aufweisen und eher bei der Selektivität aufgrund der nächtlichen Zellteilung morgens einen geringeren Anteil einnehmen, als in den Abendstunden. Der Grund des hier vorliegenden Ergebnisses kann jedoch in der Tatsache liegen, dass auch Lipide als Energiereserve den Zellen dienen können. Insbesondere Galaktolipide dienen photosynthetisch aktiven *E. gracilis*-Zellen als Energiereserve [Rosenberg und Pecker, 1964]. Eine eindeutige Aussage hierzu sollte sich bei längerfristigen Kultivierungen ergeben.

Insgesamt verhielt sich bei dieser Kultivierung das Signal der Photodiode repräsentativ antiproportional zu den Ergebnissen der Biotrockenmassekonzentration. Wie in Abbildung 73 zu erkennen ist, nimmt das Signal während der ersten sechs Tage ab, solange die Biotrockenmassekonzentration deutlich zunimmt (siehe Abbildung 72).

Ebenfalls ist ab Tag drei im Verlauf der Zunahme der Biotrockenmassekonzentration eine entsprechende Zunahme der Entwicklung der relativen Sauerstoffkonzentration in Hellphasen und ein Verbrauch in Dunkelphasen zu erkennen. Ab Tag sechs begann der Übergang der Kultur in die Stationärphase, was sich ebenfalls im Signal der Photodiode widerspiegelt. Die Minima des Signals verdeutlichen hierbei die Dunkelphasen. Es ist unklar, warum das Signal in den ersten Nächten nicht vollständig auf den Wert 0 abgesunken ist – es kann aber mit der in den Raum eintretenden Nacht(not)beleuchtung des Laborflurs zusammenhängen, welche bei der späteren hohen Zelldichte nicht mehr detektierbar war. Ebenfalls ansatzweise erkennbar sind die 30 minütigen Dämmerphasen, bevor und nachdem das Maximum jeweils erreicht wurde. Brinkmann [1966] berichtete, dass eine Kultur im circadianem Rhythmus über 24 Stunden ein zunehmendes Absetzverhalten zeigt, welches fünf Stunden ab Beginn der Dunkelphase ein Maximum einnimmt und bereits am Ende der Hell-Phase beginnt. Dieses Verhalten von *E. gracilis* wurde mit dem Signal der Photodiode deutlich, dass bereits vor Beginn der jeweiligen Dunkel-Phase stets eine leichte Tendenz nach oben zeigt, was einer geringfügigen Enttrübung/Klärung der Kulturbrühe entspricht. Diese Eigenschaft ist auch im Sinne der Ernte

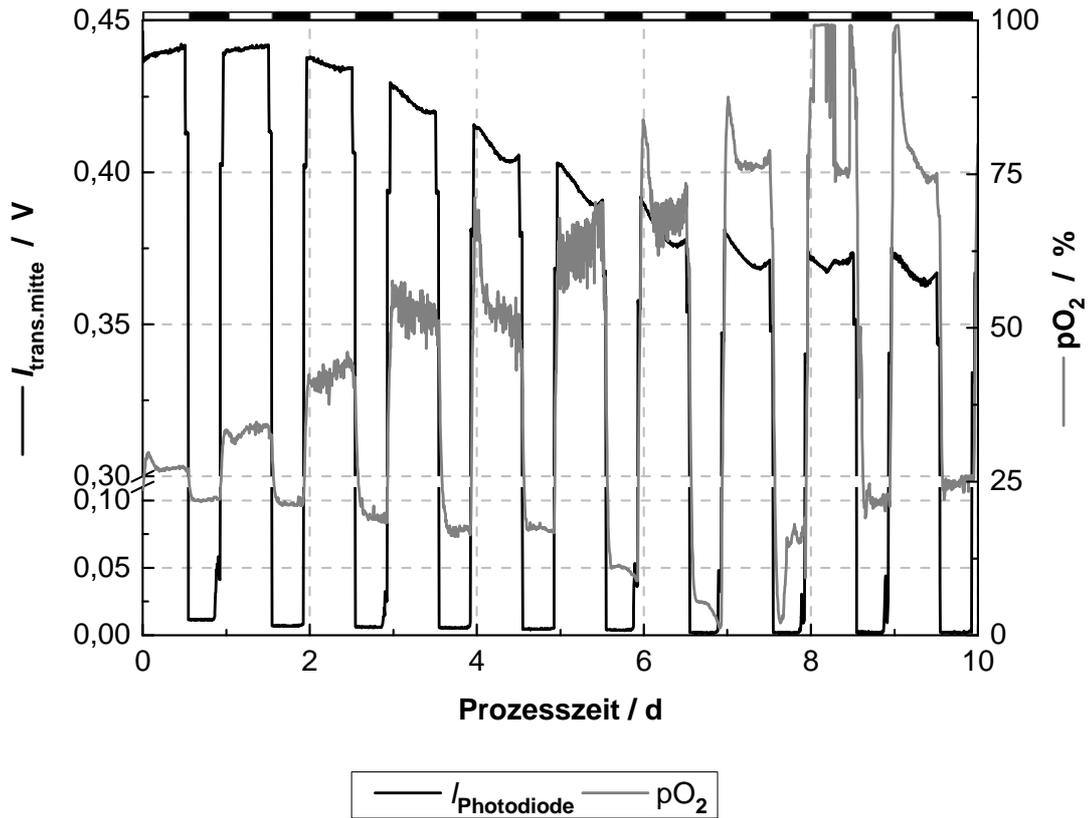


Abbildung 73: Verlauf der Lichttransmission anhand vom Photodiodensignal und der relativen Sauerstoffkonzentration im Medium bei einer Satzkultivierung von *E. gracilis* mit circadianem Rhythmus im EG5.1-Medium bei pH 3,0 zu Beginn. Der Lichtfluss der Lichtperioden lag bei $850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit Hell-/Dunkelphasen von 14/10 h und jeweils halbstündlichen Dämmerungsphasen bei halben Lichtfluss. Die Kulturschichtdicke lag bei 5 cm und die Temperatur bei 29°C . Der Gasvolumenstrom mit 5 % CO_2 (v/v) und 95 % (v/v) Luft lag bei 0,04 vvm. Die Ordinate für das Photodiodensignal ist unterbrochen. Der alternierend weiß-schwarze Balken oberhalb des Diagramms verdeutlicht die Hell- und Dunkelphasen.

im technischen Maßstab von Vorteil, da sichtbar wird, dass eine Sedimentation beschleunigt wird. Das Absetzen der Zellen ist zum Teil das Ergebnis des Abwerfens der Geißel, wovon viele, aber nicht alle Zellen einer Kultur betroffen sind [Brinkmann 1966]. Ebenso sollte das Absetzverhalten der Zellen durch die synchronisierte Zellteilung in der Dunkelphase verstärkt werden, da in dieser Phase die Zellen nur bedingt schwimmfähig sind, was bei eigenen lichtmikroskopischen Untersuchungen beobachtet wurde. Schließlich wird die Geißel zur Zellteilung benötigt, wie bereits erwähnt wurde. Insgesamt ist die geringste Dunkelbeweglichkeit etwa in der Mitte der physiologischen Nachtzeit beobachtet worden, wohingegen die maximale Beweglichkeit in der Mitte der physiologischen Tageszeit eruiert wurde [Brinkmann 1966, Schnabel 1968a], was Lebert und Kollegen [1999] über das gravitaktische Verhalten photoautotropher *E. gracilis*-Kulturen im Tag/Nacht-Rhythmus bestätigten. Das Signal der relativen, gelösten Sauerstoffkonzentration in der Kulturbrühe wurde ebenfalls aufgenommen. Da durch

die Photosynthese bei einer wachsenden Kultur angenommen werden kann, dass immer mehr Sauerstoff produziert wird, wurde die Elektrode so kalibriert, dass vor der Inokulation sich ein minimaler Wert von 23 % eingestellt hatte. Durch diesen einstellbaren Minimalwert der relativen Konzentration konnte die Sauerstoffentwicklung fast vollständig erfasst werden. Wie aus Abbildung 73 entnommen werden kann, stieg das pO_2 -Signal während der Kultivierung in den Hell-Phasen mit der wachsenden Kultur an, wobei gelegentlich zu Beginn des Lichtzyklus ein Maximum zu erkennen war. Ab Tag sechs pendelte sich das Signal mit einsetzender Stationärphase zunehmend bei 75 % ein. Interessanter Weise konnte beobachtet werden, dass der Sauerstoffverbrauch der Zellen in den Dunkelphasen enorm ist, was vermutlich mit der Zellteilung im Zusammenhang steht, wenn dieses Signal mit dem Eintritt der Kultur in die Stationärphase verglichen wird. So wurde am Tag sechs in der Dunkelphase zeitweise kaum gelöster Sauerstoff in der Kulturbrühe detektiert. Mit dem Eintritt der Kultur in die stationäre Phase sinkt der nächtliche Sauerstoffbedarf wieder, was hier als ein recht eindeutiges Signal gewertet wird, um den Zustand der Kultur – Wachstums- oder Stationärphase – *online* bewerten zu können. Lonergan [1986] beobachtete ein identisches Verhalten beim Sauerstoff bei der Bestimmung der Sauerstoffentwicklung der Photosynthese photoautotropher *E. gracilis* im 14:10 Tag/Nacht-Rhythmus. Hierbei wurden nur punktuell nachts zu Beginn und am Ende der Dunkelphasen zwei einzelne *offline*-Werte ermittelt, welche jedoch ebenfalls mit steigender Zelldichte über die Zeit durch den entsprechenden Verbrauch sanken. Im Weiteren werden die Konzentrationswerte vom CO_2 in der Abluft, als auch die *offline* und *online* pH-Werte der folgenden Abbildung 74 beschrieben. Es wird nochmals darauf hingewiesen, dass die *online* pH-Werte nicht die realen Werte wiedergaben, aber den Verlauf des pH-Wertes hervorgerufen durch den Tag/Nacht-Rhythmus sehr gut abbildeten. Der pH-Wert vom Inokulum lag bei 2,1 und senkte den initialen pH-Wert des Frischmediums von 3,0 auf 2,8. Ab Tag sechs wurde der *offline* pH sowohl morgens als auch abends gemessen. Am Tag zehn wies die Kulturbrühe einen *offline* pH-Wert von etwa 2,1 auf. Wird der *offline* pH der ersten Tage der Kultivierung betrachtet, so entsteht ein Eindruck langsam absinkender Werte, wie es stets bei photoautotrophen Satzkultivierungen mit kontinuierlicher Illumination vorgefunden wurde. Bei der Betrachtung des *online* Signals wird erst deutlich, dass sich der pH-Wert mit dem Fortschritt der Kultivierungszeit global zunehmend ansäuerte, jedoch alle 24 Stunden ein lokales Maximum und Minimum aufzeigte. Dabei lagen die Maxima etwa in der Mitte der Hellphasen und die Minima am Ende der Dunkelphasen. Ab Tag sechs wurde je Tageszyklus ein zusätzliches lokales Maximum am Ende jeder Hellphase deutlich. Wie bei zahlreichen anderen Mikroalgenpezies wird vermutlich die periodisch wiederkehrende Fluktuation des pH mit dem Glykolat-haushalt von *E. gracilis* zusammenhängen. Es wurde berichtet, dass bei einer Hell-/Dunkel-Rhythmik sich die Glykolat-Exkretion über die Hell-Phase änderte und zum Ende der Hell-Phase minimal bzw. kaum noch messbar war, dann begann die Exkretion über die Dunkel-

phase langsam wieder zu steigen [Codd und Merrett, 1971]. Unter Starklichtbedingungen und 100 % Luft als Begasung kann *E. gracilis* nach zwölf Stunden Illumination bis zu 30 % der Biotrockenmassekonzentration als Glykolat exkretieren [Yokota und Kitaoka, 1982]. Im Tag/Nacht-Rhythmus ist die Exkretion und Wiederaufnahme/Oxidation von Glykolat an die Biosynthese der Zellen gekoppelt. In diesem Fall ist die Exkretion vermutlich an die DNA-Synthese gekoppelt. Bei der Mikroalge *Ankistrodesmus braunii* beispielsweise verhält sich die Glykolat-Exkretion invers zur Nukleinsäure- und Proteinsynthese. Bei *E. gracilis* steigen Protein-, Chlorophyll-, Carotenoid-, RNA- und Phosphatgehalt über die Lichtphase an, bevor sich die Konzentrationen über Nacht durch die Zellteilung pro Zelle wieder nahezu halbieren [Leland und Edmunds, 1965]. Lediglich die DNA-Synthese (für die nächste Zellteilung) beginnt sechs Stunden vor Ende der Licht-Phase [Leland und Edmunds, 1965; Brinkmann, 1966]. Insbesondere bei den ersten vier Tagen der Kultivierung in Abbildung 74 wird deutlich, dass sich der Verlauf des pH etwa in der Mitte der Illuminationsphasen jeweils gedreht hat, wobei der pH-Wert von diesen Zeitpunkten an sank und nachts sein jeweils lokales Minimum einnahm. Ab Tag vier ist dieser Sachverhalt schwer zu interpretieren, da durch das starke Wachstum und Aufnahme entsprechender Ionen durch die Zellen der globale pH-Trend zusätzlich ins saure wandert. Zudem ist zu erwähnen, dass bei *E. gracilis* auch weitere Produkte im zellfreien Überstand gefunden wurden, die den pH-Wert beeinflussen. Unter anderem sind dies Nicotin-, Ascorbin- und Pantothersäure [Baker *et al.*, 1981]. Zudem zeichnete sich zunehmend ein schneller Sprung im pH-Wert jeweils bei den Hell-/Dunkelumstellungen ab. Hierbei waren eine Erhöhung des pH-Wertes jeweils zu Beginn der Belichtung und ein Absinken des pH-Wertes am Ende der Belichtung zu erkennen. Dieses Phänomen war vermutlich den veränderten Bedingungen bei Tag und Nacht zuzuschreiben, da bei Tag ein wesentlicher Teil des CO₂ direkt verbraucht wird während viel Sauerstoff freigesetzt wird. In den Dunkelphasen wird kein Sauerstoff produziert und der eingetragene Sauerstoff zum Teil verbraucht. Durch diese Änderung der Partialdrücke der Gase in der Gasphase im Reaktor stellt sich nach dem Gesetz von Henry eine höhere Löslichkeit für CO₂ in der Flüssigphase ein. Das CO₂ wiederum bewirkt als Kohlensäure eine Absenkung des pH. Abbildung 74 zeigt ebenfalls das CO₂-Signal der Abluft. Zu erkennen ist der Verbrauch des Substrates jeweils innerhalb der Lichtphasen, wenn die Photosynthese durch die Zellen betrieben werden konnte. Dabei nahm der Verbrauch entsprechend der zunehmenden Zelldichte bis zum Tag vier der Kultivierung zu und lag an diesem Tag in der Lichtphase unterhalb von 0,5 % in der Abluft. Ab Tag vier wurde innerhalb der Lichtphasen weniger CO₂ verbraucht – es ergaben sich Werte um 1 % in der Abluft. Entgegen dem Sauerstoffverbrauch in den Dunkelphasen der Kultur beginnt die Abnahme des Verbrauchs an CO₂ nicht ebenfalls bei Eintritt in die Stationärphase in etwa am Tag sieben, sondern bereits deutlich vorher in der Abbremsphase nach dem vierten Tag der Kultivierung, wo etwa 75 % der finalen Biotrockenmassekonzentration erreicht wurden. Weitere entsprechende

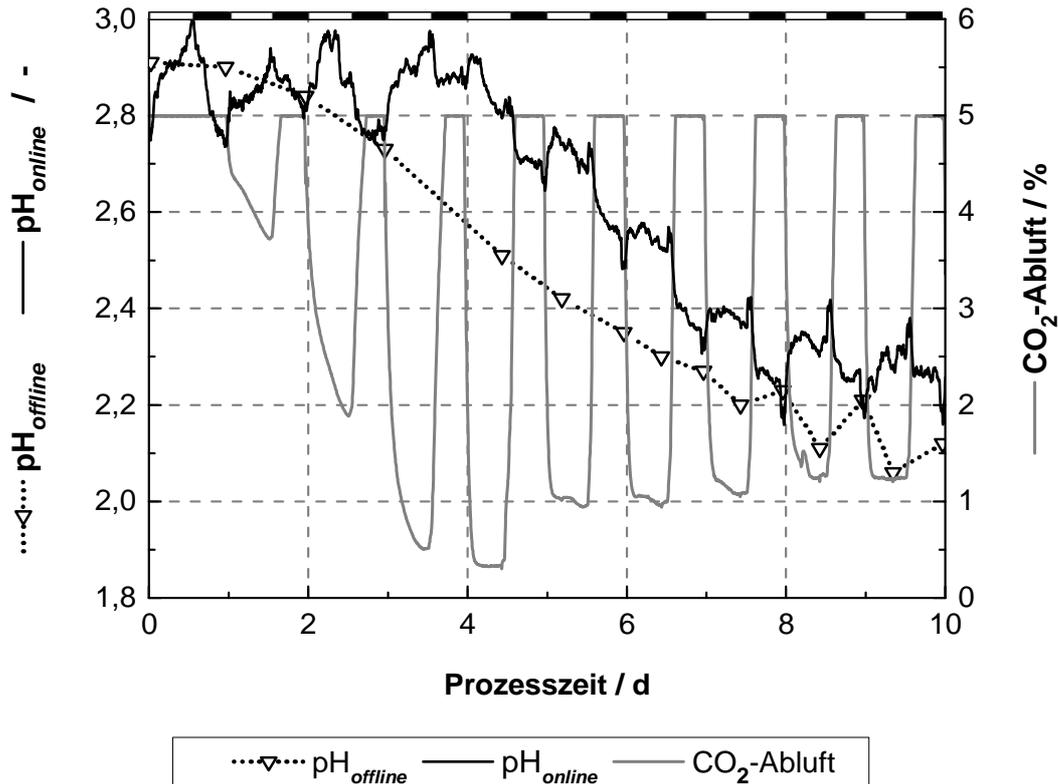


Abbildung 74: Verlauf der *online* und *offline* pH-Werte EG5.1 im Medium und des CO₂-Anteils in der Abluft bei einer Satzkultivierung von *E. gracilis* mit circadianem Rhythmus bei pH 2,8 nach der Inokulation. Der Lichtfluss der Lichtperioden lag bei 850 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ mit Hell-/Dunkelphasen von 14/10 h und jeweils halbstündlichen Dämmerungsphasen bei halben Lichtfluss. Die Kulturschichtdicke lag bei 5 cm und die Temperatur bei 29 °C. Der Gasvolumenstrom mit 5 % CO₂ (v/v) und 95 % (v/v) Luft lag bei 0,04 vvm. Der alternierend schwarz-weiße Balken oberhalb des Diagramms verdeutlicht die Hell- und Dunkelphasen.

Kultivierungen haben dies bestätigt (Daten nicht gezeigt). Zudem wurde sichtbar, dass sich der CO₂-Anteil in der Abluft nicht sofort auf das Ausgangsniveau der Zuluft von 5 % einstellte. Insbesondere in den ersten vier Tagen ist deutlich erkennbar, dass offensichtlich CO₂ auch in der Dunkelphase der Kultivierung aufgenommen wurde. Aus Abbildung 73 wurde deutlich, dass die relative Sauerstoffsättigung im Medium schneller mit Einbruch der Dunkelheit absinkt. Ein Verbrauch des CO₂ kann hierüber deshalb nicht eindeutig bestätigt werden, jedoch erklärt das Phänomen vielleicht die überdurchschnittlich hohe, relative Sauerstoffsättigung im Medium mit dem Einbruch des Tageslichtes in den ersten Stunden (vgl. Abbildungen 73 und 75) durch eine intrazelluläre Akkumulation von CO₂. Da identische Kultivierungen vergleichbare Ergebnisse lieferten, wurde eine Satzkultivierung mit einem geringeren Gasfluss durchgeführt, bei der sich die Limitierung der CO₂-Quelle bei einem Konsum in der Nachtphase deutlicher ausprägen müsste. Das Ergebnis der Kultivierung mit einem um 25 % geringeren Gasfluss ist in Abbildung 75 dargestellt. Nun ist ein in den Nachtphasen durch die Dunkelrespiration der Zellen zunehmender Verbrauch des Gelöstsauerstoffs besser erkennbar. Es wird ebenfalls

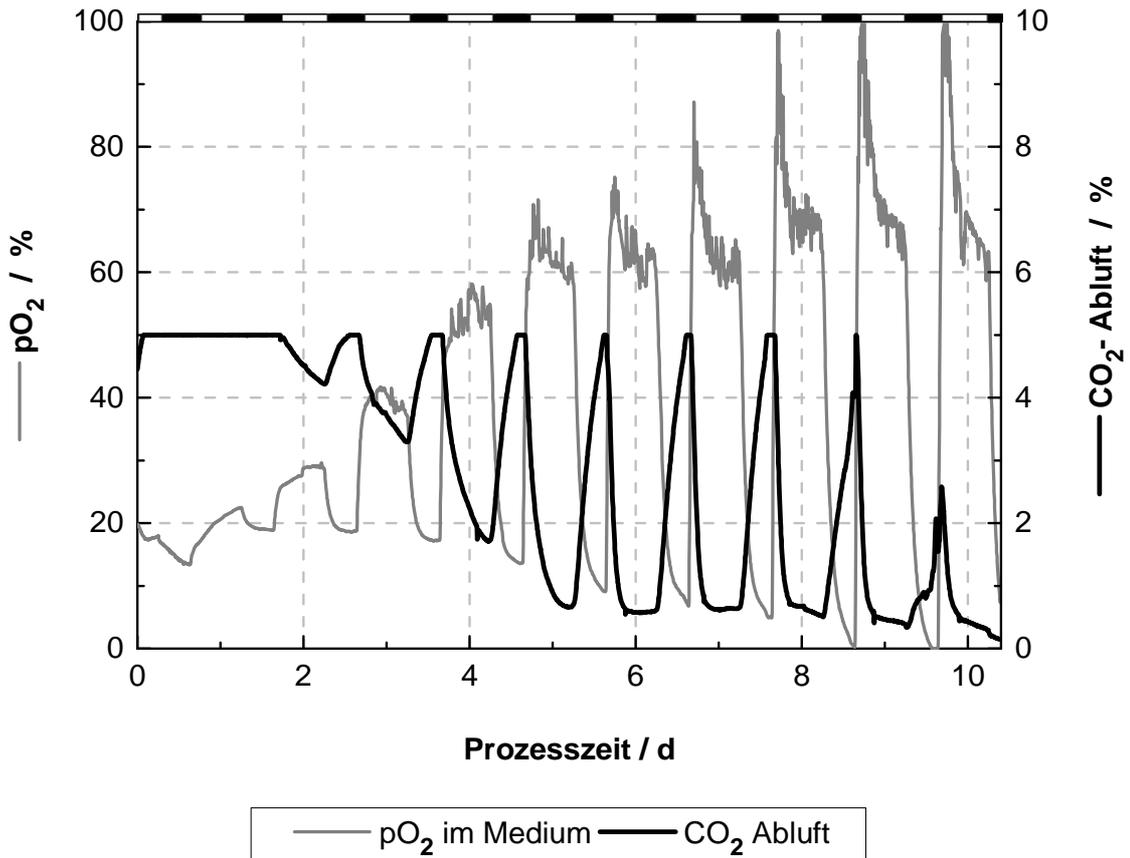


Abbildung 75: Verlauf der relativen gelösten Sauerstoffkonzentration im Medium und des CO₂-Anteils in der Abluft bei einer Satzkultivierung von *E. gracilis* mit circadianem Rhythmus mit EG5.1-Medium bei pH 3,0 zu Beginn. Der Lichtfluss der Lichtperioden lag bei 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit Hell-/Dunkelphasen von 14/10 h und jeweils halbstündlichen Dämmerungsphasen bei halben Lichtfluss. Die Kulturschichtdicke lag bei 5 cm und die Temperatur bei 29 °C. Der Gasvolumenstrom mit 5 % CO₂ (v/v) und 95 % (v/v) Luft lag bei 0,03 vvm. Der alternierend schwarz-weiße Balken oberhalb des Diagramms verdeutlicht die Hell- und Dunkelphasen.

deutlich, dass sich die CO₂-Konzentration in der Abluft nur langsam auf den Ausgangswert der Zuluft über die Dunkelphase erholt, womit andere Effekte unwahrscheinlich erscheinen. Am Ende der Kultivierungszeit erreichte das CO₂ in der Abluft in den Dunkelphasen nicht mehr die 5 % des Anteils der Zuluft. Das Verhalten der CO₂-Fixierung von *E. gracilis* bei gegebenem circadianem Rhythmus ist in der Literatur kaum beschrieben. Allerdings berichteten Lonergan und Sargent [1978], dass die Carboanhydratase von *E. gracilis* nicht den Tag/-Rhythmus der Zellen steuert, wie es bei anderen Mikroalgen der Fall ist, was einen indirekten Hinweis liefert. Im Weiteren haben die Autoren die CO₂-Aufnahme in einer circadianen Kultur im CM-Medium untersucht und festgestellt, dass in den Dunkelphasen eine Aufnahme von 1,25 bis 1,75 $\mu\text{mol CO}_2$ je 10⁶ Zellen stattfand. Hierbei wurde eine sinkende Aufnahme über den Verlauf der Dunkelphase beobachtet, allerdings wurden hierzu Messpunkte nur zu Beginn und am Ende der Dunkelphase durchgeführt. Insgesamt wird nicht eindeutig klar, ob die Zellen über die gesamte Dunkelphase CO₂ aufnahmen oder ob sich die Zellen auf Grund ihres circadianem Rhythmus

bereits auf die Lichtphase mit einer entsprechenden Reaktion vorbereiten und zu Beginn der Dunkelphase die CO₂-Aufnahme noch ein Abklingeffekt der kurz zuvor beendeten Lichtphase ist. Ungeachtet dessen ist dieser Effekt, bei dem in dieser Arbeit mehrmals eine nächtliche CO₂-Aufnahme gemessen wurde, für ein Bioraffineriekonzept durchaus von Vorteil, wenn die Nachtphasen auch zur CO₂-Aufnahme genutzt werden können. Insbesondere wenn es sich um CO₂ aus einer Rauchgas-Quelle aus nicht abgeschaltbaren Anlagen handelt, was in den meisten Fällen seitens der Industrie/Produktion vorherrscht, kann diese Eigenschaft ausgenutzt werden. Insgesamt konnte demonstriert werden, dass der circadiane Rhythmus von *E. gracilis* Synergieeffekte für die Nutzung in einem Bioraffineriekonzept auf dem Freiland birgt, wenn auch die Biomasseerzeugung durch den geringeren Sonnenenergieeintrag natürlich geschmälert würde.

4.9.2 Repetitive Satzkultivierungen von *E. gracilis* mit circadianem Rhythmus und angepassten Erntezyklen – *repeated batch*

Die bisherigen Ergebnisse der kontinuierlichen und Satzkultivierungen zeigten den jeweiligen optimalen Betriebsbereich in Bezug auf die Mengen für potentielle Produkte aus *E. gracilis*. Bei Satzkultivierungen war dies der Zeitraum am Ende der Wachstumsphase bzw. beim Eintritt in die stationäre Phase der Kultur. Im kontinuierlichen Modus und beidseitiger Illumination mit 1250 μmol m⁻² s⁻¹ war dieser Punkt optimal, wenn mit hydraulischen Verweilzeiten von 0,45 bis 0,50 d⁻¹ gearbeitet wurde. In diesem Bereich sowohl bei Satzkultivierungen am Ende der Wachstumsphase, als auch bei der genannten kontinuierlichen Kultivierung mit Raumzeiten von 0,45 bis 0,50 d⁻¹ war eine bestimmte Zelldichte durch die eintretende Lichtlimitierung erreicht, die eine Akkumulation relevanter Stoffe bewirkte. Ebenfalls lagen in diesem Bereich nur noch geringe Konzentrationen von Stickstoff im Medium vor, was sich positiv auf eine Akkumulation von Paramylon auswirkte. Es wurden dann maximale Konzentrationen der potentiellen Produkte vorgefunden. Eine zum späteren Zeitpunkt eventuell auftretende Akkumulation von Paramylon ist dem zunehmenden Zellsterben schuldig, wodurch je Biomasseäquivalent mehr Paramylon vorgelegen hat. Weitere Argumente sprechen dafür, den Prozess innerhalb dieses Bereiches zu betreiben. So kann sich eine sehr dichte Kultur auch in dünnen Schichtdicken in parallelen Reaktorplatten am besten bei starker Illumination vor Photoinhibition schützen, da die Zellen zur gegenseitigen Beschattung und Streuung des Lichtes beitragen [Wijffles und Barbosa, 2010]. Insofern wäre eine Kultivierung bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von Vorteil, bei der die Kultur unter gegebenen Bedingungen bei der maximal erreichbaren Zelldichte arbeitet, ohne jedoch in die Stationärphase einzutreten, um eine ausreichende Viabilität über längere Prozesszeiten zu gewährleisten. Eine Möglichkeit für durchgängig hohe Zelldichten wäre die repetitive Satzkultivierung (*repeated batch*), bei dem regelmäßig nur ein

relativ geringer Teil des Gesamtvolumens geerntet wird. Im Hinblick auf derzeitige geschlossene technische Anlagen von 200 bis 700 m³ Arbeitsvolumen entstände bei 10 % Teilernte damit ein händelbares Erntevolumen von 20.000 bis 70.000 L [Pulz 2001]. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Betriebsweise mit *E. gracilis* dargestellt und diskutiert. Neben den erreichten Biotrockenmassekonzentrationen und Selektivitäten werden auch Prozessparameter in den Abbildungen 76 bis 79 dargestellt. Um einer Limitierung der CO₂-Aufnahme entgegenzuwirken, wurde der Gasfluss auf 0,06 vvm erhöht. Dieser Gasfluss erwies sich bei Vorversuchen als tolerierbar im Hinblick auf eventuellen Scherstress durch zu hohe Gasvolumenströme und Scherkräfte (vergleiche Abschnitt 4.8, Satzkultivierungen mit 0,04 und 0,2 vvm). Da durch den Hell/Dunkel-Rhythmus durchaus Änderungen über die tägliche gesamte Lichtphase zu erwarten waren, wurde ab dem siebten Tag jeweils „morgens“ unmittelbar nach Beginn der Illumination und „abends“ jeweils zwei bis drei Stunden vor Ende der Illumination eine Probenahme durchgeführt. Hierdurch ist der in Abbildung 79 charakteristische Zick-Zack Verlauf einiger Resultate zu erklären. Dabei wurde deutlich, dass die Konzentrationen an Biotrockenmasse, α -Tocopherol und Paramylon in der Regel zu Beginn der Illuminations-Phasen geringer waren, als zum Ende der Hell-Phasen. Bei den Lipidkonzentrationen waren diese entweder gleich oder ebenfalls höher am Ende der Hell-Phasen (Daten zu den Konzentrationen sind nicht explizit dargestellt). Bei dieser Kultivierung wurde in regelmäßigen Abständen eine Teilernte vorgenommen, welche zwischen 11 und 21 % des Arbeitsvolumens lag (siehe Tabelle 15) und sich von ihrer Menge am Signal der Photodiode orientierte. Es wurde darauf geachtet, dass das Photodioden-Signal bei Ernte und Zulauf an Frischmedium um den Bereich von 0,35 V schwankte, was aus Abbildung 78 ersichtlich wird. Bei Ernte- und Zufütterungsabständen von 3 Tagen ausgedehnt worden – wie ab Tag 19, 23 sowie 25 – war eine Akkumulation insbesondere der Biotrockenmasse und des α -Tocopherols zu beobachten, wie aus Abbildung 77 ersichtlich wird. Generell bewegten sich die Biotrockenmassekonzentrationen bei dieser Kultivierung ab Tag acht im Bereich um 1 g L⁻¹, was der Hälfte der Biotrockenmassekonzentrationen der stationären kontinuierlichen Kultivierung ohne Hell/Dunkel-Rhythmus entspricht. Die α -Tocopherol-Selektivitäten hingegen bewegten sich ab Tag zwölf im Bereich um 3 mg g⁻¹, was deutlich höher verglichen mit Ergebnissen der stationären kontinuierlichen Kultivierung ist, wo geringfügig mehr als 50 % hiervon erreicht wurden. Anbetracht theoretischer Grundlagen kann man vermuten, dass die Zellen die geringere Energieaufnahme durch den Hell/Dunkel-Rhythmus durch mehr Chloroplasten kompensieren, was sich in höheren α -Tocopherol-Selektivitäten widerspiegelt. Jedoch sollten sich dann mehr Chloroplasten pro Zelle wegen ihrer eigenen Membran auch in höheren Lipid-Selektivitäten im Vergleich zur stationären kontinuierlichen Kultivierung abzeichnen, was eindeutig nicht der Fall war. Ein möglicher Grund wird weiter unten diskutiert. Vergleichend stellt sich bei den in Abbildung 77 dargestellten Ergebnissen eine geringere Lipid-Selektivität ab Tag zwölf mit durchschnittlich 0,15 g g⁻¹

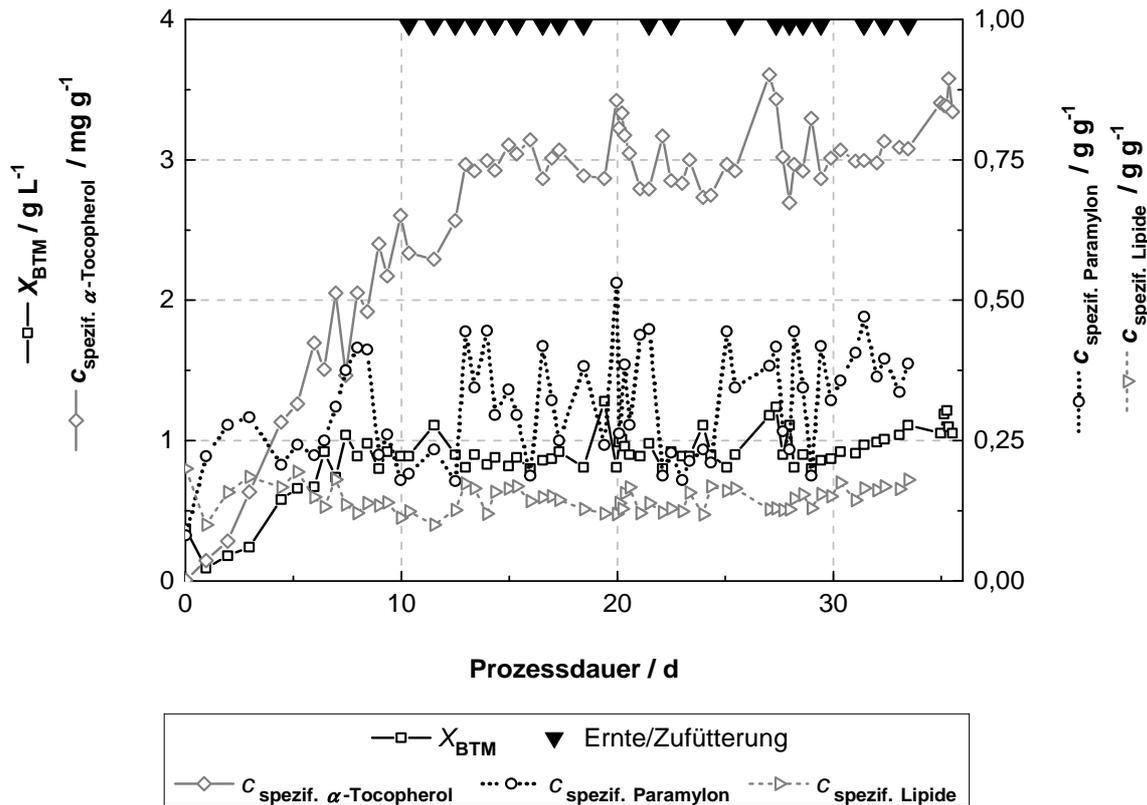


Abbildung 76: Verlauf verschiedener gemessener Parameter einer photoautotrophen, repetitiven Satzkultivierung von *E. gracilis* mit circadianem Rhythmus mit EG5.1-Medium bei pH 3,0 zu Beginn und pH 3,0 bei den Frischmediumfraktionen. Die Zeitpunkte der Ernte und Zufütterung sind im oberen Teil des Diagrammes durch schwarze Dreiecke markiert. Der Lichtfluss der Lichtperioden lag bei $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit Hell-/Dunkelphasen von 14/10 h und jeweils halbstündlichen Dämmerungsphasen bei halben Lichtfluss. Die Kulturschichtdicke lag bei 5 cm und die Temperatur bei 29 °C. Der Gasvolumenstrom mit 5 % CO_2 (v/v) und 95 % (v/v) Luft lag bei 0,06 vvm durchgeführt.

ein während bei der stationären kontinuierlichen Kultivierung im Schnitt $0,33 \text{ g g}^{-1}$ in der stationären Betriebsphase erreicht wurden, also in etwa das Doppelte. Beim Paramylon wurden bei der in Abbildung 77 beschriebenen Kultivierung abhängig vom Probenahmezeitpunkt stark schwankende Werte festgestellt. Insgesamt wurden Selektivitäten zwischen $0,18$ und $0,53 \text{ g g}^{-1}$ ermittelt – im Durchschnitt lagen diese bei $0,32 \text{ g g}^{-1}$. Bei der stationären, kontinuierlichen Kultivierung wurden durchschnittlich $0,42 \text{ g g}^{-1}$ in der stationären Phase erreicht. Es wird deutlich, dass der Hell/Dunkel-Rhythmus bzw. *in natura* Tag/Nacht-Rhythmus zu Lasten der Produktausbeute ging. Einerseits steht weniger Lichtenergie zur Synthese von Lipiden und Paramylon zur Verfügung und andererseits stellen beide Produkte Reservespeicher dar, welche über die Dunkel- bzw. Nachtphase zur Aufrechterhaltung des Ana- und Metabolismus genutzt werden [Cook 1966; Rosenberg und Pecker 1964]. Da die Ernte und der Zulauf eines äquivalenten Volumens an Frischmedium stets zum Ende der Illuminationsphasen erfolgte und in einem Bioraffineriekonzept ebenso erfolgen sollte, sind die Ergebnisse der „abendlichen“ Probenahmen zusammen mit dem kumulativen Erntevolumen in Abbildung 77 hervorgeho-

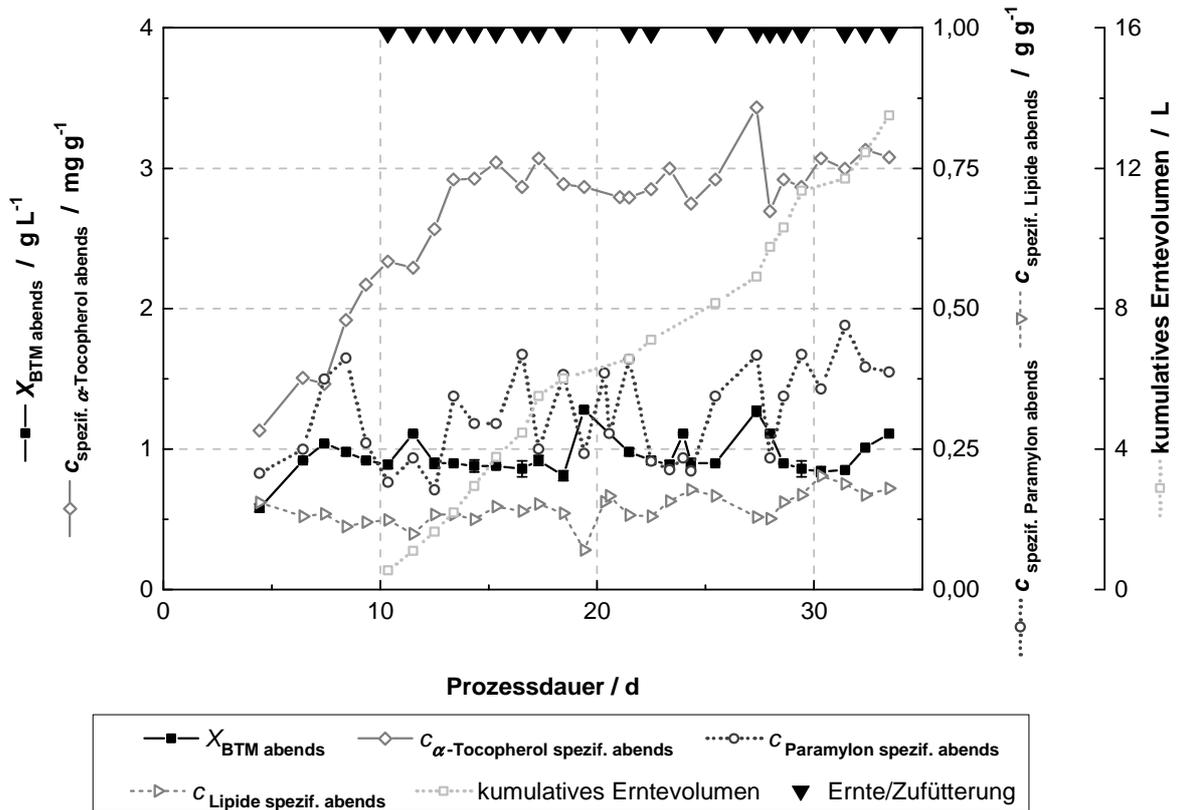


Abbildung 77: Verlauf verschiedener gemessener Parameter zum Ende jeder Hell-Phase bei einer photoautotrophen, repetitiven Satzkultivierung von *E. gracilis* mit circadianem Rhythmus mit EG5.1-Medium bei pH 3,0 zu Beginn und pH 3,0 bei den Frischmediumfraktionen. Zudem wurde das kumulative Erntevolumen aller Teilernten aufgetragen. Die Zeitpunkte der Ernte und Zufütterung sind im oberen Teil des Diagrammes durch schwarze Dreiecke markiert. Der Lichtfluss der Lichtperioden lag bei 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit Hell-/Dunkelphasen von 14/10 h und jeweils halbstündlichen Dämmerungsphasen bei halben Lichtfluss. Die Kulturschichtdicke lag bei 5 cm und die Temperatur bei 29 °C. Der Gasvolumenstrom mit 5 % CO₂ (v/v) und 95 % (v/v) Luft lag bei 0,06 vvm durchgeführt.

ben. Es wurden zwischen Tag zehn und 35 insgesamt 13,5 L Kulturbrühe geerntet und frisches Medium zugefüttert. Deutlich zu erkennen ist nun, dass große Bereiche einzelner Werte nun nicht mehr tageszeitabhängig schwanken. Noch vorhandene Schwankungen waren durch die Ernte/Zufütterung bedingt und machten sich besonders bei der Paramylon-Selektivität bemerkbar. So sank die spezifische Paramylonkonzentration in der Regel nach einer Ernte/Zufütterung beim nächsten Probenahmezeitpunkt ab. Dieses Phänomen deckt sich mit den durchgeführten Satzkultivierungen, wo das Paramylon bei Nährstofflimitierung stärker akkumulierte. Von Tag zwölf bis 35 ergeben sich im Durchschnitt geringfügig höhere Selektivitäten für Paramylon und Lipide um 0,15 bzw. 0,33 g g⁻¹ bei einer durchschnittlichen Konzentration der Biomasse von 0,96 g L⁻¹ und einer durchschnittlichen spezifischen α -Tocopherolkonzentration von 2,95 mg g⁻¹. Es sei angemerkt, dass bei der mathematischen Medienoptimierung (Abschnitt 4.5.3) sehr geringe Stickstoffkonzentrationen im Medium einen positiven Effekt auf die Paramylonkonzentration bewirken sollten. Durch die repetitive Prozessführung konnte mit Teilernten und kleinen Volumina in Bezug auf das Gesamtvolumen dieser Zustand aufrecht-

erhalten werden und das Modell somit bestätigt werden.

Wie bereits erwähnt, orientierte sich das Ernte- und Zulaufvolumen am Signal der Photodiode, wo eine Zielgröße von 0,35 V angestrebt wurde. Neben dem relativen Sauerstoffpartialdruck ist der Verlauf des Photodioden-Signals in der folgenden Abbildung 78 vorgestellt. Wurde das Erntevolumen zu groß gewählt wie am Tag 17 mit 21 % sowie am Folgetag mit 10 % des Arbeitsvolumens, so stieg das Signal deutlich an. Die genauen Ernte- und Zufütterungsvolumina sind der Tabelle 15 zu entnehmen, wobei in dem gezeigten Zeitraum umgerechnet aus insgesamt fünf Litern Arbeitsvolumen eine Biotrockenmasse von 0,56 g d⁻¹ bzw. volumenbezogen eine Biotrockenmassekonzentration von 0,11 g L⁻¹ d⁻¹ erzielt wurde. Diese Tagesproduktivität je Liter Medium fällt aufgrund der hohen zu illuminierenden Schichtdicke relativ klein aus, befindet sich jedoch bereits im mittleren Bereich im Vergleich zu vielen anderen auch

Tabelle 15: Übersicht der Ernte- und Zufütterungszeitpunkte der repetitiven Satzkultivierung mit circadianem Rhythmus mit *E. gracilis* im EG5.1-Medium. Dargestellt sind der Zeitpunkt, welcher sich an der Kultivierungsdauer orientiert, die BTM zu diesem Zeitpunkt im Photobioreaktor, das Ernte- und Zufütterungsvolumen und welchen Anteil dies am gesamten Arbeitsvolumen ausmacht und die absolute Biotrockenmasse der jeweiligen Erntevolumenfraktion. Siehe auch Abbildung 78 - 81.

Kultivierungsdauer als Ernte-/Zufütterungszeitpunkt / d	X _{BTM} der Kulturbrühe / g L ⁻¹	Erntevolumen / L	Volumenanteil der Ernte/Zufütterung am Arbeitsvolumen / %	absolute X _{BTM} / g
10,35	0,89	0,55	11,00	0,49
11,51	1,11	0,55	11,00	0,61
12,50	0,90	0,55	11,00	0,50
13,38	0,90	0,55	11,00	0,50
14,33	0,88	0,75	15,00	0,66
15,34	0,88	0,83	16,60	0,73
16,54	0,86	0,69	13,80	0,59
17,30	0,92	1,05	21,00	0,97
18,44	0,81	0,50	10,00	0,41
21,46	0,98	0,55	11,00	0,54
22,48	0,92	0,55	11,00	0,51
25,44	0,90	1,05	21,00	0,95
27,34	1,27	0,75	15,00	0,95
27,97	1,11	0,85	16,90	0,94
28,59	0,90	0,55	11,00	0,50
29,42	0,86	1,05	21,00	0,90
31,42	0,85	0,35	7,00	0,30
32,36	1,01	0,75	15,00	0,75
33,45	1,11	1,05	21,00	1,17

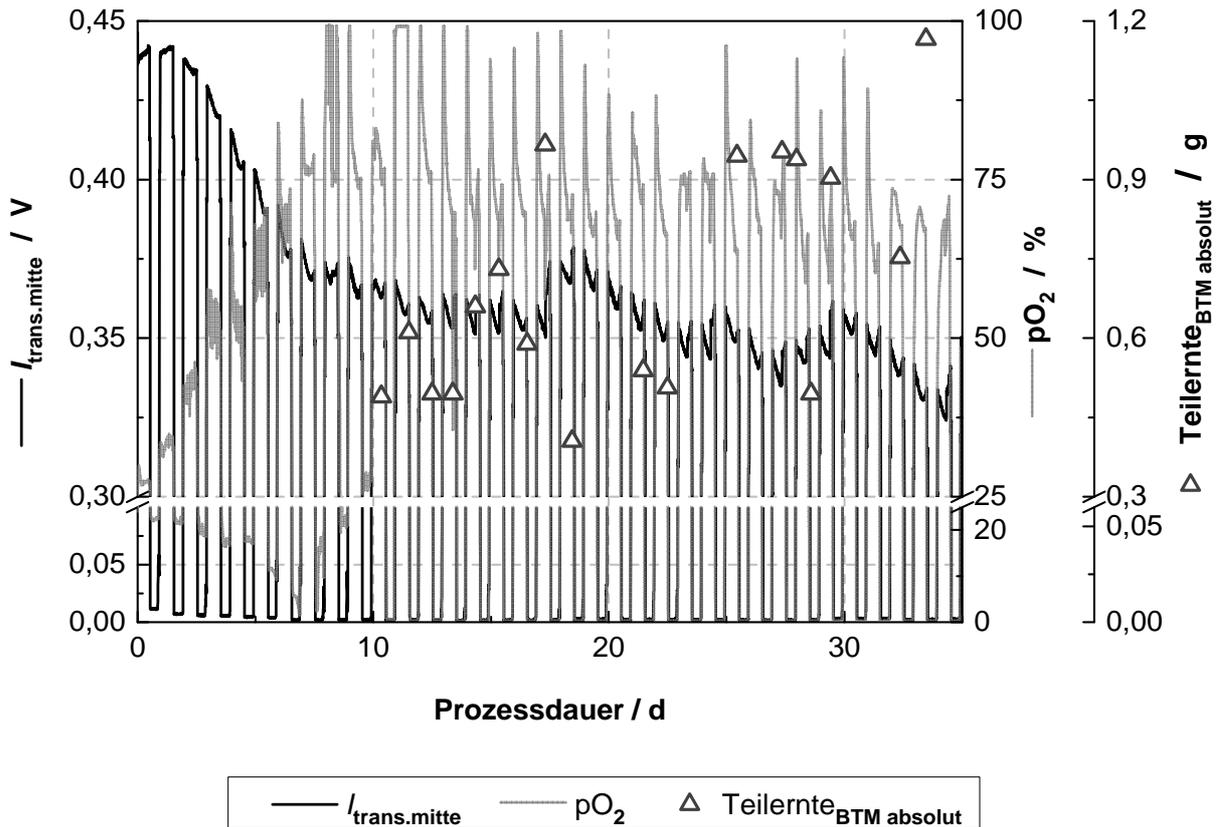


Abbildung 80: Verlauf des Photodiodensignals im Inneren des Reaktors und der relativen Sauerstoffkonzentration im Medium bei einer photoautotrophen, repetitiven Satzkultivierung von *E. gracilis* mit circadianem Rhythmus mit EG5.1-Medium bei pH 3,0 zu Beginn und pH 3,0 bei den Frischmediumfraktionen. Die Erntezeitpunkte und die absolute Erntemenge sind mit Dreiecken kenntlich gemacht. Der Lichtfluss der Lichtperioden lag bei $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit Hell/Dunkelphasen von 14/10 h und jeweils halbstündlichen Dämmerungsphasen bei halben Lichtfluss. Die Kulturschichtdicke lag bei 5 cm und die Temperatur bei 29°C . Der Gasvolumenstrom mit 5 % CO_2 (v/v) und 95 % (v/v) Luft lag bei 0,06 vvm durchgeführt.

kommerziell verwendeten Mikroalgenstämmen [Brennan und Owende, 2009; Mata *et al.*, 2010]. In Bezug auf die Selektivitäten hatte die Verdünnung keinen Einfluss – eine stärkere Schwankung, als in vergleichsweise anderen Zeiträumen wird nicht deutlich. Im geringen Maße weist das Signal in jeder Lichtphase zu Beginn ein Maximum auf, sinkt über die Lichtphase und steigt zum Ende der Lichtphase wieder – unabhängig von der Ernte/Zufütterung. Diese Beobachtung geht einher mit dem bereits erwähnten Absetzverhalten und der maximalen Beweglichkeit zur „Tageszeitmitte“ von *E. gracilis*. Weiterhin ist dem pO_2 -Signal zu entnehmen, dass ein Maximum in der Regel zu Beginn einer jeden Lichtphase zu verzeichnen war und über den Verlauf der Lichtphasen stets sank. Ausnahmen hierzu erfolgen zu Zeitpunkten der Ernte mit einem zusätzlichen Abfall des Signals gefolgt mit einem Anstieg während und nach der Zufütterung bis zum Beginn der Dunkelphasen. Ebenfalls wie bei zuvor dargestellten Kultivierungen mit Hell/Dunkel-Rhythmus war auch hier in der Satzphase ein zunehmender

Sauerstoffverbrauch in den Dunkelphasen zu erkennen, welcher am Tag sieben sein Maximum aufwies und anschließend bedingt durch den zunehmenden Eintritt in die Stationärphase in den Dunkelphasen wieder abnahm, bis am Tag zehn die erste Ernte und Zufütterung erfolgte. Ab diesem Zeitpunkt sank der relative Sauerstoffpartialdruck in den Dunkelphasen immer auf 0 % ab. Initial wurde die Elektrode auf 20 % unter den eingestellten Bedingungen kalibriert und 24 Stunden auf ihre Signalstabilität geprüft, bevor die Inokulation des Systems erfolgte. Somit ist der zunehmende Ausschlag des Signals Richtung 100 % Sauerstoffentwicklung der photosynthetischen Leistung der Zellen zuzurechnen. Hierbei rief ein maximales Wachstum der Zellen Werte in Richtung 100 % hervor - ein Absinken dieses Signals in den Hellphasen deutete einen zunehmenden Übergang der Kultur in die Abbremsphase an. Bei der Ernte und anschließenden Zufütterung konnte oft ein Absinken des Signals mit nachfolgendem Anstieg bewirkt durch das frische Medium und der entsprechenden Reaktion der Zellen beobachtet werden. Wäre die pO₂-Elektrode vor der Inokulation auf 100 % kalibriert worden, ergäben sich in Lichtphasen Werte über 100 % wobei schnell das Maximum des Aufnahmebereiches der Elektrode erreicht würde – eine Reaktion der Zellen in Bezug auf die starke Sauerstoffentwicklung wäre damit nicht so differenziert zu erkennen gewesen. Angesichts der in den Dunkelphasen ab Tag zwölf eventuell vorliegenden Sauerstofflimitierung könnte die Vermutung eines negativen Effektes für das Wachstum der Zellen entstehen. So zeigten Inui *et al.* und Buetow, dass anaerobe Kultivierungen von *E. gracilis* zum Abbau von Paramylon und einer Akkumulation von Wachsestern bei den Lipiden führte [Inui *et al.*, 1982; Buetow 1982]. Dieser Effekt konnte während der gesamten Prozessdauer nicht beobachtet werden, zumal sich die spezifischen Konzentrationen von Paramylon und den Lipiden in den sauerstofflimitierenden Dunkelphasen im gleichen Rahmen bewegen, wie zu Beginn der Kultivierung in der initialen Satzphase, wo keine Sauerstofflimitierung vorlag. Die relative Konzentration von Kohlenstoffdioxid in der Abluft, als auch der *offline*-pH des *repeated batch* sind in der folgenden Abbildung 79 dargestellt. Es wird deutlich, dass es zu keiner Zeit der gesamten Prozessdauer zu einer CO₂-Limitierung gekommen ist. In der initialen Satzphase war mit zunehmender Biomasse der höchste Verbrauch zu verzeichnen. Ab Tag sechs sank dann der CO₂-Verbrauch der Zellen in den Hellphasen, was im Vergleich zum O₂-Verbrauch in den Dunkelphasen deutlich früher eine Abbremsphase ab Tag fünf deutlich macht, da in den Folgetagen höhere Konzentrationen in der Abluft detektiert wurden. Im weiteren Verlauf pendelte sich die relative CO₂-Konzentration der Abluft bei etwa 2,5 % ein. In den Dunkelphasen konnte ebenfalls beobachtet werden, dass der CO₂-Konsum bei fehlender Lichtquelle als Energielieferant wieder nicht abrupt, sondern nur langsam abnahm, bis dieser die Ausgangskonzentration der Zuluft erreichte. Dieses Phänomen war jedoch nicht so deutlich zu beobachten, wie es bei der initialen Satzphase der Fall war und auch bei anderen Kultivierungen beobachtet wurde. Der Abbildung ist ebenfalls zu entnehmen, dass mit jeder Zufütterung ein kurzfristig

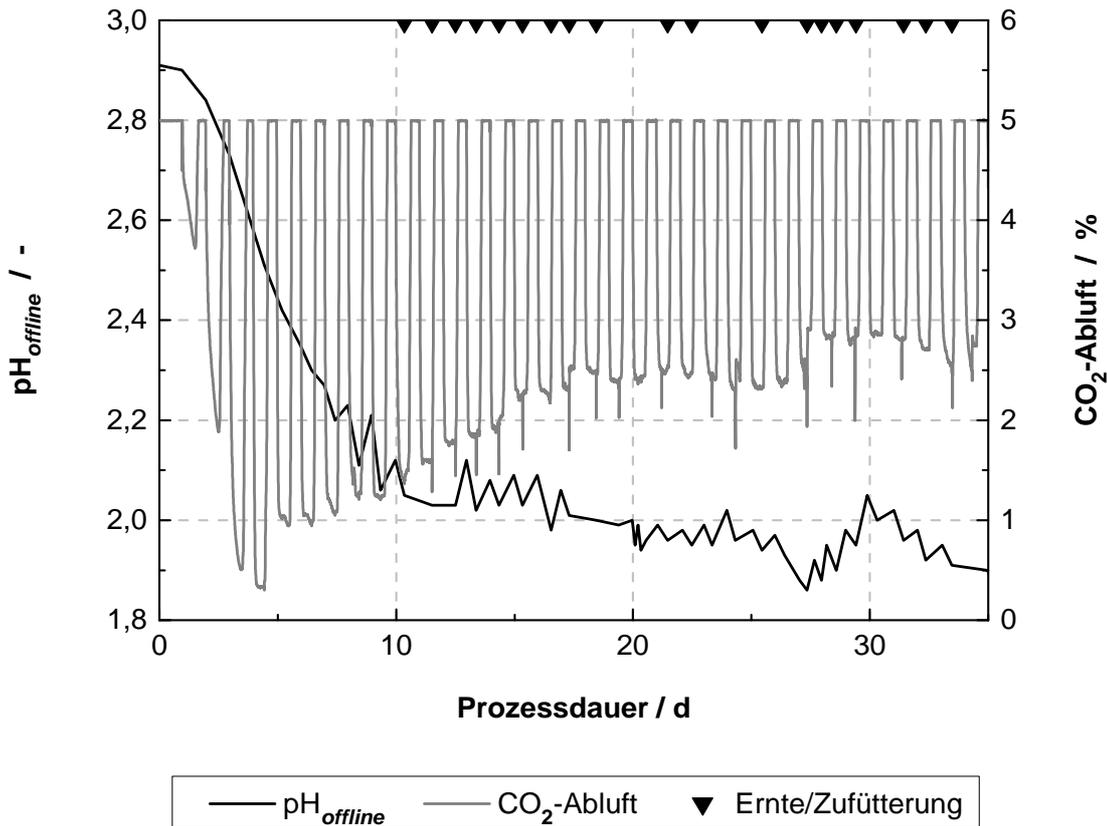


Abbildung 79: Verlauf des *offline* gemessenen pH der Kulturbrühe und des CO₂-Anteils in der Abluft bei einer photoautotrophen, repetitiven Satzkultivierung von *E. gracilis* mit circadianem Rhythmus mit EG5.1-Medium bei pH 3,0 zu Beginn und bei den Frischmediumfraktionen. Durch den Zick-Zack-Verlauf beim pH-Wert wird eine Messung am Morgen und am Abend deutlich. Die Zeitpunkte der Ernte und Zufütterung sind im oberen Teil des Diagrammes durch schwarze Dreiecke markiert. Der Lichtfluss der Lichtperioden lag bei 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit Hell-/Dunkelphasen von 14/10 h und jeweils halbstündlichen Dämmerungsphasen bei halben Lichtfluss. Die Kulturschichtdicke lag bei 5 cm und die Temperatur bei 29 °C. Der Gasvolumenstrom mit 5 % CO₂ (v/v) und 95 % (v/v) Luft lag bei 0,06 vvm durchgeführt.

höherer Bedarf an Kohlenstoffdioxid vorlag, welcher sich schnell wieder normalisierte. Die *offline*-Messwerte des pH verdeutlichen, dass die Vorkultur das Frischmedium bei der Inokulation zusätzlich von pH 3,0 auf etwa 2,9 ansäuerte. Im Weiteren nimmt der Verlauf ab Tag sieben ein Zick-Zack Muster ein, was einer Messung zu Beginn und zum Ende der Hellphasen zu Grunde liegt – letzteres jeweils vor jeder Ernte und Zufütterung. Insgesamt bewegte sich der pH-Trend um 2,0, sank jedoch bis zum Ende und erreichte am Tag 35 einen pH-Wert von 1,5. Größere Schwankungen im Zeitraum von Tag zehn bis 35 entstanden durch die Zufütterung des Frischmediums mit pH 3,0; in Bereichen eines kurzfristig linearen Verlaufes wurde nur am Ende der Hellphase das pH gemessen. Es wird hiermit deutlich, dass das Frischmedium nicht unbedingt auf einen sehr sauren pH eingestellt werden muss, da die Kultur im repetitiven Modus im Betrieb einen tieferen pH-Wert erreicht, als bei anderen durchgeführten Betriebsmodi. Hiermit beschränken sich auch im Dauerbetrieb potentielle Kontaminationen nur auf stark acidophile Organismen [Pulz und Gross, 2004].

4.10 *Upstream*

4.10.1 Sanitisierung von Photobioreaktoren

In Bezug auf eine homogene Produktidentität, aber auch hinsichtlich maximaler Produktausbeuten aus eingesetztem Nährmedium und CO₂ ist eine axenische Kultivierung des Produktionsorganismus von besonderem Interesse. Extrem problematisch ist die Einhaltung dieser Kriterien bei *open pond* Systemen, wo alle in der umgebenden Umwelt präsenten (Mikro-) Organismen eine potentielle Gefährdung darstellen, weshalb sich geschlossene Systeme zur Minimierung des Kontaminationsrisikos anbieten [Pulz 2001]. Insbesondere sind hier verschiedene Predatoren von Mikroalgen zu nennen, die enorme Produkteinbußen hervorrufen können [Chisti 2007], welche unter anderem auch durch einige Protisten-Spezies repräsentiert werden [Mutanda *et al.*, 2011]. Der Entschluss, den phototrophen Organismus *E. gracilis* für das Bio-raffineriekonzept auszuwählen, lag somit auch in dieser Problematik begründet. Sowohl die Größe des Organismus als auch die Fähigkeit im sauren Milieu mit ausreichender Wachstumsgeschwindigkeit zu wachsen, minimieren die Gefahren gefressen oder von anderen Spezies überwachsen zu werden. Weitere Merkmale, wie das Ansäuern des Mediums in der Wachstumsphase und ein rein autotrophes Medium minimieren weiter potentielle Gefahren durch Kontaminanten. Im Weiteren stellte sich die Frage, wie eine technische Anlage ausreichend keimarm gespült werden kann, um nahezu axenische Wachstumsbedingungen unter sauren Bedingungen zu Kultivierungsbeginn zu gewährleisten, wo eine geringe Zelldichte des Produktionsorganismus vorherrscht. Eine Dampfsterilisation einer technischen Anlage wäre hierbei weder wirtschaftlich noch materiell umsetzbar. Sollen bei diesem Bio-raffineriekonzept Freilandphotobioreaktoren aus Plastik realisiert werden, so wäre ein thermoplastisches Material nur bedingt geeignet für den Kontakt mit Heißdampf. Gravierender wären die Folgen im Bereich der Investitions- und Betriebskosten für eine weitläufige technische Anlage, wenn Niedrigwertprodukte wie Biokraftstoffe geringe Gewinnspannen ergeben und somit ein wirtschaftliches Ungleichgewicht entstünde. Sanitisierungen mit 0,5 bis 2,0 % (w/w) Wasserstoffperoxid wurden bei Sanitisierungen über Nacht mit dem intern illuminierten Blasensäulenreaktor mit den höheren Konzentrationen als tauglich befunden, stellen jedoch bei Anlagen im technischen Maßstab einen großen Kostenfaktor dar. Im Jahr 2014 bewegten sich die Preise hierfür stabil bei 400 bis 500 \$ t⁻¹ (30 % (w/w) *food grade* bis 50 % (w/w) *agricultural grade*, gefunden bei mindestens zehn Anbietern, zuletzt geprüft am 16.01.2016 bei alibaba.com). Somit wäre der Einsatz von 1 t H₂O₂ ausreichend für 50 m³ Medium bei Einsatz von 2 % (w/w) H₂O₂. Zusätzlich sind noch die Betriebskosten der Anlage während der Sanitisierung zu berücksichtigen. Ebenso produktionskostensteigernd würde es sich mit kommerziell erhältlichen Produkten verhalten, wie z.B. dem Kaltentkeimungsmittel Velocorin® von Lanxess, welches

auf Basis von Dimethyldicarbonat in Zellen eindringt und Enzyme inaktiviert, wobei überschüssiges Inaktivans in Methanol und Kohlenstoffdioxid zerfällt. Beide Zerfallsprodukte sind dabei in den Anwendungskonzentrationen wachstumssteigernd bei *E. gracilis*, was mit Versuchsreihen überprüft wurde (Kultivierungen mit Methanol nicht gezeigt).

Um keine zusätzlichen Kosten durch die Sanitisierung einer technischen Anlage zu generieren wurde eigens ein Sanitisierungskonzept entwickelt. Hierbei wurde das im Rahmen dieser Arbeit konzipierte Nährmedium EG5.1 verwendet, wobei die Hauptkomponenten in Säuren und Basen bereitgestellt wurden. Damit ergab sich die Möglichkeit, zunächst in das vorgelegte Wasser alle basischen Komponenten hinzuzufügen, was den pH je nach Prozesswasser (und dessen puffernder Salzgehalt bzw. Härtegrad) auf einen Wert von 10,5 bis 12,1 verschob und eine alkalische Lyse von Zellen induziert. Nach einer Haltedauer von mindestens 3,5 h wurden anschließend zügig alle sauren Komponenten addiert, wobei zusätzliche Salzsäure nötig war (je nach Wasserqualität 0,7 bis 1,2 mL L⁻¹ 37 % (w/w) HCl), wenn ein pH-Wert unter 3,0 erreicht werden sollte und mit 200 bis 300 \$ t⁻¹ (Salzsäure 30 % bis 50 % (w/w) *food grade/agricultural grade*, gefunden bei mindestens zehn Anbietern, zuletzt geprüft im Februar 2016 bei alibaba.com) ins gewicht fällt. Die schnelle Zugabe inaktiviert die bis dahin überlebensfähigen Organismen mit einer kontraktilen Vakuole, welche eine derart schnelle Anpassung nicht erreichen können. Erst am Ende dieses Prozesses werden auch die nötigen Vitamine und Nebenkomponenten dem Medium zugegeben, bevor die Inokulation des Systems erfolgen kann. Die Zusammensetzung der Mediumvariante ist in Tabelle 16 wiedergegeben. Praktisch ist hierbei, dass die Komponenten stark konzentriert vorliegen können wodurch auch bei großen Anlagen eine schnelle Portionierung erfolgen könnte. Bei technischen Anlagen wäre am Ende während der basischen Phase eine saure Abluftwäsche der Begasung von Nöten, um ausgasendes Ammoniak nicht aus dem System zu verlieren. Gleichzeitig erfolgt durch das Ammoniakgas eine Keimabtötung im Abluftsystem. Generell konnte eine drastische Reduktion von unerwünschten Keimen durch eine vorangehende Filtration (Sartoclean GF 0,8 + 0,65 µm Filterkartusche, autoklavierbar von Sartorius, Göttingen, BRD) des Prozesswassers erreicht werden. Deshalb wurden alle Sanitisierungen mit Unterstützung der Filtereinheit zwischen Wasserzulauf und Bioreaktor durchgeführt. Die Komponenten wurden konzentriert angesetzt und automatisiert mit Hilfe von Metrohm Titratoren (Dosimat 765, Metrohm GmbH, Filderstadt, BRD) in den Bioreaktor ohne weitere Behandlung gefüllt, welcher mit vollentmineralisiertem Wasser (6 L) befüllt war. Versuche mit Leitungs- bzw. Trinkwasser (der Stadtwerke Bielefeld, Entnahmestelle: Universität Bielefeld) ergaben ähnliche Ergebnisse bis auf die Notwendigkeit, geringfügig mehr Salzsäure hinzugeben, um einen pH unter 3,0 zu erreichen. Bei bekannter Pufferkapazität des Wassers wurde letztendlich auch die Salzsäure zu den sauren Komponenten hinzugefügt. Grundwasser als Prozesswasser mit hoher Eisenbelastung aus dem Raum Gütersloh musste zuvor eine Reduktion des Eisengehaltes durchlaufen, wobei das

Tabelle 16: Zusammensetzung des EG5.1 Mediums als Säure-Base-Version, welches für die Sanitisierung der intern illuminierten Blasensäulenreaktors verwendet wurde. Die Mengen entsprechen den Komponenten, die sonst als Salze eingewogen und gelöst wurden. Die Spurenelemente und Vitamine wurden wie im EG5.1-Medium verwendet (siehe Tabelle3).

Hauptbestandteile	Volumen / mL L ⁻¹	Eigenschaft
NH ₃ 25 % (w/w)	1,80	Basische Komponenten
10 M KOH (56,1 % (w/w))	0,73	
H ₂ SO ₄ 95 % (w/w)	0,21	Saure Komponenten ¹
H ₃ PO ₄ 85 % (w/w)	0,56	
Spuren (2000x)	0,5	
Eisenchlorid (10000x)	0,1	
Nebenbestandteile	Menge / g L ⁻¹	
EDTA 2Na 2 H ₂ O	0,011	Zugabe der Komponenten nach der Sanitisierung bzw. vor der Inokulation
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,03	
Vitamin B ₁ und B ₁₂	0,01 und 0,05	

¹ Zusätzlich ist Salzsäure wie beim normalen Medium nötig, um einen finalen pH von 3,0 zu erreichen.

Grundwasser mit Sauerstoff angereichert über wasserführende Schichten im Boden mit einer kommerziellen Anlage (Fermanox-Anlage, Baujahr 1993 der Winkelkemper GmbH, Wadersloh, BRD) gepumpt wurde. Um eine keimarme Abluftstrecke direkt am Reaktor zu erhalten, wurden die basischen Komponenten über den höchsten Punkt der Abluftstrecke in den Reaktor eingefüllt, weshalb in diesem Zeitraum die Begasung deaktiviert wurde. Bei den folgenden Haltedauern wurde die Begasung auf 0,5 vvm Luft eingestellt, damit der gesamte Kopfraum des Reaktors ausreichend mit den basischen Komponenten keimarm gespült wurde und benetzt blieb. Eine Kultivierung mit entsprechender Sanitisierung ist exemplarisch in den folgenden Abbildungen 80 und 81 dargestellt. Die Sanitisierungen wurden immer vor der jeweiligen Kultivierung durchgeführt. Zahlreiche Versuche mit verschiedenen Haltedauern haben hierbei gezeigt, dass die Keimreduktion sehr effizient verlief, wenn nach Zugabe der basischen Komponenten eine Haltedauer von mindestens 3,5 Stunden berücksichtigt wurde. Weiterhin zeigten Kultivierungen mit unterschiedlichen pH-Werten zwischen 2,3 bis 3,5 zu Beginn der Kultivierung, dass bei einem pH ≤ 2,6 insbesondere acidotolerante Pilze und Hefen in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit soweit minimiert wurden, dass sie von *E. gracilis* überwachsen werden konnten. Zu bedenken ist, dass mit zunehmenden Kultivierungsfortschritt der Organismus

E. gracilis zahlreiche Stoffe exkretiert, die als Nährstoffe für andere unerwünschte Organismen zweckdienlich sein können, die bis zu diesem Zeitpunkt im Bioreaktor ohne Wachstum überdauert haben. Bis sich eine für die potentiellen Keime nutzbare Konzentration dieser Stoffe für ein Wachstum einstellt, muss der pH-Wert der Kultur zu diesem Zeitpunkt ausreichend sauer sein, um ein Fremdwachstum zu unterbinden. Sobald die *E. gracilis*-Kultur einen pH-Wert von 1,9 - 2,2 erreichte, war das Risiko einer Kontamination selbst durch das Öffnen des Bioreaktors im Betrieb vergleichsweise mit Kultivierungen bei pH 7,0 extrem gering. In Abbildung 80 ist ein exemplarischer Sanitisierungsvorgang abgebildet. Auf die durchgeführte Sanitisierung folgte eine instationäre kontinuierliche Kultivierung von *E. gracilis* im EG5.1-Säure/Base-Medium mit Dauerbeleuchtung bei einem Durchlicht I_0 von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gemessen an einer weißen LED. Der Zulauf erfolgte mit bereits zusammengesetztem Medium. Die Inokulation dieser erfolgte bei Stunde 5,2. Der Verlauf dieser Kultivierung ist in Abbildung 81 dargestellt. Bereits nach der Inokulation wurde ein Durchlicht von $235 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gemessen und sank bis Tag sieben der Kultivierung auf $11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Der *online* gemessene pH-Wert sank in diesem Zeitraum auf pH 2,19 (*offline* von pH 3,35 auf 2,27). Ab Tag acht begann die kontinuierliche Phase mit einer Verdünnungsgeschwindigkeit von 0,17 bis $0,37 \text{ d}^{-1}$, wobei sich das Durchlicht von innen nach außen zwischen $0,60$ und $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und der pH-Wert zwischen 2,04 und 2,38 bewegte. Insgesamt ergab sich eine typische Kultivierung mit anfänglicher Satzphase und anschließender Zulauf-/Erntephase. Ab Tag 25 wurde deutlich, dass im Mittel Konzentra-

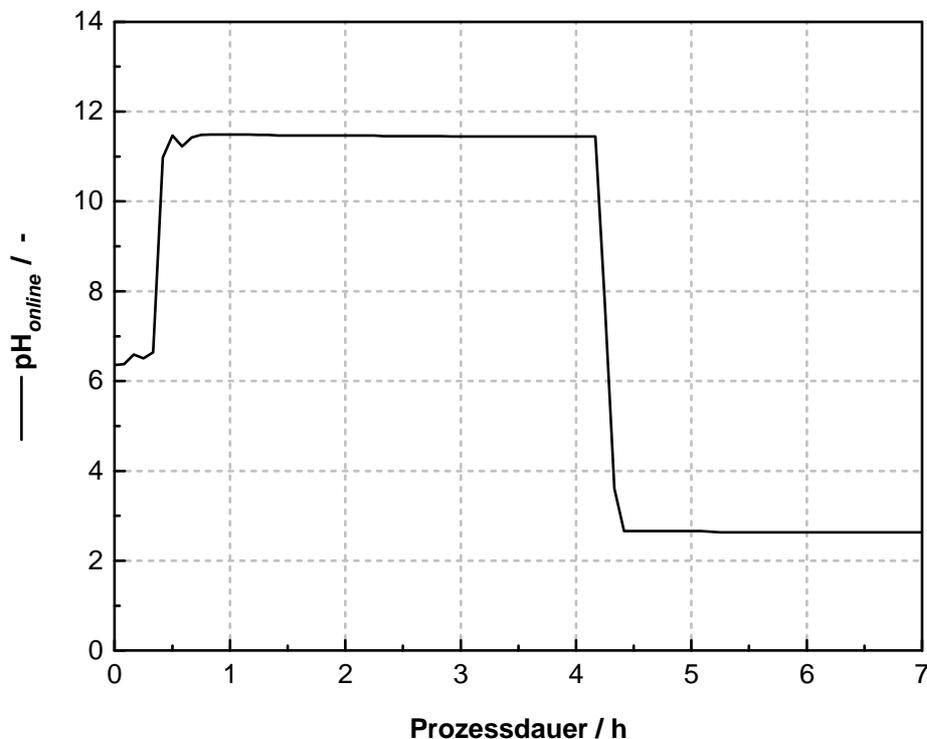


Abbildung 80: Sanitisierungsvorgang des intern illuminierten Blasensäulenreaktors durch pH-Verschiebung mit den Lösungen aus Tabelle 16 und entsprechenden Haltezeiten.

tionen von 1,50 - 1,80 g L⁻¹ Biotrockenmasse, 0,25 - 0,40 g L⁻¹ Paramylon und etwa 1,50 mg L⁻¹ α -Tocopherol generiert wurden. Bei zahlreichen Versuchen wurde festgestellt, dass es in nahezu allen Fällen Pilze oder Hefen waren, die eine Kontamination hervorgerufen haben und sich bei Ausgangs-pH-Werten >2,6 durchgesetzt haben. Lag nach fünf Tagen Kultivierung noch ein pH-Wert >2,5 vor, wo bereits ausreichend viele als Nährstoffe verwertbare Produkte durch *E. gracilis* exkretiert worden waren, war oftmals bei sichtbarem Auftreten anderer Mikroorganismen eine Persistenz dieser zu beobachten. Wurde der pH-Wert von 2,5 innerhalb kurzer Zeit unterschritten, stellte sich das Wachstum von Kontaminanten zunehmend ein. Nach dem Beginn der kontinuierlichen Phase stellte sich in der Regel ein pH-Wert um 2,2 und eine Auswaschung der Kontaminanten aus dem Kultivierungssystem ein. Ebenfalls wurde der Flachplatten-Photobioreaktor (dampfsterilisiert) für verschieden lange Zeiten am Stutzen geöffnet. Auch wenn ein oder zwei Stutzen über Nacht bei einer kontinuierlichen Kultivierung bei pH 2,2 offen blieben, stellte sich keine Kontamination ein. Die primäre Kontaminationsquelle schien bei den Versuchen somit durch Spülungen des Systems eingeschleppt worden zu sein, wenn mit unbehandeltem Wasser gearbeitet wurde und/oder beim Ablassen des Wassers keine angemessene Belüftung vorlag und über offene Stutzen Luft eingesogen wurde. Insgesamt waren bei den mehr als 50 Versuchen zur Sanitisierung und Keimfreiheit des Kultivierungssystems keine acidophilen Konkurrenten präsent, die bei den gewählten Bedingungen größere Wachstumsvorteile hatten als *E. gracilis*. Wenn Kontaminationen vorkamen, dann akkumulierte die kontaminierende Spezies am besten bei Satzkultivierungen, wo sich ausgeschleuste Stoffe von *E. gracilis* oder durch lysierte Zellen freigesetzte Zellprodukte als Nährstoffe anhäufte. Generell kann man davon ausgehen, dass die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination durch acidophile Bakterien vergleichsweise gering ist, da hauptsächlich eisen- oder schwefeloxidierende Gattungen diesen Bereich repräsentieren, wobei diese in der Regel anaerob wachsen [Hendrich und Johnson, 2013]. Wie auch durch eigene Experimente bestätigt wurde, ist die Kontaminationsgefahr eher von Hefen und Pilzen ausgehend, welche oftmals durch omniprésente Gattungen wie *Aspergillus*, *Penicillium* und *Trichoderma* [Gross und Robbins, 2000] zustande kommt.

Da mit diesem Bioraffineriekonzept auch schwefelbelastete Rauchgase als CO₂-Quelle genutzt werden sollen, ergibt sich die Notwendigkeit der Kultivierung einer zweiten Mikroalge (siehe 4.14), die die Rauchgase für *E. gracilis* konditioniert. Kultivierungen von *Galdiera sulphuraria* waren trotz großer Mengen an C-Quellen wie Glycerin oder Glucose absolut unproblematisch. Der pH-Wert lag zu Beginn dieser Kultivierungen bei 2,0 und sank während des Wachstums auf einen pH-Wert \leq 1,0. Der extreme pH-Wert sowie der hohe Anteil an Schwefel im Medium und Sauerstoff unterbanden das Wachstum anderer Organismen. Beachtlich ist trotzdem, dass bei allen Kultivierungen mit dieser extremophilen Rotalge der Bio reaktor vorher nicht sanitisiert, sondern nur mit dH₂O einmal gespült wurde.

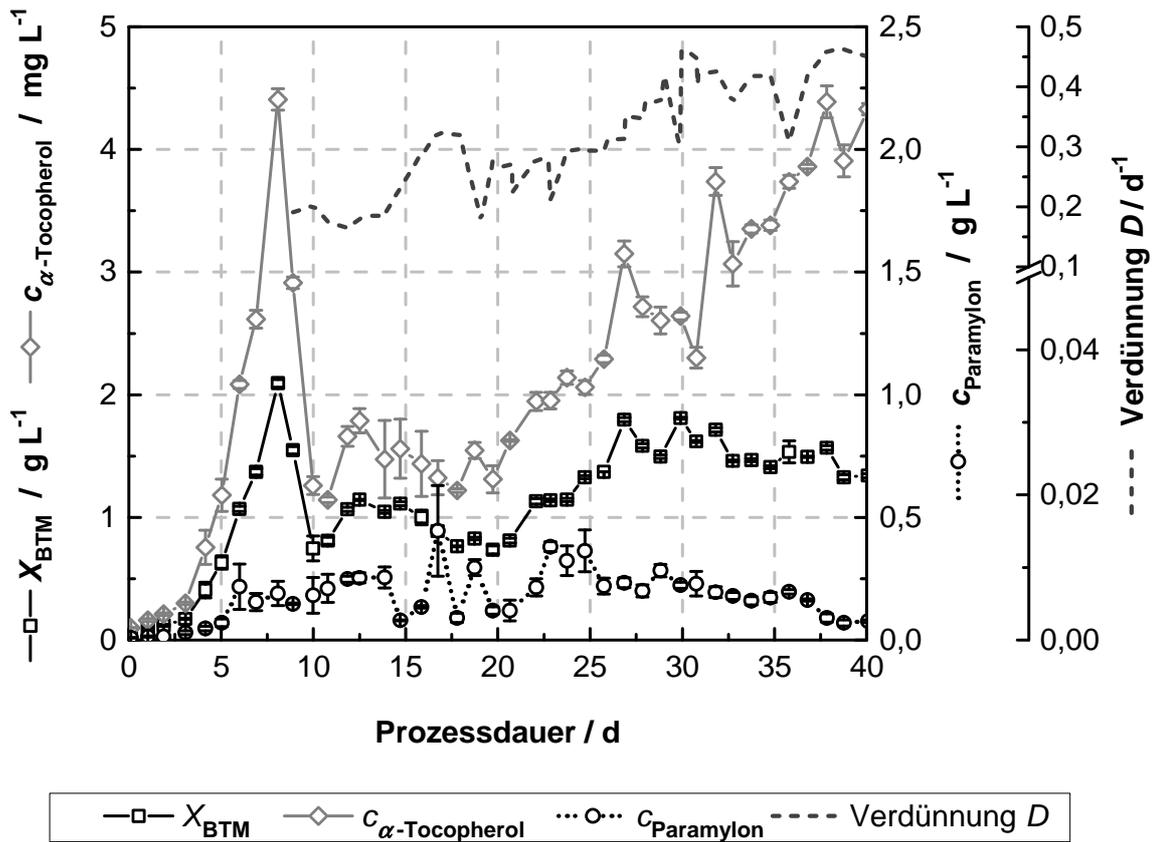


Abbildung 81: Verlauf einer kontinuierlichen Kultivierung von *E. gracilis* im intern LED-illuminierten Blasensäulenreaktor. In der Satzphase wurde das EG5.1-Medium als Säure-Base-Version zur vorigen Sanitisierung des Reaktorinhaltes verwendet. Zer Zulauf erfolge mit bereits zusammengesetztem Medium. Der Lichtfluss lag bei $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gemessen an einer weißen LED. Der Prozess wurde mit konstanter Kulturschichtdicke von 2,5 cm, einer Temperatur von $29 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem Gasvolumenstrom von 0,15 vvm mit 5 % (v/v) CO_2 und 95 % (v/v) Luft durchgeführt. Der Verlauf der Verdünnungsgeschwindigkeit wurde auf eine Ordinate mit Unterbrechung gelegt, um die Übersichtlichkeit zu verbessern.

4.11 *Downstream*

Die Ernte der Biomasse aus der Kulturbrühe stellt einen zentralen Kostenfaktor für ein Bioraffineriekonzept dar. Sie sollte somit möglichst wenig aufwendig umgesetzt werden können, wobei das Verfahren technisch skalierbar sein muss. Im Folgenden werden die hierzu ausgetesteten Verfahren beschrieben.

4.11.1 Flotation

Bei dieser Methode sollten mit Hilfe von Luftbläschen mit 10 bis 30 μm Durchmesser die Zellen aus der Kulturbrühe an die Oberfläche mitgerissen werden. Kleine Bläschen heften sich zum Teil an den großen Zellen an, wodurch sich die Feuchtbioasse zunehmend als konzentrierter Zellschaum ansammeln kann. Bei diesem Verfahren wurden laut Fachliteratur kombiniert mit Flokkulanzen Effektivitäten zwischen 60 % [Sim *et al.*, 1988] und 75 % [Schmack *et al.*, 2008] bezogen auf den Anteil abgeschöpfter Biomasse erreicht, wobei Sim und Kollegen mit einem Mikroalgenkonsortium und Aluminiumsalzen als Flokkulanz gearbeitet haben und die Schmack Biogas AG für die *Chlorella*-Spezies aus der *open pond*-Anzucht ein Flokkulanz (kommerziell erhältliche Polymer-Kombination) eingesetzt hat. Bei diesen Methoden stand die Flotation als Hauptmethode im Vordergrund und wurde mit den Flokkulanzen unterstützt.

Mit *E. gracilis* konnte eine Flotation bei Raumtemperatur ohne Flokkulanzen nicht sehr effektiv durchgeführt werden. Womöglich waren die Zellen zu groß oder ihre Form bzw. Oberflächenbeschaffenheit wirkte sich ungünstig auf die Schaumstabilität aus. Lohman und Pahl [1993] zeigten, dass runde Partikel (Glaskugeln) mit einem Durchmesser von 1 - 50 μm einen positiven Effekt auf die Schaumstabilisation. Weiterhin ist zu bedenken, dass ein Großteil der Zellen durch die Flagelle eine hohe Mobilität innerhalb der Hellphasen aufweist – welche auch nachts geringfügig vorliegt – und den Schaum entsprechend beeinflussen kann. Auch der pH hat einen Einfluss auf die Schaumstabilität [Chmiel 2011]. In weiteren Versuchen wurde deshalb nach dem Prinzip von Xanthan als Bierschaumstabilisator [Sutherland 1998] 1 g L⁻¹ gequollenes Paramylon (0,5 g mL⁻¹ in 0,1 M KOH in der Mikrowelle aufgekocht und beim Abkühlen auf pH 9 mit 0,1 M HCl eingestellt) den *E. gracilis* Kulturen mit einem pH von 2 bis 3 zugesetzt. Mit einem Mikrosparger aus Sintermetall (Porengröße > 10 μm) wurden diese fünf Tage alten Kulturen in 200 mL Ansätzen unterschiedlichen Volumenströmen ausgesetzt, um den Gasvolumenstrom für optimale Schaumbildung zu ermitteln. Hierbei ergaben geringe Volumenströme ≤ 1 vvm die besten Ergebnisse. Der in Abbildung 82 dargestellte Zell-Schaum wurde anschließend ausgewogen. Bei dieser Methode wurden nach 30 min 87 % der Zellen im Schaum wiedergefunden und 13 % der Zellen verblieben in der Suspension. Volumetrisch betrachtet konnte bei den Versuchen eine Reduktion um den Faktor 50 bis etwa 100 je nach Schaumbildung erreicht werden. Weitere Versuchsreihen zur Flotation wurden nicht durchge-



Abbildung 82: Flotation mit Druckluft und einer *E. gracilis*-Kultur mit 1 g L^{-1} Paramylon als Schaumstabilisator. Die Kulturbrühe wurde zuvor photoautotroph sechs Tage ohne circadianem Rhythmus kultiviert.

führt, da bei allen vorigen Durchführungen stets ein massiver Verlust an α -Tocopherol beobachtet wurde. Ebenfalls wiesen die Zellen aus der Schaumfraktion bei mikroskopischer Betrachtung kaum lebende Vertreter auf, weshalb vermutlich die Vitamin E-Konzentration durch den oxidativen Stress der Flotation dramatisch abgenommen hatte.

4.11.2 Flokkulation

Die Flokkulation von Mikroalgen als energiearme Unterstützung der Ernte ist weit verbreitet und gut dokumentiert [Milledge und Heaven, 2013]. Je nach Mikroalge, Konzentration und Art der Flokkulanz können mehr als 90 % der Biomasse flokkuliert werden [Grima *et al.*, 2002]. Dabei können zahlreiche verschiedene Flokkulanzen auf biologischer, metallischer oder synthetischer Basis angewandt werden, wie Chitosan, Eisen(III)-chlorid oder Magnafloc LT25 (BASF). Ebenso ist die Verschiebung des pH eine Möglichkeit eine Flokkulation hervorzurufen. Letztendlich existiert jedoch keine Flokkulanz, welche bei allen Mikroalgen uneingeschränkt wirkt. Mit *E. gracilis* wurde eine Flokkulation unter folgenden Gesichtspunkten untersucht: es sollte nicht toxisch und reversibel oder biologisch abbaubar zu sein, da die großen Mengen des abgetrennten Wassers mit Restmedienbestandteilen (im Weiteren als Restmedium bezeichnet) in diesem Bioraffineriekonzept ins System rückgeführt werden sollen. Eine entsprechende Verunreinigung würde sich somit sehr negativ auf die Nachhaltigkeit und die Ressourcen auswirken. Zudem sollte die Flokkulation auch motile Zellen ausreichend einschränken. Zu beachten war weiterhin, dass das potentielle Hochwertprodukt α -Tocopherol als antioxidatives Mittel entsprechend anfällig gegen harsche Methoden reagieren könnte, wenn beispielsweise oxidative Prozesse in den Zellen entstehen würden. Somit wurden Flokkulationsversu-

che mit Chitosan durchgeführt, welches aus dem Exoskelett von Krebstieren hergestellt wird, was eine nachwachsende Quelle darstellt. Ebenfalls wurden Bioflokulationsversuche in Kombination mit anderen Algenspezies durchgeführt. Dabei wurde mit einer laut Literatur nicht-flokkulierenden Mikroalge *Chlorella vulgaris* und einer flokkulierenden Mikroalge *Scenedesmus obliquus* gearbeitet, indem diese Kulturen jeweils mit einer *E. gracilis*-Kultur bei den finalen pH-Werten von 3,0, 5,0 und 7,4 (eingestellt mit 0,1 M NaOH) in verschiedenen Massenverhältnissen bei Raumtemperatur vermischt wurden [Salim *et al.*, 2011]. Ebenfalls wurde untersucht, ob eine pH-Verschiebung mit Hilfe von Natriumhydroxid bei *E. gracilis* flokkulierende Effekte aufzeigt, wie bei anderen Mikroalgen [Milledge und Heaven, 2013; Molina Grima *et al.*, 2013]. Ebenfalls wurde Ammoniak als Flokkulanz getestet, welches als Stickstoffquelle ohnehin bei der Ergänzung des Restmediums eingesetzt werden würde. Eine Flokkulation durch pH-Verschiebung kann durch zusätzlichen Entzug von CO₂ begünstigt werden [Sukenik und Shelef, 1984]. Im einfachsten Fall kann während des Vorgangs die Brühe mit Luft ohne zusätzlichen CO₂ begast werden.

Das Chitosan als Flokkulanz erbrachte bei den aus der Literatur orientierten Konzentrationen [Heasman *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 1985] bis 200 mg L⁻¹ keine effektive Abtrennung von *E. gracilis*. Vermutlich beeinflusste hierbei wieder die Motilität der Zellen das Ergebnis negativ. Eine Flokkulation durch pH-Verschiebung von 2,5 auf 9,0 mit 50 % (w/w) Natriumhydroxid mit anschließender Flotation bei Raumtemperatur war erfolgreich, erbrachte jedoch eine massive Zellyse mit dem Verlust zellinterner Bestandteile in die Mediumfraktion, wie aus Abbildung 83 ersichtlich wird. Erkennbar auf dem Bild sind zudem Kristalle und einzelne Paramylongranula. Es konnte in der flokkulierten Biomasse kein α -Tocopherol mehr nachgewiesen werden, wes-

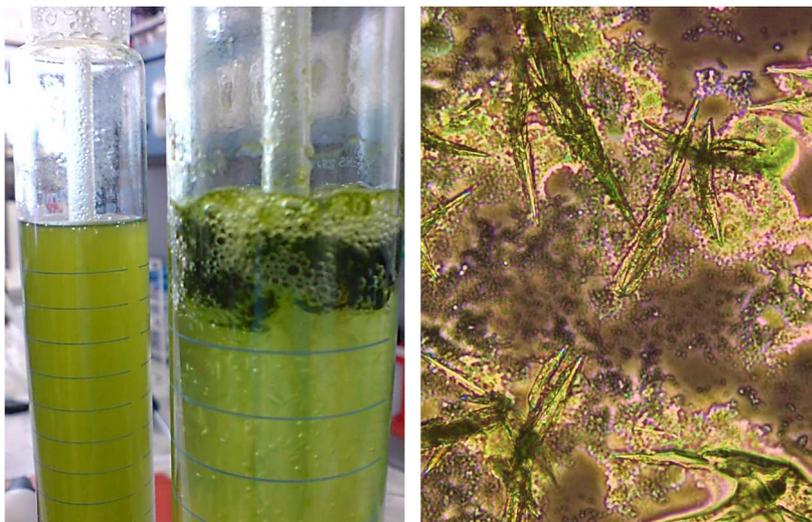


Abbildung 83: Flokkulation und Flotation einer *E. gracilis*-Kultur bei Raumtemperatur. **Links:** Mit Druckluft schwach begaste Referenzkulturbrühe und Kulturbrühe, welche mit 1 M NaOH auf pH 9,0 eingestellt wurde. Die Kulturbrühe wurde zuvor photoautotroph fünf Tage ohne circadianem Rhythmus kultiviert. **Rechts:** Mikroskopische Bild der mit NaOH behandelten Kulturbrühe (s. Text). Objektiv: 40x, Phase 2.

halb diese Strategie nicht weiter verfolgt wurde. Ein vergleichsweise besseres Flokkulationsverhalten konnte mit 25 % (w/w) Ammoniakwasser erreicht werden, was in Abbildung 84 deutlich wird. Das Versetzen der Kulturbrühe mit Ammoniak auf eine Endkonzentration von 0,4 % (w/w) bzw. $\text{pH} \geq 9,0$ erbrachte eine effektive Flokkulation der Biomasse. Bereits 25 min ab Zugabe des Ammoniakwassers war die Biomasse sowohl flokkuliert, als auch fast vollständig sedimentiert. Hierbei wurden die Gefäße nach elf Minuten einmalig invertiert. In Bezug auf die α -Tocopherolkonzentration verglichen mit einer Referenz ist zu beachten, dass die flokkulierte Biomasse zügig verarbeitet werden muss, da die Bedingungen bei $\text{pH} 9,0$ zu Lasten der Zellstrukturintegrität gehen. Da eine rasche pH -Änderung von 2,5 auf 9,0 den Zelltod vieler Zellen verursachte, ist letztendlich auch die Qualität der Kultur hinsichtlich der Hochwertprodukte wie α -Tocopherol betroffen, da zunehmend oxidative Bedingungen bei der Zellyse das vorhandene Tocopherol oxidieren. In Abbildung 85 wird deutlich, dass die Zellen durch die Flokkulation mit Ammoniak nach weniger als einer Stunde begannen zu lysieren. Zudem war eine Veränderung der Chloroplasten sichtbar. Da offensichtlich der alkalische pH -Wert von 9,0 die sinkende Viabilität der Zellen verursachte, wurde versucht eine Kombination aus nahezu neutralem pH , bei dem die Zellen problemlos überleben können und Chitosan als Flokkulanz zu verwenden. Es wurden jeweils 10 mg L^{-1} Chitosan und 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,5 und $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ 25 % (w/w) Ammoniakwasser untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Kombination aus Chitosan und einem pH von 8,0 eingestellt durch $2,5 \text{ mL L}^{-1}$ 25 % (w/w) Ammoniakwasser bereits ein deutlicher Flokkulationseffekt eintrat, bei dem die Zellen keine Lyseer-

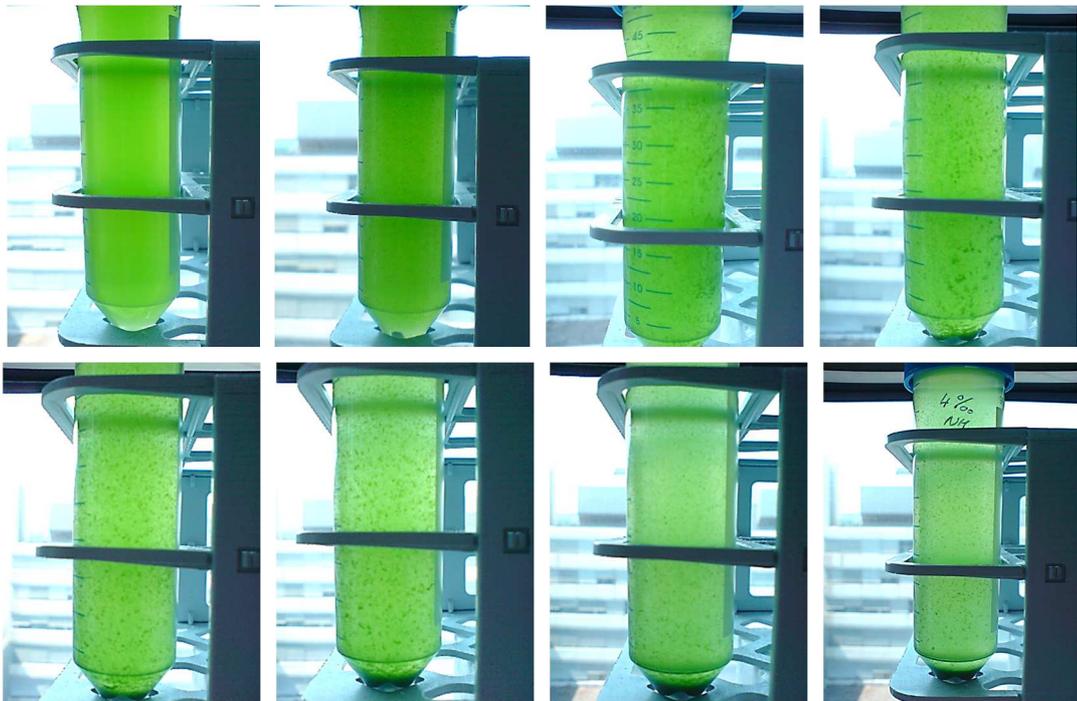


Abbildung 84: Flokkulation von *E. gracilis* mit 0,4 % (w/w) Ammoniak bei Raumtemperatur. Die Kulturbrühe wurde zuvor photoautotroph fünf Tage ohne circadianem Rhythmus kultiviert. Fotoreihe von links oben nach rechts unten: ab $t = 0 \text{ min}$ alle 4 min eine Aufnahme.



Abbildung 85: Mikroskopische Aufnahme von *E. gracilis* Zellen etwa eine Stunde nach der Flokkulation mit 0,4 % (v/v) Ammoniak. Zu erkennen ist ein vermutlich eintretendes *blebbing* der Zellen als Reaktion auf die widrigen Umgebungsbedingungen. Objektiv: 20x, Phase 2.

scheinungen aufwiesen. Dabei ergaben die Flokkulationsergebnisse bei Kulturen, die vier, sechs und acht Tage kultiviert wurden, stets ein identisches Bild hinsichtlich der Flokkulationseffizienz. Exemplarisch sind die Ergebnisse der sechs Tage alten Kultur in Abbildung 86 dargestellt. Die Zugaben geringer Ammoniakwasservolumina von 0,1 bis 1,0 mL L⁻¹ bewirkten dabei weder eine starke pH-Verschiebung noch eine Induktion der Flokkulation, während die Applikation von 2,5 und 5,0 mL L⁻¹ eine nahezu vollständige Flokkulation nach sich zogen. Diese beiden in der Abbildung 86 mit (E) und (F) gekennzeichneten Ansätze wiesen nach bereits 25 min eine fast vollständige Sedimentation auf. Bei diesen Ansätzen wurde das Restmedium abgesogen und auf sein Restbiomassegehalt geprüft. Hierbei konnten bei allen Wiederholungen (N=4) ≥ 97 % der Biotrockenmassekonzentration im flokkulierten Sediment wiedergefunden werden, wobei als Referenz stets die gleiche Kultur mit Chitosan jedoch ohne pH-Verschiebung verwendet wurde. Dabei spielte es für die Effizienz keine Rolle, ob als Ausgangsmaterial eine ältere oder jüngere Kultur verwendet oder ob eine Biotrockenmassekonzentration zwischen 1,7 oder 4,3 g L⁻¹ eingesetzt wurde. Bei weiteren Untersuchungen wurde eine entsprechende Menge 25 % (w/w) Ammoniakwasser zugegeben, mit der die pH-Werte 6,0 und 8,0 eingestellt wurden. Hierbei zeigte sich wiederholt, dass ab pH 7,5 eine Flokkulation mit 10 mg L⁻¹ Chitosan eingeleitet werden konnte. Nach weiterer Aufarbeitung wiesen die Ansätze bei pH 7,5 identische α -Tocopherolkonzentrationen auf, wie die jeweilige Referenz. Eine Kombination der pH-Verschiebung mit Chitosan-Einsatz zur Flokkulation von Mikroalgen ist in der Literatur beschrieben, jedoch werden für derart hohe Flokkulationseffizienzen bei *Chlo-*

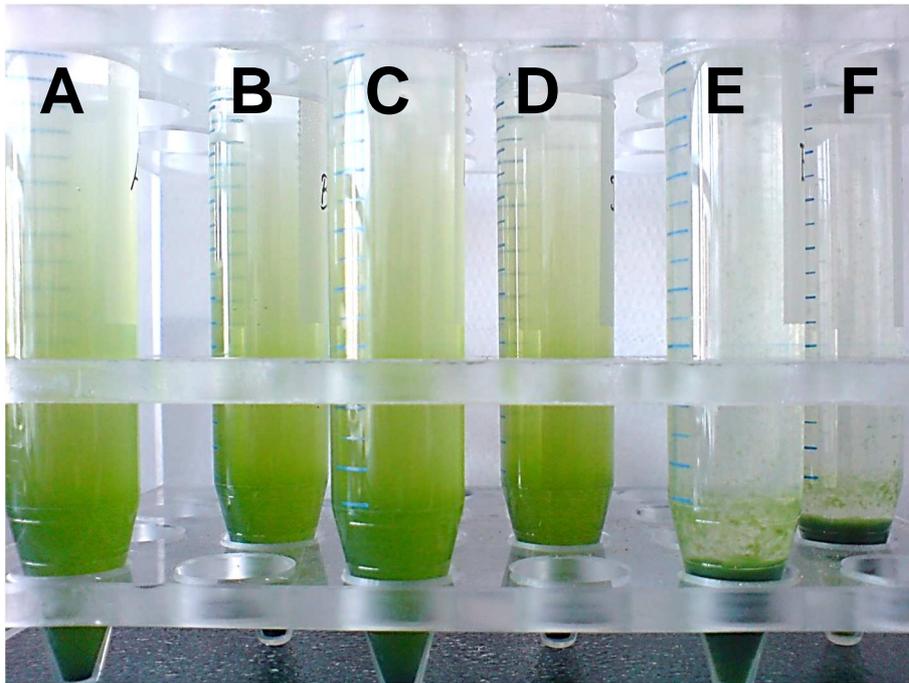


Abbildung 86: Flokkulation von *E. gracilis* mit Ammoniakwasser und 10 mg L^{-1} Chitosan. Abgebildet ist die Kulturbrühe von *E. gracilis* 25 min nach Zugabe des Ammoniakwassers. Endkonzentration von Ammoniakwasser (*w/w*): A: 0,01 %, B: 0,02 %, C: 0,05 %, D: 0,1 %, E: 0,25 % und F: 0,5 %. pH-Verschiebung anhand von pH-Papier: **A - C:** bis pH 3, **D:** pH 4,5, **E:** pH 8 und **F:** pH 10.

rella-Spezies mindestens 40 mg L^{-1} Chitosan bei einem pH von 7,1 eingesetzt, wobei die Kulturen initial einen pH von 9,5 aufwiesen. Andere Stämme, wie *Skeletonema costatum*, *Dunaliella tertiolecta*, *Thalassiosira nordenskoldii*, *Tetraselmis chui*, *Thalassiosira pseudonana*, *Isochrysis* sp. und weitere bedurften zur Flokkulation Konzentrationen von 40 bis 150 mg L^{-1} an Chitosan. Dabei zeigten einige Spezies generell sehr schlechte Flokkulationseigenschaften wie *Skeletonema costatum* oder *Pavlova lutheri* [Morales *et al.*, 1985; Heasman, 2000]. Weiterhin ist zu bedenken, dass bei den in der Literatur beschriebenen Vorgehensweisen mit kationischem Chitosan gearbeitet wurde und die Bestimmung der Effizienz nach mehreren bis 24 Stunden Sedimentation erfolgte. Es ist jedoch bekannt, dass eine Flokkulation mit Chitosan im pH-Bereich von 4,0 - 7,0 nicht eintritt [Harith *et al.*, 2009; Sirin *et al.*, 2012]. Bezogen auf die Erntekosten würde das Chitosan je nach Reinheit des Materials zwischen 2 und $100 \text{ \$ kg}^{-1}$ liegen [Sirin *et al.*, 2012].

4.11.3 Sedimentation

Bei der Sedimentation von *E. gracilis* lag zum Zeitpunkt der Versuche keine Fachliteratur hinsichtlich verfahrenstechnischer Methoden vor. Deshalb wurden zunächst Sedimentationsversuche der mobilen Zellen in einer Kammer betrachtet, um das Verhalten der Zellen einer motilen Kultur in plötzlicher Dunkelheit abschätzen zu können. In den Abbildungen 87 a und b sind die Ergebnisse der in der speziell konstruierten Sedimentationskammer durchgeführten

Versuche in Form von Fotoreihen dargestellt. Im Hintergrund der Reagenzgläser wurde eine Skalierung angebracht, deren, mittels Ziffern beschrifteten Hauptstriche der Einheit Zentimeter entsprachen. Die verwendete Zellsuspension wurde aus einer kontinuierlich betriebenen photoautotrophen Kultivierung entnommen. In Folge dieser Prozessführung wies die entnommene Biomasse bei jeder Sedimentation annähernd eine identische BTM-Konzentration auf und ge

(a)



(b)

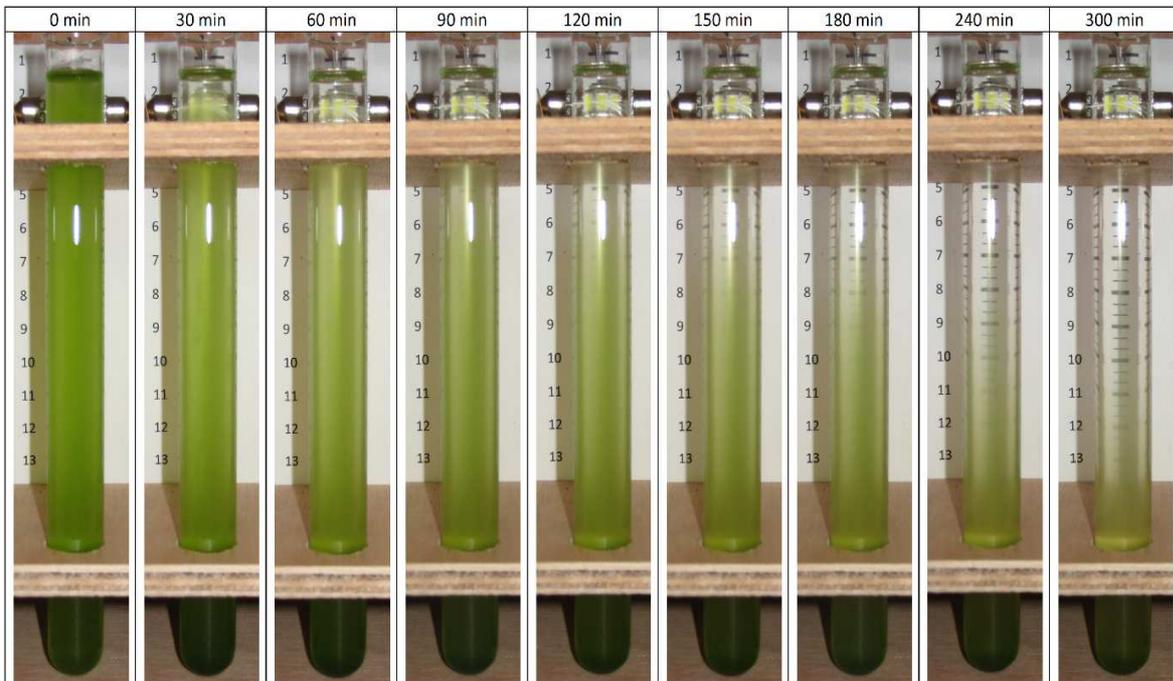


Abbildung 87: Sedimentationsreihen in Reagenzgläsern mit *E. gracilis* aus einer kontinuierlich beleuchteten Kultivierung. **Oben (a):** abgedunkelt bei 25 °C. **Unten (b):** abgedunkelt bei 4 °C.

währleistete so die Vergleichbarkeit der einzelnen Sedimentationsexperimente. Die in der Abbildung 87 a dargestellte Fotoreihe zeigt den Verlauf einer Sedimentation, die in der vollkommen abgedunkelten Kammer bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt wurde. Es ist zu erkennen, dass die Zellkonzentration am unteren Ende des Reagenzglases im Verlauf des Versuches deutlich zunimmt, während der obere Bereich immer weniger Biomasse enthält. Dieses Ergebnis veranschaulicht, dass auch *E. gracilis* aus einer kontinuierlich beleuchteten Kultur in Dunkelheit sedimentiert und sich demnach das Verfahren zur Biomasseabtrennung generell eigenen sollte. Nach der Umrechnung der Versuche über 5 h ergab sich eine mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit von 1,1 cm h⁻¹ bei 25 °C. Für die Versuche wurden Zellen ohne einheitlichen circadianen Rhythmus verwendet, was einen unerwünschten Verteilungseffekt unterstützte. Ein Vergleich mit der in Abbildung 87 b dargestellten Fotoreihe verdeutlicht den positiven Effekt der Temperaturabsenkung auf die Motilität der Zellen – da bei der Durchführung beider Experimente nur der Faktor Temperatur verändert wurde – und sich eine mittlere Geschwindigkeit von 2,2 cm h⁻¹ ergab. Da dieses Ergebnis dem Sedimentationsverhalten unbeweglicher Partikel entspricht scheint die Temperatur von 4 °C die Bewegungsfähigkeit der Zellen stark einzuschränken und verbessert dadurch erheblich das Resultat der Sedimentation. Die Kühlung einer technisch dimensionierten Anlage auf ähnliche niedrige Temperatur wäre jedoch bei den in Deutschland vorherrschenden klimatischen Bedingungen äußerst energieaufwendig und deshalb unwirtschaftlich. Jedoch zeigten die Versuche, dass die Motilität der Zellen die Sedimentation beeinflusste. Bei den abgebildeten Versuchen konnte kein Verlust an α -Tocopherol verglichen mit der Referenz ermittelt werden.

Versuche bei 37 °C oder mit hitzeschlag-behandelten Zellen (5 s bei 90 °C Durchlauf durch einen Silikonschlauch im Wasserbad) ergaben eine im Vergleich schnellere Sedimentation jedoch mit Einbußen der α -Tocopherolkonzentration (Bilder und Daten nicht gezeigt). Versuche mit einer Lichtquelle am Bodenbereich der Sedimentationsbehälter bewirken keine schnellere Ansammlung der Zellen durch die positive Phototaxis, da die Wärmeentwicklung der Lichtquelle trotz Ventilation eine entsprechende Konvektion der Flüssigkeit bewirkte (Bilder nicht gezeigt). Durch die nicht einheitliche Sedimentation der Zellen konnte letztendlich keine genaue Sedimentationskonstante ermittelt werden. Somit wurden die weiteren Versuche im größeren Maßstab mit Abschätzungen aus diesen Vorversuchen durchgeführt. Insgesamt können die Ergebnisse der motilen Zellen schlecht mit der Literatur verglichen werden, wo für verschiedenartige Zellen bis 30 μ m Geschwindigkeiten von 0,1 bis 2,6 cm h⁻¹ ermittelt wurden [Choi *et al.*, 2006]. Es wurde nachfolgend das Verhalten in einer Sedimentationssäule betrachtet, welche mit Biomasse aus einer kontinuierlichen Kultivierung mit Dauerbeleuchtung beschickt wurde.

4.11.4 Sedimentationssäule

Bei der Sedimentationssäule wurde *E. gracilis*-Kulturbrühe mit einer Biotrockenmassekonzentration von 0,40 bis 0,60 g L⁻¹ aus einer kontinuierlichen Kultivierung (siehe Anhang 7.1) mit 50 bis 65 mL h⁻¹ über ein Silikonschlauch (ID 1 mm) in ein Borosilikatrohr (Länge 1 m, ID 40 mm) eingeleitet, wo der Silikonschlauch etwa 15 cm vor dem Trichterförmigen Boden endete. In ersten Versuchen wurde die Biomasse nach drei- oder mehrtägiger Bestückung entnommen und wies eine deutliche Konzentrierung auf. Der lange Aufenthalt der Zellen im Sediment ging jedoch stark zu Lasten der Viabilität und damit einhergehend zum Einbruch in der α -Tocopherol- und Paramylonkonzentration. Deshalb wurde eine tägliche Ernte des Sediments realisiert. Ziel dieses Versuches war es zu prüfen, ob eine permanente Sedimentation während des Prozesses sinnvoll war und inwieweit die motilen Zellen entgegenwirkten. Abbildung 88 demonstriert die konstruierte Sedimentationssäule. Dabei wurde die Kulturbrühe von oben aus der kontinuierlichen Kultivierung gasfrei durch den Silikonschlauch mit Hilfe einer Peristaltikpumpe gepumpt. Während ein Großteil der Zellen bei einer Raumtemperatur von 22 bis 24 °C sichtbar zu Boden sank, wurde der nahezu zellfreie Medienüberstand oberhalb des Rohres im Überlauf aufgefangen. Um phototaktische Effekte der Zellen zu minimieren, wurde das Rohr vollständig verdunkelt. Sollte somit die negative Gravitaxis, wie sie in *E. gracilis* im Tag-Nacht-Rhythmus in den Hell-Phasen vorliegt eine Rolle spielen, würde das Phänomen deutlich durch eine Grünfärbung sichtbar werden [Brinkmann 1966, Schnabel 1968a]. In Abbildung 88 ist zu erkennen, dass die Sedimentation von *E. gracilis* bei einer Temperatur von 22 bis 24 °C durchaus möglich ist. Dabei konnten einige Zellen beobachtet werden, die bis zur Mitte des Rohres nach oben vordrangen, was zum Teil auch durch eine Wärmekonvektion im Rohr verursacht wurde. Die Kulturbrühe konnte jedoch nicht exakt auf eine konstante Temperatur im Rohr statisiert werden.



Abbildung 88: Betrieb einer Sedimentationssäule mit Kulturbrühe aus einer kontinuierlichen Kultivierung mit *E. gracilis*.

Auch tageszeitabhängige Schwankungen der Temperatur im Raum beeinflussten die Effizienz. In Abbildung 89 sind exemplarisch die Ergebnisse aus einem Sedimentationsversuch dargestellt. Es wird deutlich, dass nach einer Anlaufzeit von einem Tag das System abgedunkelt auch bei Raumtemperatur effektiv arbeiten kann. In dieser Zeit erfolgte die Beschickung des Rohres mit einer Kulturbrühe mit einer Biotrockenmassekonzentration von durchschnittlich $0,50 \text{ g L}^{-1}$ ($0,40$ bis $0,60 \text{ g L}^{-1}$) direkt aus dem Bioreaktor. Der Zulauf orientierte sich dabei an der Verdünnungsgeschwindigkeit der Kultur im Reaktor. Im Überlauf bzw. Restmedium konnten in der Regel Biotrockenmassekonzentrationen von $0,02$ bis $0,05 \text{ g L}^{-1}$ ermittelt werden, mit einem Ausreißer am Tag drei von $0,22 \text{ g L}^{-1}$. Dieser geht einher mit einer Temperaturerhöhung im Raum, welche wetterbedingt etwa 3 °C über dem Durchschnitt von 23 °C gelegen hatte. Im Sediment wurden Biotrockenmassekonzentrationen von $22,43$ bis $30,03 \text{ g L}^{-1}$ vorgefunden. Lässt man die Probenahme am Tag eins außer Acht, so bewegte sich die Konzentration im Sediment zwischen $26,50$ und $30,03 \text{ g L}^{-1}$, was einer 53 bis 60-fachen Konzentrierung über das Gewicht entspricht. Die geerntete Biomasse wurde weiterhin auf ihre α -Tocopherolkon-

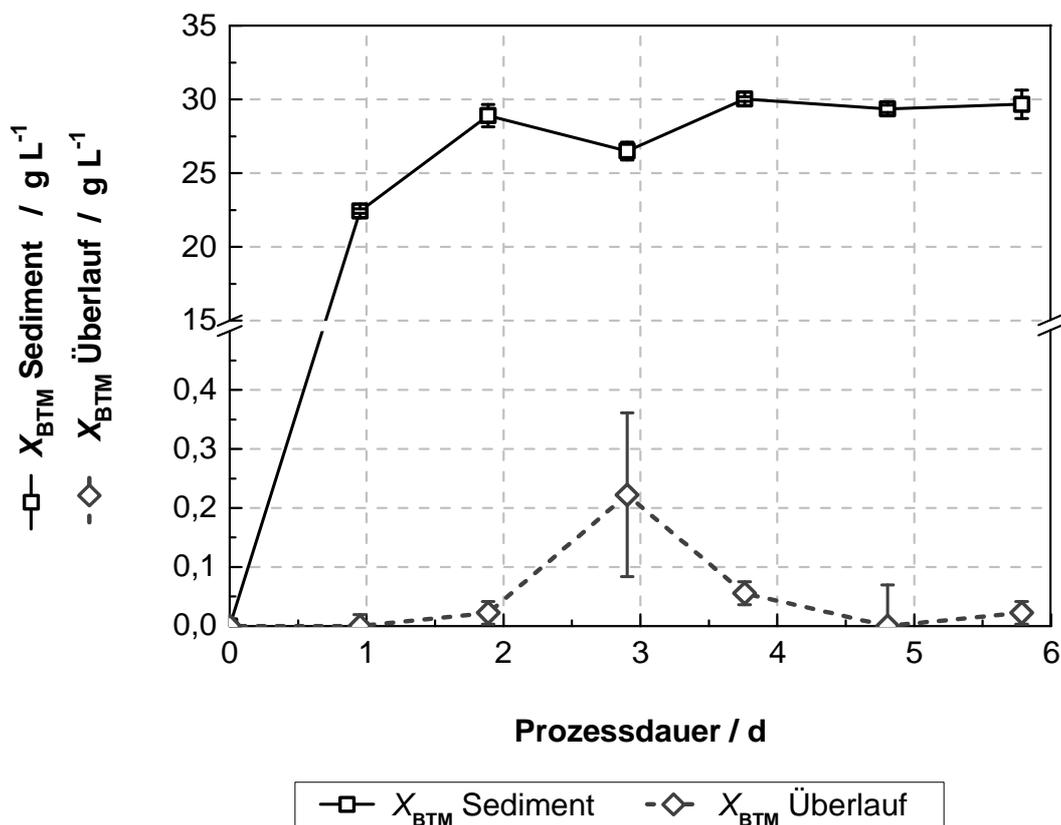


Abbildung 89: Entwicklung der Biotrockenmassekonzentrationen einer kontinuierlichen Sedimentation bei Raumtemperatur von *E. gracilis* im Sedimentationsrohr mit Biomasse aus einer kontinuierlichen Kultivierung (siehe Anhang 7.1). Die Ordinate wurde zur besseren Übersichtlichkeit unterbrochen.

zentration untersucht, da sich suboptimale Bedingungen für die Zellen insbesondere bei diesem antioxidativen Molekül bemerkbar machen konnten, wie andere Erntemethoden zeigten.

In Abbildung 90 sind die spezifischen α -Tocopherolkonzentrationen der beiden Fraktionen wiedergegeben. Es ergaben sich Selektivitäten um $0,5 \text{ mg g}^{-1}$ im Sediment, was identisch zu den Werten der Biomasse aus der schwach illuminierten kontinuierlichen Kultivierung war (siehe Anhang 7.1). Im Überlauf wies die α -Tocopherolkonzentration fast kaum quantifizierbare Werte auf, außer um Tag drei herum, wo diese auf $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ angestiegen sind. Betrachtet von der Seite der spezifischen α -Tocopherolkonzentration nähren sich die Werte von Sediment und Überlauf an, was ein Hinweis darauf ist, dass die Zellen innerhalb der Erntezyklen bezogen auf das Vitamin E qualitativ nicht sehr stark voneinander abweichen. Bei weiteren Erntereihen wurde deutlich, dass die Verweildauer der Zellen im Sediment ausschlaggebend war für die

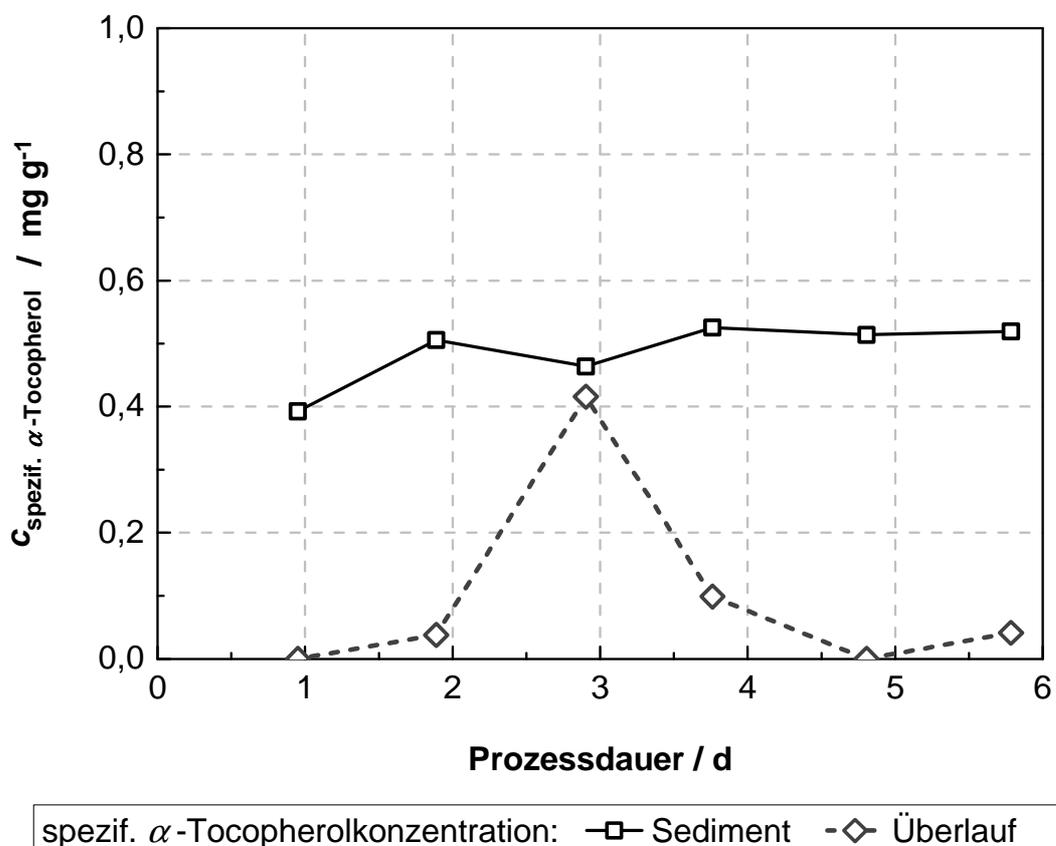


Abbildung 90: Entwicklung der spezifischen α -Tocopherolkonzentrationen bezogen auf die Biotrockenmassekonzentrationen einer kontinuierlichen Sedimentation von *E. gracilis* im Sedimentationsrohr bei Raumtemperatur und Biomasse aus einer kontinuierlichen Kultivierung.

α -Tocopherolkonzentration. Weiterhin wurde deutlich, dass einfache Sedimentationssysteme sehr anfällig auf Temperaturschwankungen reagieren. Weitere Versuchsreihen mit unterschiedlichen Veränderungen am Aufbau erhärteten den Einfluss der Temperaturabhängigkeit und der resultierenden Konvektion in der Sedimentationssäule. Nichtsdestotrotz zeigte sich mit einem einfachen Aufbau das große Potential, wenn als Erntemethode eine Sedimentation eingesetzt wird und wurde deshalb ins Bioraffineriekonzept als die Hauptmethode aufgenom-

men und weiterentwickelt. Zumal durch eine repetitive Prozessführung und einer Sedimentation bei Nacht mit geringeren Temperaturen sich diese Abhängigkeit relativieren sollte [Brinkmann 1966, Terry und Leland, 1970].

4.11.5 Zellabsetzer

Die bereits beschriebenen Experimente zur Sedimentation sollten die reine Sedimentationsfähigkeit von *E. gracilis* in künstlicher Umgebungen belegen. Das natürliche Bewegungsverhalten des Organismus im circadianem Rhythmus wurde bereits eingehend untersucht [Brinkmann 1966; Cook 1966; Schnabel 1968a; Schnabel 1968b; Yee *et al.*, 1988 und Lebert *et al.*, 1999]. Diese Erkenntnisse wurden logisch mit dem Bioraffineriekonzept verknüpft. In Bezug auf die Ernte sollte diese bevorzugt in den Dunkelphasen, also nachts erfolgen. Zum einen kann dann die maximale Leistung von Freilandreaktoren im Bezug auf die Sonneneinstrahlung genutzt werden. Zum anderen ist nachts die Außentemperatur in der Regel niedriger, was im Allgemeinen besser sowohl für die Qualität der Biomasse hinsichtlich Lyse- und Fäulnisprozesse als auch für die Sedimentationseffizienz wäre [Brinkmann 1966, Terry und Leland, 1970]. Die bereits genannten Autoren zeigten in ihren Arbeiten die Anpassung von *E. gracilis* an Hell/Dunkel-Zykluszeiten wie auch Temperaturzyklen mit einer maximalen Beweglichkeit am Tag und einer stark verminderten Dunkelbeweglichkeit. Die viel geringere Dunkelbeweglichkeit kann dabei zusätzlich die Ernte durch Sedimentation bei Nacht unterstützen. Da sich aus den Sedimentationsversuchen eine möglichst kurze Verweilzeit der Biomasse im Sediment als positiv für die Qualität und Quantität potentieller Hochwertprodukte herausstellte, wurde ein Zellabsetzer im Kleinmaßstab konstruiert, welcher Zellen mit Tag/Nacht-Rhythmus jeweils in der Dunkelphase konzentrierte. Für die Versuche wurden 3 bis 10 L Kulturbrühe eingesetzt. Durch den Einsatz eines größeren Vorlagevolumens, als für den Versuchsdurchlauf nötig waren, konnte die Kulturbrühe bis zum Ende eines jeden Versuches ausreichend homogen im Vorlagegefäß gerührt werden. Deshalb wurden die Biotrockenmassekonzentration nach dem Prozess von der Vorlage, dem Überlauf und der Ernte nach einfacher Passage gemessen. Die gerührte Vorlage wurde sowohl zu Beginn, als auch zum Ende eines jeden Durchlaufes beprobt und zeigte bei allen Versuchen identische Ergebnisse. Da für eine *E. gracilis*-Zellkonzentrierung in einem Zellabsetzer keine Informationen zur Verfügung standen, wie stark ein Vibrationsimpuls sein muss, um an den schrägen Sedimentationsflächen liegende Zellen nach unten in den Auslauf zu rütteln, wurde eine Vibrationseinheit mit einer Stromstärke von 0,6 A (bei 230 V bei 6000 min⁻¹ bzw. 0,14 kW) eingesetzt. Kommerziell erhältliche Geräte von Biotechnology Solutions hingegen haben eine Stromstärke von 0,2 bis 0,3 A im verwendeten Maßstab. Im Vorfeld wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um geeignete Parameter für einen kontinuierlichen Sedimentationsprozess zu finden, ohne dass eine Stauung der Biomasse am Ernteausgang vorlag oder Zellen einen Biofilm auf den Sedi-

mentationsflächen in zwölf Stunden Betrieb aufbauen konnten, der bei einer normalen Spülung Rückstände hinterließ. Variiert wurden dabei die Fließgeschwindigkeiten der Zulauf- und Erntepumpe, aber auch das Intervall zwischen zwei Vibrationsimpulsen. Die Impulsdauer selbst wurde zunächst bei 1 s belassen. Sollten sich die Vibrationsimpulse als zu stark erweisen, bestand immer die Möglichkeit die Vibrationseinheit über einen Abstandhalter distanzierter am Zellabsetzer zu installieren, um so die Impulsstärke zu minimieren. Es wurde darauf geachtet, viabele Zellen frisch aus einer Kultivierung für die Versuche einzusetzen. Insgesamt hat die Konzentrierung der Zellmasse optimal bei Zulaufgeschwindigkeiten von 100 bis 200 mL h⁻¹ funktioniert, was 15 bis 30 % des Gesamtvolumens ($V_{\text{Absetzer}} = 670 \text{ mL}$) des Absetzers beträgt. Nachdem sich an die notwendigen Einstellungen des Absetzers zur Sedimentation von *E. gracilis* angenähert wurde, sind Durchläufe unter wiederholt gleichen Bedingungen unternommen worden, um die Reproduzierbarkeit oder Korrelationen zu überprüfen. In Tabelle 17 sind einige der erprobten Bedingungen abgebildet, welche die Zusammenhänge deutlich machen. Dabei ist zu beachten, das zu Beginn eines jeden Durchlaufes das System bereits mit Wasser befüllt war und zum Ende eines jeden Durchlaufes das System nicht mit Wasser gespült wurde, um

Tabelle 17: Prozessparameter und Ergebnisse von Sedimentationsversuchen mit *E. gracilis* im circadianem Rhythmus (14:10 h H/D) mit Hilfe eines Zellabsetzers. Intervall- u. Dauer: Ruheintervall in Minuten und Vibrationsintervall in Sekunden. Konzentrierung über V : Quotient aus dem Erntevolumen und Zulaufvolumen. Konzentrierung über X_{BTM} : Quotient aus der Biotrockenmassekonzentration der Ernte und vom Zulauf. Die Volumina vom Zulauf und der Summe von Überlauf und Ernte sind nicht deckungsgleich (Details siehe Text).

Nr.	Intervall- u. Dauer / min / s	Fraktion	\dot{V} / mL h ⁻¹	V_{Gesamt} / mL	X_{BTM} / g L ⁻¹	Konzentrie- rung über V	Konzentrie- rung über X_{BTM}
1	19,11/1	Zulauf	147,7	2960,0	0,5	2,0	1,4
		Überlauf	80,6	1270,0	0,1		
		Ernte	67,2	1450,0	0,7		
2	19,16/1	Zulauf	166,5	3430,0	0,3	23,8	35,6
		Überlauf	159,5	3190,0	0,2		
		Ernte	7,0	140,0	8,9		
3 ¹	60/60	Zulauf	225,3	3830,0	0,3	21,1	32,7
		Überlauf	214,6	3649,0	0,2		
		Ernte	10,7	181,0	9,5		
4 ¹	20/60	Zulauf	213,6	2421,0	0,5	19,2	17,3
		Überlauf	195,7	2217,0	0,1		
		Ernte	11,1	126,0	8,8		
5 ¹	20/30	Zulauf	240,5	2482,0	1,0	20,1	9,4
		Überlauf	226,6	1926,0	0,0 ²		
		Ernte	11,9	102,0	9,3		

¹ Die Vibrationseinheit wurde mit einem Abstandhalter 30 cm entfernt am Zellabsetzer montiert

² Die Biotrockenmassekonzentration lag bei 0,02 g L⁻¹

alle Zellen auszuwaschen. Letzteres hätte die Ergebnisse des Konzentrierungseffektes verfälscht. Deshalb sind die Volumina vom Zulauf und der Summe bzw. Bilanz der Ernte und Überlauf nicht absolut deckungsgleich. Da die Zellen nicht in einem kompakten Sediment, wie in der Sedimentationsäule verbleiben, sind bei den Versuchen keine Verluste an α -Tocopherol ermittelt worden. Beim Versuch 1 war der Volumenstrom der Ernte in etwa halb so hoch mit 45 %, wie beim Zulauf. Entsprechend findet auch nur eine geringfügige Konzentrierung der Biomasse statt, da das Erntevolumen in etwa um die Hälfte eingeengt wurde. Wird im Vergleich zum Beispiel 1 das Erntevolumen um das 10fache eingeengt, wie beim Beispiel 2, so fand auch eine starke Konzentrierung der Biomasse um das 35,6fache statt. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass die Biotrockenmassekonzentrationen der beiden Zuläufe sich um das fast zweifache unterschieden, womit die Vergleichbarkeit leicht einschränkt ist. Aus Versuch 2 wird ebenfalls ersichtlich, dass die Erntegeschwindigkeit zu langsam war, da sich eine relativ hohe Biotrockenmassekonzentration im Überlauf vorfand, welche 64 % der Biotrockenmassekonzentration im Zulauf entsprach. Für eine rasche Ernte müssten die Impulse länger werden, um je Zyklus ausreichend alle Zellen von den schrägen Platten abzuschütteln. Da hierfür jedoch die Impulsstärke zu hoch war und sich eine Verwirbelung im Sedimentationsprozess einstellte, wurde der Impulsgeber etwa 30 cm entfernt vom Zellabsetzer mit einem Abstandhalter montiert. Hierdurch war der Impuls stark genug, um die Zellen von der Schrägen abzuschütteln, jedoch nicht stark genug, um den Sedimentationsprozess im *steady state* durch Verwirbelungen zu stören. Bei Ruheintervallen von 60 min und Vibrationsimpulsen von 60 s konnte hierdurch beim Versuch 3 ein ähnliches Ergebnis wie bei Beispiel zwei erzielt werden. Wurde das Ruheintervall auf 20 min gekürzt und die Vibrationsdauer bei 60 s beibehalten, wie im Versuch 4, stellte sich insgesamt eine geringere Konzentrierung ein. Jedoch konnte hierdurch die Biotrockenmassekonzentration im Überlauf reduziert werden. Mit einer Reduktion der Impulsdauer auf 30 s konnte diese weiter reduziert werden, was aus Versuch 5 hervorgeht.

Insgesamt zeigte sich bei den Versuchen, dass eine Konzentrierung der Biomasse von *E. gracilis* und eine effiziente Abtrennung der Zellen vom Restmedium mit einem Zellabsetzer möglich waren. Es wurde eine maximale Konzentrierung über das Volumen um den Faktor 24 und über die Biotrockenmassekonzentration um den Faktor 36 erreicht. Werden weitere Parameter, wie die Sedimentationsfläche und Länge des Systems an die jeweiligen Bedingungen weiter angepasst, können auch höhere Volumenströme und Zellkonzentrationen erreicht werden. Ein wichtiges hier erfülltes Kriterium stellt jedoch die einfache Skalierbarkeit des Systems dar, wenn diese Methode im technischen Maßstab eingesetzt werden soll [Henzler 2012].

4.12 Produkthomogenität und -heterogenität

Die potentiellen Produkte aus der Biomasse von *E. gracilis* zeigten bereits insbesondere bei den Fettsäuren eine veränderte Zusammensetzung bei unterschiedlichen Lichtintensitäten. In einem Bioraffineriekonzept mit Freilandkultivierungen sollten durch Temperaturschwankungen und Jahreszeiten bedingte Änderungen der Rot- und Blaulichtanteile im Lichtspektrum weitere Veränderungen in der Lipidzusammensetzung zu erwarten sein [Kawabata und Kaneyama, 1989; Olofsson *et al.*, 2012]. Die Zusammensetzung des Paramylons hingegen ist demgegenüber stets gleich und variiert lediglich in der Quantität [Kawabata *et al.*, 1982]. Beim Tocopherol hingegen können weitere Isomere vorkommen – das α -Tocopherol-Isomer ist jedoch von größtem Interesse. Es ist bekannt, dass *E. gracilis* neben α -Tocopherol weitere Tocopherole, Tocotrienole, Tocopherylquinone und Uniquinone, wie auch Plastoquinone synthetisiert. Mehrere Publikationen beschreiben unabhängig von der Lichtqualität und –quantität die Präsenz sowohl von α -, β -, γ - und δ -Tocopherol als auch α -Tocotrienol [Ogbonna 2009; Ruggeri *et al.*, 1985; Shigeoka *et al.*, 1986; Threlfall und Goodwin, 1967]. β -Tocopherol mit einem Gesamtanteil von 0,85 % bezogen auf alle Tocopherole wurde zu 78 % in den Mitochondrien lokalisiert, was mit entsprechenden *house-keeping* Enzymen der einzelnen Fraktionen zusätzlich abgesichert wurde – allerdings wurde nur von Shigeoka und Kollegen [1986] von dieser Isoform berichtet. Insgesamt wurden mehr als 97 % der Tocopherole durch die α -Isoform repräsentiert [Shigeoka *et al.*, 1986; Tani und Tsumura, 1989]. Ältere Arbeiten mit photoautotroph gewachsenen *E. gracilis* Z-Kulturen beziffern den Anteil von α -Tocopherol mit mehr als 95 % speziell in Chloroplasten, ein geringer Anteil wurde auch in Mitochondrien und Mikrosomen vorgefunden [Threlfall und Goodwin, 1967]. Da jedoch keine zeitlichen Verläufe der Anteile bei Kultivierungen in der Literatur vorliegen, wurden die Anteile von α -, δ -, und γ -Tocopherol im Verlauf einer Kultivierung bei $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ betrachtet. Von Interesse war, ob sich die Zusammensetzung nahe der stationären Phase der Kultur stark ändert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 91 in absoluten Konzentrationen und anteilig am allen gemessenen Tocopherolen dargestellt. Es wurde deutlich, dass α -Tocopherol mit Abstand die Hauptform der gemessenen Tocopherole bildet. Da diese Isoform die wichtigste Vitamin E-Quelle für einen kommerziellen Gebrauch darstellt, ist dieses Ergebnis entsprechend wichtig für die Qualität des Produktes und seiner Homogenität. Werden die einzelnen Vitamine E als Anteile betrachtet, wird ersichtlich, dass zu Beginn der Kultivierung die Werte der Tocopherole ähnlich denen ab Tag 4 der Kultivierung waren. Dies lag am Inokulum, welches aus vier bis fünf Tage alten Kulturen bestand. Am Tag zwei war eine deutliche Änderung der Anteile von α - und γ -Tocopherol zu Gunsten von einem Anteil von 20,5 % γ -Tocopherol erkennbar. Dieser Anstieg zu Beginn liegt wahrscheinlich am Syntheseweg von α - und γ -Tocopherol und der Anpassungsphase der Kultur an

die neuen Bedingungen. Bei der Tocopherolsynthese in *E. gracilis* wird das Molekül 2,3-Dimethyl-6-phytylplastochinon partiell zum Ring zyklisiert und resultiert damit in γ -Tocopherol. Eine erneute Methylierung an Position 5 des Rings liefert das Molekül α -Tocopherol (Soll und Schultz, 1980). Letztendlich muss damit stets ein Pool an γ -Tocopherol in den Zellen vorliegen, um hieraus α -Tocopherol zu bilden und wäre deshalb zu Beginn der Kultivierung entsprechend höher. Wie bereits in Abschnitt 4.6.4 gezeigt wurde, korreliert hierzu die hohe spezifische Lipidkonzentration zu Beginn der Kultivierung, wenn auch nur bei geringeren Lichtflüssen. Im weiteren Verlauf zeigten sich kaum Schwankungen in den Anteilen mit nahezu 95 % α -Tocopherol und rund 5 % γ -Tocopherol. Der höchste Anteil an δ -Tocopherol lag ebenfalls am Tag zwei mit 2,8 % (0,015 mg L⁻¹), während die höchste Konzentration mit 0,081 mg L⁻¹ (0,8 %) am Tag acht gemessen wurde. Bei Kultivierungen mit geringeren Lichtflüssen ergab sich ein ähnliches Bild der Tocopherolisomere, wobei der maximale γ -Tocopherol-Anteil weniger ausgeprägt war, als die Werte von Tag zwei in Abbildung 91. Insgesamt bewegten sich die Werte mit rund 95 % α -Tocopherol im Bereich der Ergebnisse der oben genannten Publikationen, wenn Tag zwei außer Acht gelassen wird. Das vergleichsweise schwache Signal von β -Tocopherol bei der HPLC wurde nicht quantifiziert, da es mit Hilfe des Tocopherol-Mix-Standards bei den Proben von den weiteren Signalen – vermutlich den Tocotrienolen – nicht getrennt werden konnte.

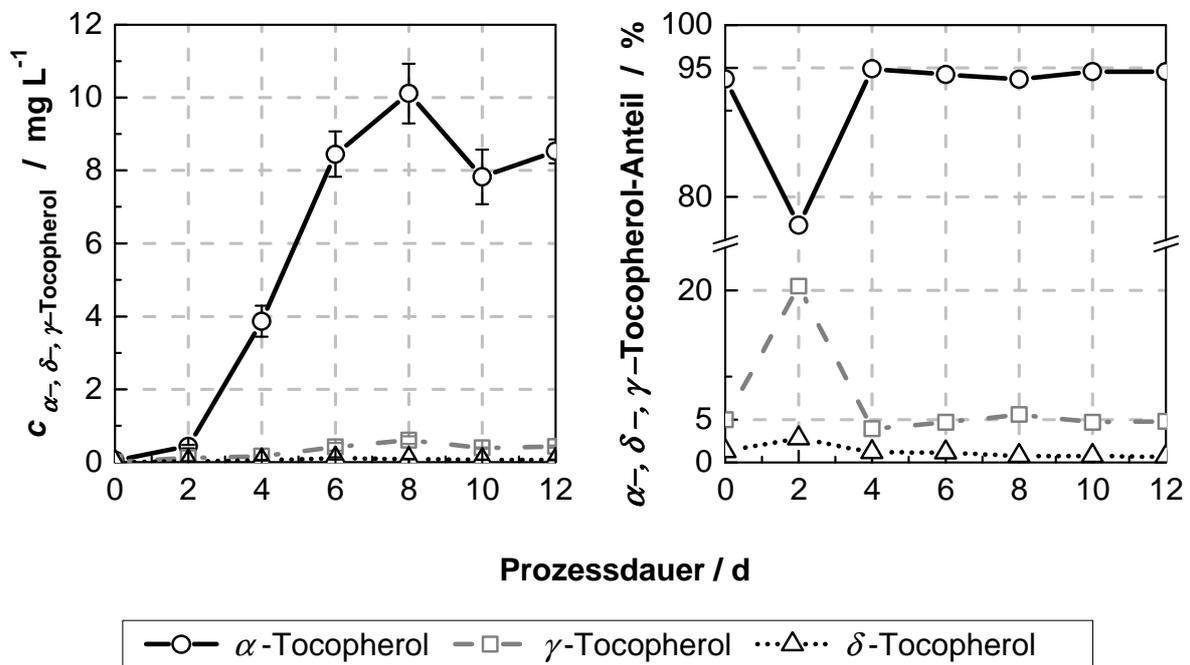


Abbildung 91: α -, δ - und γ -Tocopherolkonzentrationen und der jeweilige Anteil von *E. gracilis*-Kulturen in Schüttelkolben mit 1 cm Schichtdicke und einem Lichtfluss von 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im EG5.1-Medium bei pH 3,0. Die Schichtdicken wurden alle zwei Tage mit Wasser korrigiert. Die Kulturen wurden bei 29 °C auf bodenilluminierten LED-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min^{-1} in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 6.

4.13 Weitere potentielle Produkte aus *E. gracilis*

Neben den bereits bekannten und als Hochwertprodukten in Frage kommenden Stoffen wurden weitere Stoffgruppen im Organismus oder zellfreien Medienüberstand gesucht. Wie bereits erwähnt bilden zellgebunden die Wachsester eine mögliche weitere Stoffklasse innerhalb der Lipide, welche bereits ausführlich untersucht wurde [Rosenberg und Pecker, 1964; Inui *et al.*, 1982; Kawabata *et al.*, 1982; Kawabata und Kaneyama, 1989; Tucci *et al.*, 2010]. In Hinsicht auf die Pigmente wird das Diadinoxanthin, mit 76 % (*w/w*) Anteil an allen Carotinoiden [Heelis *et al.*, 1979; Schwenker 1971], als am häufigsten in der Zelle vorkommendes Xanthin erwähnt und könnte ähnliche Anwendung wie Astaxanthin finden, zumal andere Carotinoide wie Lutein und Canthaxanthin auch zunehmend in den Markfokus rücken [Shi *et al.*, 1997]. Weiterhin werden verschiedene von *E. gracilis* exkretierte Vitamine wie Biotin in Konzentrationen von 24 mg L⁻¹ oder Ascorbinsäure mit 3 mg L⁻¹ beschrieben [Baker *et al.*, 1981].

Da laut Fachliteratur Diadinoxanthin in *E. gracilis* das Hauptcarotinoid darstellt, wurde dieses als potentielles Hochwertprodukt in Frage kommendes Pigment hierfür in dieser Arbeit quantifiziert. Bei der Untersuchung von Aceton-Extrakten aus *E. gracilis* wurden neben Chlorophyll a und b die Carotinoide Diadinoxanthin, β -Carotin, Canthaxanthin, Lutein und Pheophytin bei verschiedenalten *E. gracilis*-Kulturen detektiert. Dabei wurden die Carotinoide in acht Tage alten Kulturen aus Schüttelkolbenkultivierungen (EG5.1-Medium, Anfangs-pH-Wert: 3,0, Lichtfluss: 570 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Gasatmosphäre: 95 % (*v/v*) Luft und 5 % (*v/v*) CO₂ bei 29 °C) zu 91 % aus Diadinoxanthin und 9 % β -Carotin repräsentiert. Weitergeführte Kultivierungen mit gleicher Vorkultur als Inokulum und unter gleichen Bedingungen wiesen am Tag 14 die übrigen oben genannten Carotinoide auf, wobei Diadinoxanthin 83 % der erkannten Pigmente ausmachte und β -Carotin rund 6 %. Ältere Kulturen mit zwei Wochen Kultivierungsdauer wiesen weitere Signale bei der Pigment-HPLC auf, die jedoch nicht zugeordnet werden konnten. Andere Pigmente, die in *E. gracilis* vorkommen sollen (Neo- und Zeaxanthin) wurden nicht detektiert, jedoch wurden auch verschiedene Pigmentmuster bei Heelis *et al.* [1979] und Schwenker [1971] vorgefunden, wobei die in dieser Arbeit ermittelten Anteile von Diadinoxanthin und β -Carotin als hauptsächlich vorkommende Pigmente bei allen durchgeführten Messungen mit den Ergebnissen von Schwenker [1971] gut vergleichbar sind. Es ergab sich dabei am Tag acht der oben genannten Kultivierung eine spezifische Konzentration von $36 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$ Diadinoxanthin (*n*=3). Wird ein Vergleich zum meist eingesetzten Mikroalgenproduzenten für Astaxanthin gezogen, liegt eine große Differenz vor, da *Haematococcus pluvaris* im Bereich von 2,7 bis 3,8 % (*w/w*) der Biotrockenmassekonzentration Astaxanthin über eine längere Zeit akkumuliert, was im Bereich der spezifischen Konzentrationen von 27 bis 38 mg g⁻¹ liegt [Ambati *et al.*, 2014]. Die vergleichsweise geringe Menge würde eine wirtschaftliche Extraktion

offensichtlich nicht legitimieren, jedoch ist die Angabe zur Aufwertung der Inhaltsstoffe der Biomasse zu sehen, wenn die Biomasse selbst als Produkt beispielsweise für die Nahrungsergänzung oder als Futtermittel dienlich sein soll, da Diadinoxanthin u.a. als Antioxidans die gleichen Aufgaben übernimmt wie Astaxanthin.

Bei der Untersuchung der Biotinkonzentration im zellfreien Überstand wurde die sensitive Methode von Müller und Kollegen [2013] aus Abschnitt 3.5 eingesetzt, nachdem die Analytik mit Hilfe der HPLC keine ausreichende Sensitivität im relevanten Bereich der Proben erbrachte. Die Messung über Streptavidin und B-4-F erfolgte mit zellfreien Überständen aus Kultivierungen im Flachplattenreaktor vom Tag zwei und Tag sechs jeweils wenige Stunden vor Ende der Hell-Phase (Kultivierung von *E. gracilis* im EG6-Medium, Anfangs-pH-Wert: 3,0, Lichtfluss beidseitig: $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit circadianem Rhythmus und einem Gasvolumenstrom von 0,02 vvm Gasatmosphäre mit 95 % (v/v) Luft und 5 % (v/v) CO₂ bei 29 °C . Es ergaben sich Konzentrationen von $0,06 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ für Tag zwei (Wachstumsphase) und $0,19 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ für Tag sechs in der stationären Phase – am Tag neun in der Absterbephase wurden Konzentrationen von $0,16 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ ermittelt. Somit lagen alle gemessenen Werte (n=3) deutlich unter den von Baker *et al.* [1981] angegebenen Wert für den Überstand mit $24,00 \pm 6,00 \text{ mg L}^{-1}$. Vermutlich liegt der Grund in der Kultivierung von *E. gracilis* mit einem sehr nährstoffreichem Medium bei Baker und Kollegen oder den heterotrophen Wachstumsbedingungen. Die Originalquelle beschreibt ein komplexes Medium mit unter anderem $0,11 \text{ g L}^{-1}$ Leberextraktkonzentrat, 2 g L^{-1} autolyserter Hefe und 2 g L^{-1} Trypticase (heute auch CASO-Agar genannt), welches durchaus zu einem anderen Wachstums- und Exkretionsverhalten führen kann [Baker und Frank, 1968]. Ob heterotroph gewachsene Kulturen mehr Biotin im zellfreien Überstand aufweisen, wurde mit fünf Tage alten Kulturen überprüft, welche im CM-Medium mit 20 g L^{-1} Glucose $\times \text{H}_2\text{O}$ mit einem Anfangs-pH-Wert von 6,8 und 100 % Luft bei 29 °C auf einem Orbitalschüttler bei 120 min^{-1} mit einer Auslenkung von 25 mm gewachsen waren. Es wurden ebenfalls sehr geringe Konzentrationen von $0,08 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ ermittelt. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte entsprechen den volumetrischen Konzentrationen anderer Wildtypspezies, wie z.B. von Bifidobakterien [Noda *et al.*, 1994]. Bei gentechnisch modifizierten Mikroorganismen wurden höhere Konzentrationen über 200 mg L^{-1} beschrieben. Jedoch werden jährlich (2003) weltweit allein an synthetischen Biotin etwa 35 t abgesetzt, da verschiedene sehr effiziente und patentierte Synthesen existieren [Warm *et al.*, 2003]. Die Einbindung einer Biotinproduktion in das Bioraffineriekonzept wäre somit ökonomisch fragwürdig.

4.14 Kultivierungen von *Galdieria sulphuraria* und die Extraktion von Phycocyanin

Eine zusätzliche Kultivierung einer extremophilen Mikroalge wäre notwendig, damit auch stark schwefelbelastete und gegebenenfalls heiße Rauchgase als CO₂-Quelle in dem neuen Bioraffineriekonzept verwendet werden könnten [Pulz und Gross, 2004].

Zur Maximierung der Produktausbeute zeigten sich bei *G. sulphuraria* photoheterotrophe oder sequenziell heterotrophe und dann photoautotrophe Kultivierungsbedingungen als zielführend. Rein photoautotrophe Kultivierungen erreichten vergleichsweise geringe Biotrockenmassekonzentrationen von 2 bis 3 g L⁻¹ nach sieben Tagen im Ford-Medium mit einem Anfangs-pH-Wert von 2,0 und einem Lichtfluss von 570 μmol m⁻² s⁻¹ auf einem bodenilluminierten Schüttler bei 120 min⁻¹. Ausprobiert wurden verschiedene Strategien bei Zulaufkultivierungen im Bioreaktor mit Glucose oder Glycerin und verschiedenen Zufütterungsprofilen (Daten nicht gezeigt). Da die Kultivierungen im Photobioreaktor mit *G. sulphuraria* im Ford-Medium bei pH 2,0 starteten und die Mikroalge beim Wachstum das pH weiter bis unter 1,0 senkte, war eine Sanitisierung des Systems nicht nötig. Auch heterotrophe Kultivierungen mit 55 g L⁻¹ Glucose × H₂O oder Glycerin wiesen zu keiner Zeit Kontaminationen auf (Daten nicht gezeigt). Dabei tolerierte *G. sulphuraria* hohen Scherstress durch einen erhöhten Gasvolumenstrom bis 1,3 vvm und kann im heterotrophen oder photoheterotrophen Zustand in Blasensäulen zu einer Hochzelldichte kultiviert werden (siehe Abbildung 93). Für die Einbindung in das Bioraffineriekonzept ist ebenfalls von Vorteil, dass die Zellen auch auf Rohglycerin ein sehr gutes Wachstum zeigten. Hierfür wurden die Inhaltsstoffe der Rohglycerinsorten mit den Angaben der Hersteller abgeglichen und mit Hilfe von HPLC und Hach-Lange-Tests auf ihre Glycerin-, Sulfat- und Kaliumkonzentration untersucht, um das Ford-Medium entsprechend zu modifizieren. Das Wachstum von *G. sulphuraria* auf verschiedenen Glycerinsorten ist in der folgenden Abbildung 92 dargestellt. Es ist klar zu erkennen, dass die Kulturen ein identisches Wachstum mit 15 g L⁻¹ Rohglycerin und Reinglycerin als Kohlenstoffquellen zeigten. Die Kulturen mit Rohglycerin von Verbio (Verbio Diesel Schwedt GmbH & Co. KG, Schwedt/Oder, BRD) und Cargill (Cargill Incorporated, Wayzata, USA) wiesen ab dem sechsten Tag eine zunehmend höhere Biotrockenmassekonzentration auf, als die der Kulturen mit reinem Glycerin. Laut Herstellerangaben sind in diesen beiden Rohglycerinsorten Reste von Fettsäuren von Rapsöl zu finden (siehe Anhang 7.2). Da *G. sulphuraria* in der Lage ist, sehr viele verschiedene Kohlenstoffquellen zu nutzen, ist die Verstoffwechslung der Fettsäuren denkbar [Gross und Schnarrenberger, 1995, Schönknecht *et al.*, 2013]. Nach zehn Tagen photoheterotropher Schüttelkolbenkultivierung bei einem Lichtfluss von 180 μmol m⁻² s⁻¹ (AquaGLO Leuchtstoffröhren), 5 % CO₂ (v/v) in der Gasphase bei 40 °C erreichten die Kulturen Biotrockenmassekonzentration zwischen 14 und 17 g L⁻¹. Es ergaben sich damit mittlere Ausbeutekoeffizienten für die Biotro-

kkenmassekonzentration aus Glycerin und CO₂ von 0,93 bis 1,13. Laut Fachliteratur erreichten Kulturen unter ähnlichen Bedingungen, jedoch mit geringerem Lichtfluss von 37 μmol m⁻² s⁻¹, nach sieben Tagen rund 4 g L⁻¹ bei einem Einsatz von 5 g L⁻¹ Glycerin und wiesen einen ähnlich hohen Ausbeutekoeffizienten bezüglich der Biotrockenmassekonzentration und dem Substrat auf, zumal sich diese Kulturen noch nicht in der Stationärphase befanden [Sloth *et al.*, 2006]. Weiterhin war bei Sloth *et al.* der Ausbeutekoeffizient für Glycerin und CO₂ höher im Vergleich zum Koeffizienten für Glucose und CO₂ – identische Ergebnisse konnten bei Kultivierungen in dieser Arbeit bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Mit Hinblick auf die Wirtschaftlichkeit eines Prozesses durch den Einsatz von Glycerin als Kohlenstoffquelle wurde deshalb eine sequentielle heterotroph/photoautotrophe Zulaufkultivierung entwickelt, die in Blasensäulensystem hohe Zelldichten erreichte. Trotz der geringen Sauerstofftransfergeschwindigkeiten (k_La-Werte) von Blasensäulen [Wood und Thompson, 1987] wurden in der Regel Biotrockenmassekonzentrationen über 100 g L⁻¹ bei 42 °C und hohen Luftvolumenströmen erreicht. Eine Umstellung der dichten Zellbrühen auf photoautotrophe Bedingungen war

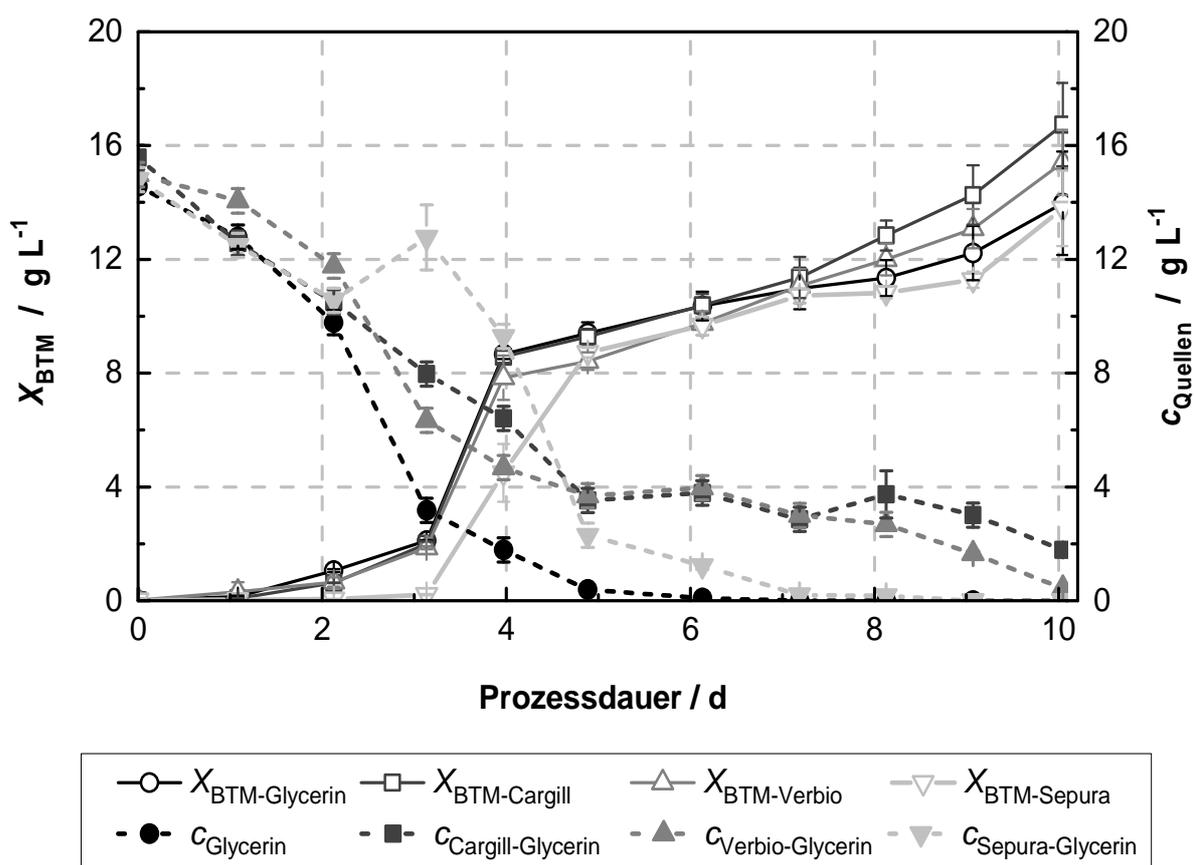


Abbildung 92: Photoheterotrophe Kultivierung von *G. sulphuraria* in Schüttelkolben mit 15 g L⁻¹ reinem Glycerin und verschiedenen Rohglycerinsorten, deren Glycerinanteil zuvor mit Hilfe der HPLC bestimmt wurde. Bei reinem Glycerin wurde das normale Ford-Medium verwendet, wobei die Rohglycerinsorten mit modifizierten Varianten komplettiert wurden. Die Kulturen wurden bei 40±2 °C und einem Lichtfluss von 180 μmol m⁻² s⁻¹ auf bodenilluminierten Leuchtstoffröhren-Schüttlern bei einer Drehfrequenz von 120 min⁻¹ in einer Gasatmosphäre aus 5 % (v/v) CO₂ und 95 % (v/v) Luft angezogen. N = 3.

am schnellsten bei 37 °C mit etwa 9 Stunden bis zur grünen Färbung der Zellen. Eine Kultivierung in der Blasensäule mit Glycerin als Kohlenstoffquelle und nahezu linearem Wachstum ist in der folgenden Abbildung 93 zu sehen. Die Kultivierung startete bei 40 °C mit einem Luftvolumenstrom von 0,66 vvm und wurde ab dem dritten Tag täglich um etwa 0,1 vvm auf 1,53 vvm am Tag elf erhöht. Nichtsdestotrotz wuchsen die Zellen ab Tag acht zunehmend sauerstofflimitiert wie in Abbildung 94 an der relativen Sauerstoffkonzentration im Medium zu erkennen ist und erreichten zwischen Tag elf und 14 ihre maximale Biotrockenmassekonzentration von rund 160 g L⁻¹. Der periodisch wiederkehrende Einbruch der relativen Sauerstoffkonzentration war bedingt durch die automatisierte Zugabe von Antischaum, da eine Schaumdecke von bis zu 20 cm Höhe über Nacht entstand. Mit dem Beginn der Illumination wurde die Begasung auf 95 % (v/v) Luft und 5 % (v/v) CO₂ umgestellt. Von Tag 10 bis 12 akkumulierte die Kohlenstoffquelle zunehmend im Medium und eine weitere Erhöhung des Luftflusses erbrachte keine Änderung. Ebenfalls könnte ein zu hoher Scherstress die Zellen im Wachstum beeinflusst haben. Somit wurde der Volumenstrom wieder auf 1,33 vvm gesenkt und die Zufütterung beendet, womit das im Medium akkumulierte Glycerin bis Tag 15 weitestgehend verstoffwechselt wurde. Am Tag vor Illuminationsinduktion lagen die Phycocyaninkonzentrationen bei 12 mg L⁻¹ für

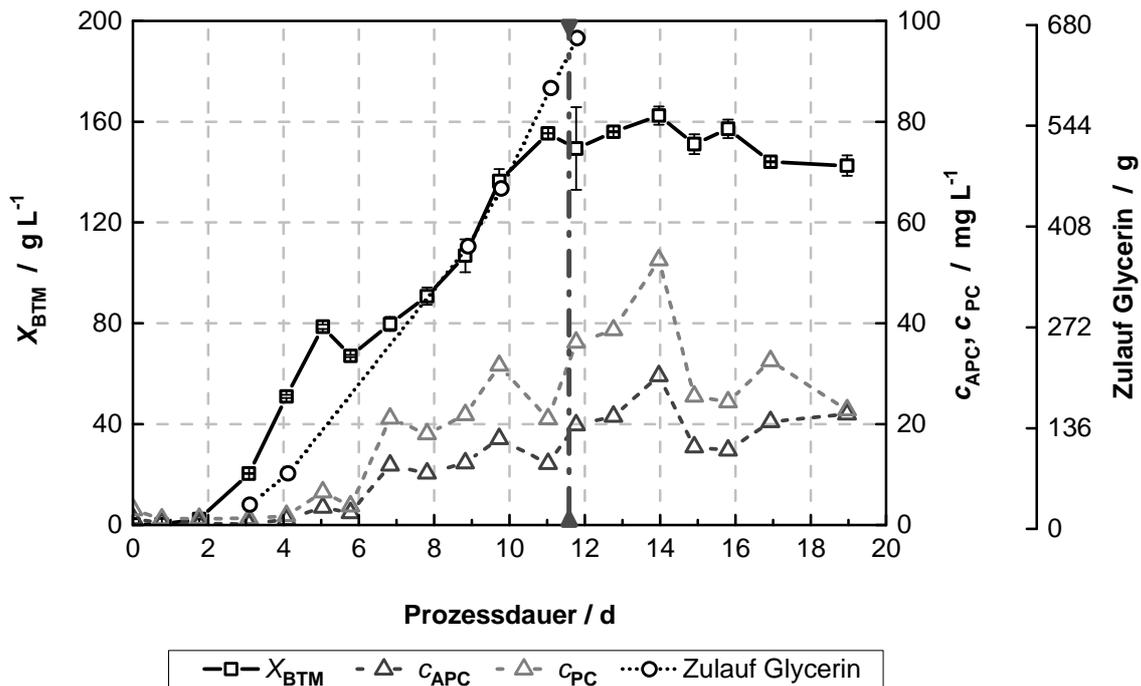


Abbildung 93: Verlauf einer Zulaufkultivierung von *G. sulphuraria* im intern illuminierten Blasensäulenreaktor mit Ford-Medium mit 15 g L⁻¹ und pH 2,0 zu Beginn. Die Zulaufphase verlief von Tag drei bis zwölf, dann begann die Illuminationsphase (siehe Markierung im Diagramm). Somit erfolgte zunächst eine heterotrophe Wachstumsphase, welche als photoheterotrophe Wachstumsphase fortgeführt wurde, bis kein Glycerin im Medium am Tag 16 detektiert wurde (siehe Abbildung 97). Die Illumination startete am Ende von Tag elf mit 300 μmol m⁻² s⁻¹ (gemessen außen am Reaktor mit Medium an einer weißen LED). Der Gasfluss lag zu Beginn bei 0,66 vvm reiner Luft und wurde ab Tag drei täglich um etwa 0,1 vvm auf 1,53 vvm am Tag elf erhöht und wurde ab Tag zwölf auf konstant 1,33 vvm reduziert. Zu Beginn der Illumination wurde die Kultivierung mit einem Gasmisch aus 5 % CO₂ (v/v) und 95 % (v/v) Luft begast. Die Temperatur lag bei 40 °C.

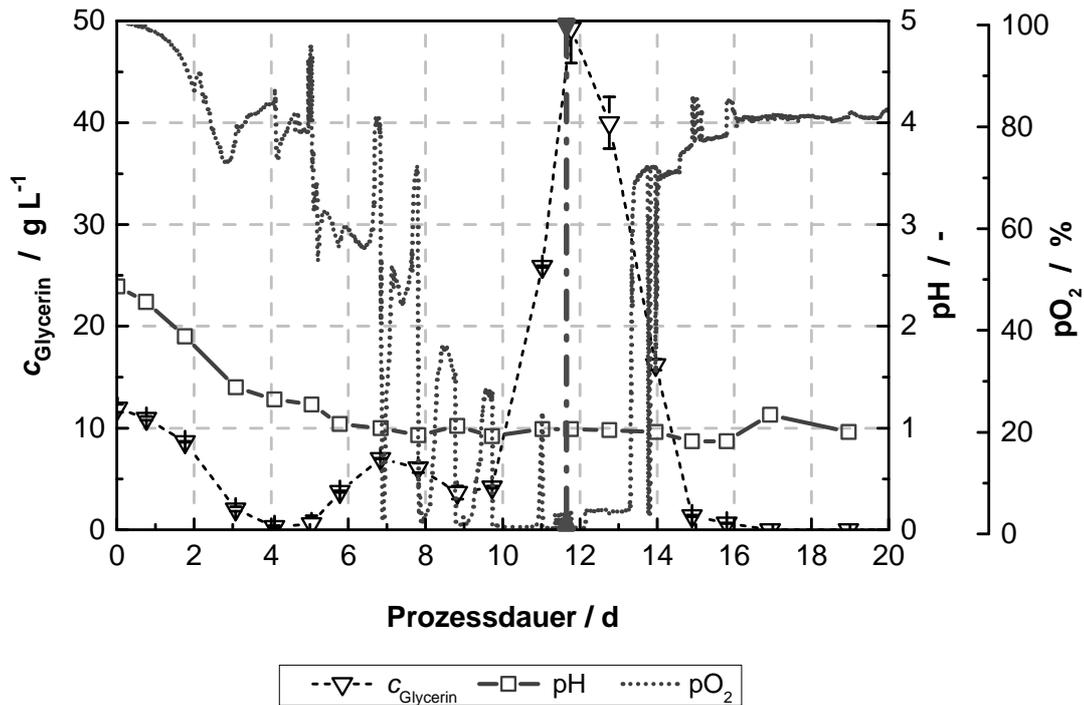


Abbildung 94: Weitere Parameter vom Verlauf der Zulaufkultivierung aus Abbildung 93 - siehe oben.

APC und 21 mg L^{-1} für C-PC. Zwei Tage nach Illuminationsbeginn lagen maximale Phycocyaninkonzentrationen von 53 mg L^{-1} APC und 27 mg L^{-1} CPC vor, welche im Folgenden wie die Biotrockenmassekonzentration wieder sanken. Vermutlich hing dieses mit der fehlenden Kohlenstoffquelle zusammen. Es ist in der Fachliteratur beschrieben, dass bei Nährstoffmangel *G. sulphuraria* den zellinternen Kohlenstoffspeicher aus Florideen-Stärke zunehmend nutzt, während die Phycobilliproteine als Stickstoffreserve ebenfalls verstoffwechselt werden können [Viola *et al.*, 2001; Sinetova *et al.*, 2006]. Die hier erreichten Biotrockenmassekonzentrationen sind identisch mit vergleichbaren Zulaufkultivierungen beschrieben in der Fachliteratur, wo heterotroph unter Glucosezufütterung mit *G. sulphuraria* 074G (Phycocyaninüberproduzent) Biotrockenmassekonzentrationen von 113 bzw. 116 g L^{-1} erreicht wurden [Graverholt und Eriksen, 2007; Schmidt *et al.*, 2005]. Die erreichten Phycocyaninkonzentrationen lassen sich nicht vergleichen, da keine Publikation vorlag, bei der mit dem hier verwendeten Stamm gearbeitet wurde. Da die Stämme *G. sulphuraria* 074G wie auch 074G-G1 und 074G-G2 dafür bekannt sind, sehr hohe Mengen Phycocyanins zu produzieren, kann davon ausgegangen werden, dass mit Hilfe eines pigmentreichen Produktionsorganismus Produktkonzentrationen im Grammbereich bei Zulaufkultivierungen möglich sind [Schmidt *et al.*, 2005; Graverholt und Eriksen, 2007]. Mit der dargestellten Kultivierung wird deutlich, dass *G. sulphuraria* in Blasensäulen auch auf ein Lichtsignal reagieren kann, wenn die Zelldichte extrem hoch ist. Die Gesamtphycocyaninkonzentration stieg um das 2,4fache im Vergleich zur Konzentration vor der Photoinduktion an, die Erhöhung wurde jedoch hauptsächlich durch eine stärkere APC-Produktion bewirkt. Zwecks Aufreinigung von Phycocyanin mit möglichst geringen qualitativen und

quantitativen Verlusten war eine schonende Zellaufschlussmethode nötig. Für die Gewinnung von Phycocyanin aus Mikroalgen ist das Gefrier-Tau-Verfahren mit mehreren Zyklen als die schonendste Methode beschrieben [Takano *et al.*, 1973; Eriksen, 2008; Sekar und Chandramohan, 2008]. Ein schneller Zellaufschluss ist mit der Gefrier-Tau-Verfahren nicht möglich, es gibt jedoch verschiedene Ansätze für den Einsatz im industriellen Maßstab [Shamlou *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2008]. Nach drei Gefrier- und Tauzyklen mit *G. sulphuraria* war eine intakte Zellintegrität unter dem Lichtmikroskop bei der Mehrheit der Zellen erkennbar, nach fünf Zyklen waren etwa 60 % der Zellen sichtbar zerstört. Eine Aufschlusseffizienz wie mit einer Kugelmühle, bezogen auf die anschließend bestimmten Phycocyaninkonzentrationen, erforderte acht bis zehn Zyklen bei *G. sulphuraria*.

Für die weitere Extraktion mit Hilfe eines wässrigen Zwei-Phasen-Systems (ATPE) lag das Material aus dem Gefrier-Tau-Verfahren mit rund 50 mg L⁻¹ APC und 25 mg L⁻¹ CPC und einer Reinheit von 0,7 vor.

Das Material für das Gefrier-Tau-Verfahren bestand aus Zellen, welche bei 8000 RZB für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und in 50 % des Ausgangsvolumens ddH₂O resuspendiert wurden. Bei *G. sulphuraria*-Biomasse sind nach der Feststoffabtrennung durch Zentrifugation (8000 RZB, 10 min und 4 °C) bis zu 72 % des Phycocyanins im Zellpellet verblieben, wenn der Zellaufschluss mit nur fünf Gefrier-Tau-Zyklen nicht ausreichend effektiv erfolgte. Dieses Material konnte nicht direkt vom wässrigen Zwei-Phasen System aufgenommen werden, da die Verunreinigung mit Zelltrümmern eine Ausbildung der Phasen erschwerte. Deshalb wurde vor der Extraktion eine Filtration vorgenommen. Hierbei erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer und Makromoleküle durch einen Papierfilter (MN 615 von Macherey-Nagel) mit anschließender Ultrafiltration. Für eine saubere Phasenbildung bei der Extraktion war eine vorige Ultrafiltration des Zellextraktes (Pellicon XL-Ultrafiltrationsmodul, Durapore PVDF mit einem MWCO von 0,1 µm, Merck-Millipore, Darmstadt, BRD) notwendig, wobei nach einer Volumenreduktion des Retentates auf rund 20 % wieder auf das Ausgangsvolumen mit ddH₂O aufgefüllt wurde. Die Ultrafiltration wurde beendet, als das Permeatvolumen dem Ausgangsvolumen der Zellsuspension vor dem Gefrier-Tau-Verfahren entsprach. Bei der folgend beschriebenen Mehrfach-Extraktion mit einer Ausgangssuspensionen, die eine Reinheit von 0,6 bei rund 0,1 g L⁻¹ C-PC (im Permeat aus der Ultrafiltration) besaßen, wurde nach dem ersten Extraktionsschritt eine Reinheit von 1,2 in der PEG-Phase und 0,2 in der Salzphase ermittelt. Nach dem zweiten Extraktionsschritt konnten Reinheiten von 1,5 in der PEG- und 0,6 in der Salzphase ermittelt werden. Eine deutliche Steigerung der Reinheit nach der zweiten Extraktion war bei allen Mehrfach-Extraktionen nicht erreicht worden. Generell sank die Reinheit in der PEG-Phase nach der dritten Extraktion bei allen Mehrfachextraktionen wieder und bewegte sich zwischen 0,8 und 1,5, während sich die C-PC-Konzentration in der Salzphase auf dem gleichen Niveau wie bei der zweiten Extraktion eingestellt hatte. Ein dritter Extraktionsschritt war bei den Be-

dingungen somit nicht weiter zielführend. Abbildung 95 zeigt verschiedene Extraktionsansätze mit unterschiedlicher Menge an Zelltrümmern. Von der Verteilung wurden bei der ersten Extraktion $0,26 \text{ g L}^{-1}$ in der PEG- und $0,07 \text{ g L}^{-1}$ in der Salzphase vorgefunden. Nach dem zweiten Extraktionsschritt wurden $0,18 \text{ g L}^{-1}$ des C-PC in der PEG und $0,03 \text{ g L}^{-1}$ in der Salz-Phase ermittelt. Beim dritten Extraktionsschritt konnten $0,09$ bzw. $0,01 \text{ g L}^{-1}$ in der PEG- bzw. Salzphase detektiert werden. Ab dem zweiten Extraktionsschritt haben die Zelltrümmer weniger die untere Phase getrübt, sodass auch eine blaue Färbung der unteren Phase nach der Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes sichtbar wurde. Bei allen einzelnen Extraktionsschritten wurden dabei häufig Verteilungskoeffizienten zwischen der PEG- und der Salzphase von 3,3 bis 3,7 ermittelt, jedoch stieg dieser Wert mit den Extraktionsschritten bei Wiederholungen der Mehrfachextraktion auf ein Maximalwert von 9,2. Somit kann keine klare Angabe eines Verteilungskoeffizienten erfolgen, was vermutlich dem Aufschlussverfahren zu Schulden kommt. Auch wenn beim Einfrieren einheitlich gearbeitet wurde, konnte sich das Plastikgefäß leicht verformen, was eine andere Einfriereschwindigkeit durch die Änderung der Schichtdicke bedingen konnte. Dabei hat die Einfriereschwindigkeit und somit die Kristallbildung großen Einfluss auf das Endergebnis [Eriksen, 2008; Sekar und Chandramohan, 2008; Takano *et al.*, 1973]. Zudem wird aus Abbildung 95 d und e deutlich, dass die Kapazitätsgrenze der ATPE-Systeme schnell überladen war und sich nach der Verteilung in den zwei Phasen auch Phycocyanin in der unteren Salzphase sammelte. Werden die absoluten Mengen von C-PC der einzelnen Extraktionsschritte betrachtet, kann eine entsprechende Bilanzierung über die einzelnen Phasen erfolgen woraus sich die Wiederfindungsrate des C-PC ergibt. Die Ergebnisse hierzu für das oben genannte Beispiel sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Es ergab sich über die drei Extraktionsschritte mit ATPE eine Wiederfindung des C-PC in der PEG-Phase von 47, 31 und 17 %. Die Wiederfindung über beide Phasen ergab, dass ein Teil des C-PC in der Interphase verbleiben musste, welche gut in Abbildung 95 c sichtbar ist – bei der Interphase wurde die C-PC-Konzentration nicht untersucht. Wird der dritte Extraktionsschritt vernachlässigt, konnten rund 30 % des eingesetzten C-PC mit einer Reinheit von 1,5 durch zwei Extraktionsschritte aufgereinigt werden, wobei die Ausgangssuspension eine Reinheit

Tabelle 18: Ergebnisse der wässrigen Zwei-Phasen-Extraktion mit PEG 4000 und Kaliumphosphatsalzen bei pH 7,0. Dargestellt sind die ermittelten Konzentrationen, Absolutgewichte, die Wiederfindung des C-PC in Bezug auf das Ausgangszellextrakt und die Reinheit der einzelnen Phasen von jedem Extraktionsschritt und des Ausgangszellextraktes.

	$c_{\text{C-PC}} / \text{g L}^{-1}$		$m_{\text{C-PC}} \text{ absolut} / \text{mg}$		$m_{\text{C-PC}} \text{ absolut} / \text{mg}$	Wiederfindung / %		Reinheit / -
Zellextrakt	0,10		8,05		-	100,00		0,62
Phase	PEG	Salz	PEG	Salz	PEG + Salz	PEG	PEG + Salz	PEG
ATPE 1	0,26	0,07	3,79	2,23	6,02	47,15	74,87	1,17
ATPE 2	0,18	0,03	2,55	0,93	3,48	31,64	43,31	1,46
ATPE 3	0,09	0,01	1,35	0,31	1,66	16,72	20,67	1,32

von 0,6 aufwies. Wie bereits erwähnt, hat ein zu hoher Zelltrümmeranteil von *G. sulphuraria* die Ausbildung der einzelnen Phasen deutlich gestört, wie in Abbildung 95 a mit Zellextrakt ohne Filtrationsschritte vor der Mehrfachextraktion zu erkennen ist. Es wurde ebenfalls deutlich, dass bei allen Extraktionsschritten C-PC in die Salzphase abwanderte, was durch die blaue Färbung der unteren Phasen besonders in Abbildung 95 d und e sichtbar wird. Neben der photometrischen Bestimmung der Reinheiten wurden die oberen PEG-Phasen mit Hilfe einer SDS-PAGE mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blue G250 aufgetrennt und sichtbar gemacht. Wie in Abbildung 96 zu erkennen ist, sind auf dem Gel-Foto bereits nach der zweiten Extraktion wenige Verunreinigungen durch Proteine sichtbar außer den schwachen Banden bei 20 und 40 kDa welche den Größen der Untereinheiten bzw. Multimeren der Phycocyanine entsprechen. In der Fachliteratur sind für *A. platensis* α -Untereinheiten für APC mit 18,0 kDa und für C-PC mit 20,5 kDa und β -Untereinheiten für APC mit 20,0 kDa und für C-PC mit 23,5 kDa angegeben. Erwähnt werden auch damit errechnete Größen von 38 kDa für APC und 44 kDa für C-PC [Boussiba und Richmond, 1979]. Beim Vergleich mit der Fachliteratur

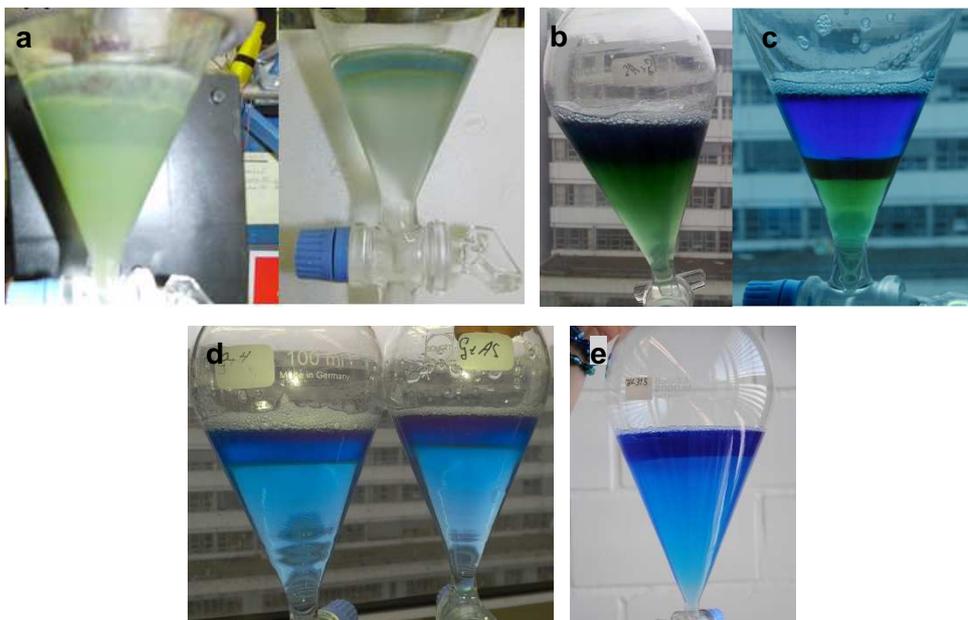


Abbildung 95: Vergleich der Extraktionen mit unterschiedlich vorbehandelten Zellextrakten nach einer Ruhezeit von 30 min. **a:** Extraktion von Phycocyanin aus 1 % (w/w) *G. sulphuraria*-Zellextrakt mit einem wässrigen Zwei-Phasen-System aus PEG 4000 (obere Phase) und Kaliumphosphat (untere Phase). Je nach Belastung des Probenmaterials mit Zelltrümmern wurde die Phasenausbildung beeinträchtigt. Der Extrakt wurde nach der Zentrifugation nicht filtriert. Eine Phasenausbildung ist links nach erster Extraktion kaum zu erkennen und wurde sichtbar nach der dritten Extraktion (rechts) mit einer maximalen Reinheit von 0,9. Maßstab: 50 mL; **b und c:** Erster Extraktionsschritt mit filtrierten Zellextrakten aus verschiedenen Kulturen nach Zellaufschluss und Zentrifugation. Es war eine klare Phasengrenze zu erkennen, wobei sich in der Interphase deutlich Verunreinigungen sammelten Maßstab: 50 mL; **d und e:** Zweiter Extraktionsschritt mit filtrierten Zellextrakten aus verschiedenen Kulturen nach Zellaufschluss und Zentrifugation, wie im Text beschrieben. Durch die Filtration fand keine Störung der Phasenausbildung bei allen Extraktionsschritten statt; **d:** 50 mL Maßstab **e:** 500 mL Maßstab mit Biomasse aus einer Kultivierung im intern illuminierten Blasensäulen-Photobioreaktor.

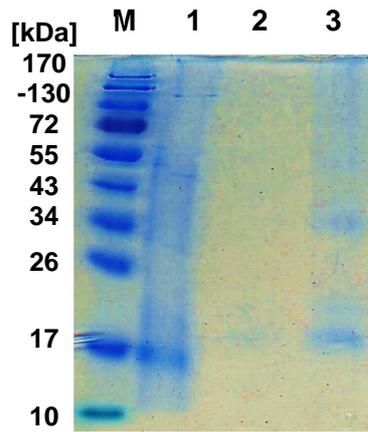


Abbildung 96: SDS-PAGE von Proben aus verschiedenen Extraktionsschritten. Die Spuren sind folgend belegt: **M:** Marker Fermentas Prestained Protein Ladder #SM0671; **1:** Ausgangsextrakt nach Filtration; **2:** untere Phase der zweiten Extraktion und **3:** obere Phase der zweiten Extraktion (3).

konnten nicht so hohe Reinheiten wie bei Patil *et al.* [2006] erzielt werden, wo Reinheiten zwischen 3,96 und 5,22. Ein direkter Vergleich kann jedoch nicht erfolgen. Zum einen wurde bei PEG 4000/ Kaliumsalze-System von Patil und Kollegen der pH-Wert geändert. Zum anderen wurde Chitosan zugesetzt um die Extraktionseigenschaften zu modifizieren. Außerdem wurde für die Zweiphasen-Extraktion ein Zellextrakt verwendet, welcher nach einer Behandlung mit Aktivkohle eine Reinheit von bereits 1,2 vorwies, wobei der Extrakt ursprünglich aus *Athrospira platensis* generiert wurde. Eigene Versuche mit der gleichen Mikroalge haben jedoch ähnliche Ergebnisse geliefert, wie oben beschrieben wurden.

Insgesamt sollte in diesem Kapitel angedeutet werden, das sich diese Mikroalge aus einigen Gründen für ein Bioraffineriekonzept mit stark schwefel-belasteten Rauchgasen eignet. Zum einen kann die Mikroalge unter sehr sauren Bedingungen problemlos axenisch kultiviert werden. Zum anderen kann *G. sulphuraria* einfach photoheterotroph und auch sequenziell heterotroph/autotroph kultiviert werden. Es ergäben sich Möglichkeiten die Alge photoheterotroph mit Rohglycerin und 5 % (v/v) CO₂ in der Zuluft in Photobioreaktoren zu kultivieren oder aber sequenziell erst heterotroph in großen Bioreaktoren anzuzüchten, bevor Kulturbrühe in Photobioreaktoren überführt würde. Hierbei wäre der Vorteil, dass Rohglycerin, welches in unterschiedlichen Mengen bei einem Bioraffineriekonzept bei der Gewinnung von Fettsäuren aus Lipiden anfallen kann, immer für eine Hochzelldichtefermentation direkt weiterverwendet werden kann. Wie gezeigt wurde, kann dann auch bei hohen Zelldichten eine Photoinduktion und Steigerung der Phycocyaninkonzentration erfolgen. Die Konditionierung des Rauchgases durch *G. sulphuraria* für den Hauptorganismus *E. gracilis* in diesem Konzept würde sich jedoch nur auf die photoheterotrophe Kultivierung oder den photoautotrophen Teil der sequentiellen Kultivierung beziehen. Die Restbiomasse von *G. sulphuraria* stellte bei der Herstellung von Phycocyanin den deutlich größeren Anteil dar und sollte im Sinne des Konzeptes ebenfalls genutzt werden. In der Fachliteratur wurden bereits verschiedene Möglichkeiten erörtert – auch

die Nutzung als Nahrungsmittelzusatz. Da die Zelle und insbesondere die Zellwand von *G. sulphuraria* mit insgesamt rund 30 % (w/w) reich an Proteinen sind, könnte die Restbiomasse auch als Futtermittelzusatz Anwendung finden [Kuroiwa *et al.*, 1989; Graziani *et al.*, 2013]. Weiterhin nutzt *G. sulphuraria* Florideen-Stärke als Kohlenhydrat-Reservespeicher – eine Variante der Stärke ähnlich dem Glykogen mit höherem Verzweigungsgrad [Albertano *et al.*, 2000]. Vermutlich wird dieser Stoff auch zur Osmoregulation genutzt, wie bei der sehr nah verwandten Spezies *Cyanidium caldarium* [Reed 1983]. Je nach Kultivierungsbedingungen wurde ein Anteil von 60 bis 70 % (w/w) als unlösliche Stärkefraktion vorgefunden [Graziani *et al.*, 2013]. Eine mögliche Anwendung der Florideen-Stärke ergäbe sich wegen der rheologischen Eigenschaften für Tiefkühlkostprodukte oder *Instant*-Nudeln an [Yu *et al.*, 2002]. Aufgrund des äußerst geringen Lipidgehaltes von ca. 1 % (w/w) ist *G. sulphuraria* für die Produktion von Lipiden ungeeignet [Graziani *et al.*, 2013]. Eigene Untersuchungen hierzu bestätigten dies (Daten nicht gezeigt). Eine weitere mögliche Nutzung der Restbiomasse wäre als Substrat zur Biogasherstellung. Deshalb wurde die Biomasse *G. sulphuraria* in Biogas-Satzversuchen untersucht. Dabei wurde der gewonnene Gasertrag mit einem gängigen Standard (Avicel, eine mikrokristalline Cellulose), Rohglycerin von Sepura (sePura GmbH, Würzburg, BRD) und photoautotroph gewonnener Biomasse von *E. gracilis* im CM-Medium bei pH 6,8. Der Vergleich mit Rohglycerin ist von Interesse, da bei der Kultivierung von *E. gracilis* als Hauptorganismus in diesem Konzept auch Lipide produziert werden würden. Deren weitere Raffination ergäbe die Fraktion der Fettsäuren und den Glycerin-Rest. Sofern der Einsatz von *G. sulphuraria* nicht notwendig wäre, ist eine alternative Nutzung des Rohglycerins vor Ort sinnvoll. Die Ergebnisse der Biogas-Satzversuche sind in der folgenden Abbildung 97 dargestellt. Hier wird deutlich, dass das Rohglycerin und die Biomasse vom ersten Tag die Gasproduktion stimuliert haben. Diese Gemische weisen viele direkt verwertbare Substrate, welche das Klärschlamm-Bakterienkonsortium sofort verwerten kann, wie Proteine aus teils lysierter Biomasse und Methanol im Rohglycerin. Das hochkristalline Avicel® muss erst hydrolysiert werden, wodurch sich in diesen Ansätzen erst ab Tag eins eine Biogasproduktion einstellt. Nach etwa zehn Tagen anaerober Fermentation ergaben sich rund 560 mL g⁻¹ Biogas Avicel® und der photoautotroph gewachsenen Biomasse von *E. gracilis*, was auch mit Daten aus Grimm *et al* [2015] übereinstimmt, wo *E. gracilis* unter identischen Bedingungen (jedoch mit höheren Lichtflüssen) kultiviert wurde und nach 14 Tagen anaeroben Verdau ein Biogasertrag von 608 bis 648 mL g⁻¹ mit 66 bzw. 67 % (v/v) Methananteil. Die Versuchsansätze mit Rohglycerin- und *G. sulphuraria*-Substrat wiesen bis zum dritten Tag der Biomethanisierung einen parallelen Verlauf in der Biogasproduktion auf, wobei die Gasproduktion der Ansätze mit Rohglycerin ab Tag drei bis zum Ende deutlich über dem von den *G. sulphuraria*-Ansätzen lag mit rund 400 bzw. 300 mL g⁻¹. Erwartet wurde hier ein höherer Gasertrag mit *G. sulphuraria*-Substrat da Kohlenhydratanteile von 63 bis 69 % (w/w) für die Biomasse beschrieben wurden. Ein Grund kann hierfür kann

in der strikt gebundenen Form der Polysaccharide in Glycoproteinen sein, wodurch ein Abbau erschwert wird [Graziani *et al.*, 2013]. Ebenfalls wurde bei Beendigung der Biogasversuche ein deutlicher Geruch von Schwefelwasserstoff bei diesen Ansätzen festgestellt. Dies kann durch den ebenfalls sehr hohen Proteinanteil von 26 bis 32 % liegen, wo durch den Verdau von Proteinen Aminosäuren frei werden [Graziani *et al.*, 2013]. Weiterhin ist zu beachten, dass es sich bei der Mikroalge um eine schwefelliebende Spezies handelt. Es ist somit anzunehmen, dass diese Mikroalge als Substrat für Biogasanlagen einen höheren Schwefelanteil einschleppt, als dies beispielsweise bei *E. gracilis* der Fall ist. Dabei haben besonders zu hohe Ammoniak- bzw. als Ammonium im Klärschlamm vorliegende Konzentrationen einen toxischen Effekt auf Der anfallende Schwefel sollte in einer technischen Biogasanlage durch eine konventionelle Entschwefelungsstufe abgebaut werden können. Somit ergab sich mit *G. sulphuraria*-Substrat zur Biogaserzeugung ein mittlerer Wert von rund 300 mL g⁻¹ oTS, welcher mit der zugrunde liegenden Zellzusammensetzung nach Graziani *et al.* [2013] einen nach Berechnung von Sialve *et al.* [2009] einen Biomethananteil von mehr als 50 % aufweisen sollte. Der erreichte Ertrag liegt im Bereich wie er auch von anderen Mikroalgensubstraten erreicht wurde. So wurden beispielweise mit den Mikroalgen *Scenedesmus obliquus* und *Chlorella kessleri* identische Biogaserträge von 287 bzw. 335 mL g⁻¹ unter sehr ähnlichen Ver-

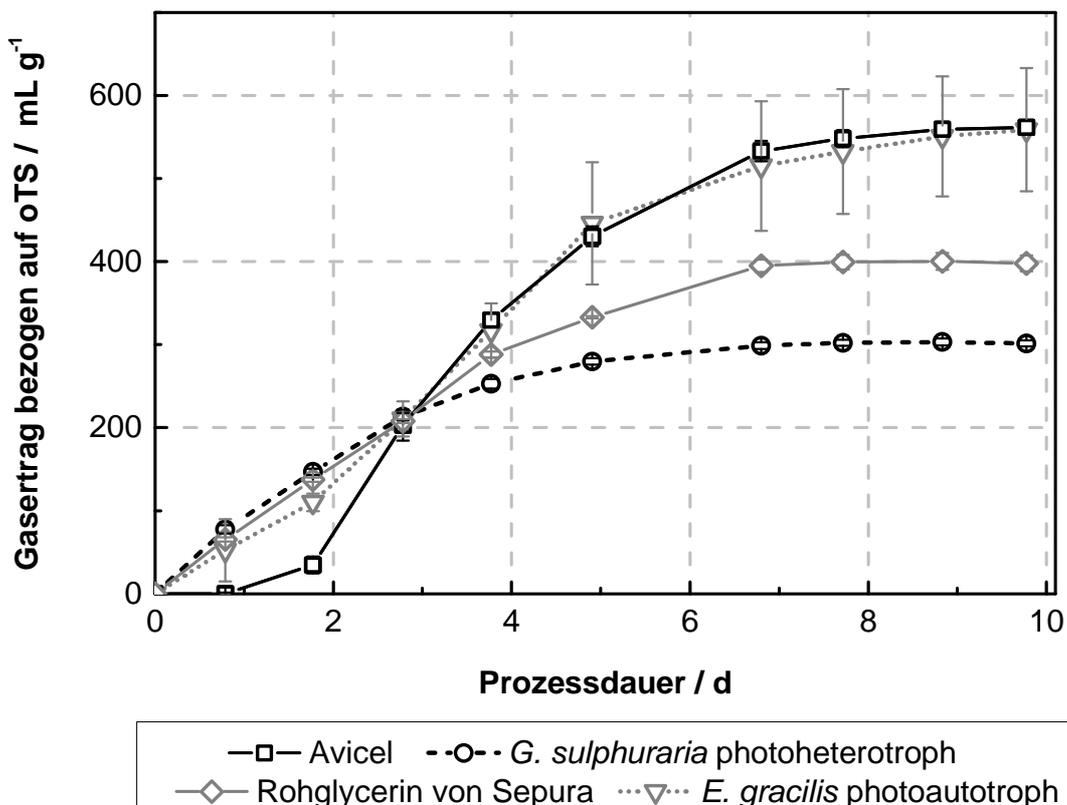


Abbildung 97: Entwicklung der Gaserträge bezogen auf die als Substrat eingesetzte organische Trockensubstanz (oTS). Der Bezug zur oTS erfolgte bei den Mikroalgen über die Biotrockenmasse, bei Avicel® über die Einwaage und bei Rohglycerin über die eigene Analytik und das im Anhang eingefügte Datenblatt (siehe Abschnitt 7.2) mit 69 % (w/w) Glycerin, 20 % (w/w) Fettsäuren und 3 % (w/w) Kalium.

suchsbedingungen erreicht [Mussnug *et al.*, 2010]. Ein großer Vorteil bei der Nutzung von *G. sulphuraria* als Substrat für Biogasanlagen ergibt sich im Vergleich zu den anderen Mikroalgen durch die Möglichkeit der Kultivierung zu hohe Zelldichten. Nach einer Extraktion von Phycocyanin würden hier deutlich höhere Biomassekonzentrationen durch Hochzelldichtekultivierungen für eine Biogasanlage bereitstehen, als dies mit anderen Mikroalgen der Fall wäre. Zu bedenken ist jedoch, dass der Gasertrag durch eine vorige Phycocyaninextraktion geschmälert würde.

4.15 Hochrechnungen für das Bioraffineriekonzeptes mit *E. gracilis*

Im Folgenden werden Hochrechnungen und Abschätzungen mit den erworbenen Ergebnissen in Bezug auf eine technische Produktion ermittelt. Zunächst wurden die Kosten für die entwickelten Medien errechnet, wobei Preise der börsennotierten Handelsplattform alibaba.com vom Februar 2016 verwendet wurden. Die Suchkriterien hierfür waren: >5 Anbieter, Einkauf der Stoffe im Maßstab 1 - 10 t und Vitamine ab 1 kg und Reinheit der Stoffe $\geq 98\%$. Der Kurs der Handelswährung US-Dollar in Euro lag zum Zeitpunkt der Berechnung bei 1 \$ = 0,9057 €. In der folgenden Tabelle 19 sind die Preise für je 1 m³ EG5.1- und EG6-Medium. Somit beläuft sich der Preis für die Einwaage für 1000 L EG5.1-Medium auf 0,97 € und für das EG6-Medium 0,86 € zuzüglich der Kosten für das Prozesswasser. Auf der anderen Seite wäre eine Hochrechnung zur Produktivität von *E. gracilis* im technischen Maßstab von Interesse. Als *best case* für eine technische Anlage in Deutschland wurden hierzu Berechnungen von Norsker *et al.* [2011] für eine Flachplatten-*airlift*-Anlage im technischen Maßstab und der eingestrahelten Sonnenenergie für die Niederlande (Eindhoven) über das gesamte Jahr verwendet. Hierbei handelt es sich um eine realistische und sorgfältige Hochrechnung hinsichtlich der relevanten Kostenpunkte für 1 ha- oder 100 ha-Anlagen zur Produktion von Mikroalgenbiomasse. Dabei wurde eine Flächenproduktivität von 64 t ha⁻¹ Mikroalgen-Biotrockenmasse angegeben. In Bezug auf die Biomasse von *E. gracilis* ergäben sich nach dieser Berechnung Flächenproduktivitäten von rund 23 t Paramylon, 10 t Lipide und 0,2 t α -Tocopherol je Hektar und Jahr, wenn die Ergebnisse aus der repetitiven Satzkultivierung mit circadianem Rhythmus (Abschnitt 4.9.2) verwendet werden. Bei diesen Szenarios fallen laut Norsker *et al.* [2011] Produktionskosten von 10,49 € kg⁻¹ Biotrockenmasse bei 1 Hektar- bzw. 5,96 € kg⁻¹ Biotrockenmasse bei 100 Hektar-Anlagen an. Der größte Punkt mit 3,10 € kg⁻¹ entfällt auf die Begasung, wobei von 1 vvm Gasvolumenstrom für Platten-*airlift*-Reaktoren ausgegangen wurde. Wie im Abschnitt 4.7 gezeigt wurde, ist ein Gasvolumenstrom von 0,04 vvm ausreichend bei der Anzucht von *E. gracilis*, was diesen Betriebskostenpunkt deutlich senken sollte. Dieser Punkt erweist sich als richtungsweisend, wie sich in einer weiteren Studie zeigte, da sich bei einem Flachplatten-*airlift*-Photobioreaktor mit einer Flüssigkeitsäule bis 50 cm erst unterhalb eines Gasvolumenstromes

Tabelle 19: Berechnung der Nährmedienpreise vom EG5.1- und EG6-Medium unter Verwendung von aktuellen Handelspreisen im Tonnen- und Vitamine im Kilomaßstab. Weitere Details siehe Text.

Stoff	Preis € t ¹	EG5.1-Medium	EG6-Medium ⁽¹⁾
		€ m ³	€ m ³
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	121,36	0,0607	0,0243
(NH ₄) ₂ HPO ₄	633,99	0,6340	0,6340
(NH ₄) ₂ SO ₄	135,85	0,0679	0,0462
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	181,14	0,0054	0,0054
EDTA	2264,25	0,0249	0,0226
KH ₂ PO ₄	1177,41	0,1177	0,1177
Co(NO ₃) ₂	5887,05		0,0077
MnCl ₂	2717,10		0,0049
CuSO ₄	1811,40		0,0000
Na ₂ MoO ₄ ⁽²⁾	1630,26		0,0003
ZnSO ₄	724,56		0,0003
FeCl ₃	633,99		0,0006
Vitamin	Preis € kg¹		
Thiamin HCl	27,17	0,0003	0,0003
Cyanocobalamin	905,70	0,0453	0,0014
Gesamtpreis € m³:		0,9701	0,8657

¹ EG6-Medium mit der reduzierten Cyanocobalaminkonzentration.

² H₂MoO₄ wurde ausgetauscht durch Na₂MoO₄

von 0,25 vvm (und 100 mbar Überdruck) eine positive Nettoenergiebilanz ergibt, wenn man die aus der Algenbiomasse generierte Energie mit der zur Aufzucht investierten Energie verrechnet. Im direkten Vergleich von 1,00 und 0,05 vvm Gasvolumenstrom wurden hierfür Produktionskosten im technischen Maßstab von 4,32 und 2,27 € ermittelt unter Verwendung konventioneller Drehkolbengebläse für den Gaseintrag [Norsker *et al.*, 2012]. Eine andere sorgfältige Hochrechnung geht von Produktionskosten von 12,6 € kg⁻¹ Biotrockenmasse produziert in Rohrbioreaktoren aus, wo ein Ertrag von 200 t a⁻¹ mit Trocknung der Biomasse am Standort Spanien erzielt wird [Acién *et al.*, 2012].

Für ein *worst case* Szenario wurde ebenfalls die mittlere Biotrockenmasseproduktivität aus Abschnitt 4.9.2 aus der repetitiven Satzkultivierung mit circadianem Rhythmus und 5 cm Schichtdicke mit 0,11 g L⁻¹ d⁻¹ angenommen. Die Produktion soll über 10 Monate im Jahr in

Bioreaktoren mit 50 L m⁻² bei 40 % reiner Reaktorfläche je Hektar erfolgen, woraus sich 200 m³ ha⁻¹ Gesamtreaktorvolumen bzw. 8 t ha⁻¹ a⁻¹ Biotrockenmasse (aus 0,11 g L⁻¹ d⁻¹) ergeben würden. Für beide genannten Szenarios und den daraus resultierenden Produkterträgen sowie den aktuellen Marktpreisen aus der Fachliteratur und der Handelsplattform alibaba.com (gefunden im Tonnenmaßstab bei mindestens 10 Anbietern im Februar 2016) wurden in Tabelle 20 folgende mögliche Umsätze kalkuliert. Sofern die Stoffe als solche nicht verfügbar waren, wie z.B. Paramylon als Bioplastik-Granulat, wurden ähnliche Stoffe für einen

Tabelle 20: Hochrechnung möglicher Umsätze aus der gesamten Biomasse oder aus einzelnen gereinigten Produkten für zwei verschiedene Szenarien für die BRD. Die Berechnungsgrundlagen für das *best case-* und *worst case-*Szenario sind dem Text zu entnehmen. Die Preisspektren ergeben sich aus den Abnahmegrößen (Staffelpreise). Kursumrechnung. 1 \$ = 0,9192 €

Produkt	Referenz/Anwendung	Marktpreis	<i>best case</i> mit 64 t ha ⁻¹ a ⁻¹ € ha ⁻¹ a ⁻¹	<i>worst case</i> mit 8 t ha ⁻¹ a ⁻¹ € ha ⁻¹ a ⁻¹
Biomasse	Benemann, 2013 <i>biofuel</i> /Tiernahrung	1000 \$ t ⁻¹	58829	7354
Biomasse	Benemann, 2013 Nahrung	>10000 \$ t ⁻¹	>588 288	>73536
α-Tocopherol	Valentin und Qi, 2005 Nahrung/Kosmetik	20 \$ kg ⁻¹	3471	433
α-Tocopherol	Alibaba.com Nahrung/Kosmetik	1 - 90 \$ kg ⁻¹ (≥95 % rein)	172 - 15619	21 - 1952
β-1,3-Glucan (aus Hefe als β-1,3/1,6)	Alibaba.com Nahrung/Kosmetik	50 - 150 \$ kg ⁻¹ (80- 99 % rein)	1,06-3,17 Mio.€	0,13-0,40 Mio.€
Bioplastik (Polylactid)	Alibaba.com Verpackungen	1600 -6000 \$ t ⁻¹ (4)	36800 - 138000	4600 - 17250
ω3-Fettsäuren (aus Mikroalgen)	Borowitzka, 2013 Nahrung/Kosmetik	140 \$ kg ⁻¹	2941 ⁽¹⁾	368
Phycocyanin	Borowitzka, 2013 verschiedene Anwen- dungen	500 - 100000 \$ kg ⁻¹ (Reinheit 0,7-4,0) ⁽²⁾	55152	6894 ⁽³⁾
C-Phycocyanin	Soley Institute 2016 verschiedene Anwen- dungen	4207 - 959000 \$ kg ⁻¹ (Reinheit 0,5-3,4) ⁽²⁾	464049	58006

¹ Reinheit aus dem Quotienten der Absorptionen A620/A280.

² Berechnung auf Grundlage von mindestens 250 mg L⁻¹ ω3-Fettsäuren bei höheren Lichtflüssen am gewünschten Erntezeitpunkt am Tag acht (siehe Ergebnisse aus Abschnitt 4.5.4)

³ Berechnung auf Grundlage der Ergebnisse aus Abschnitt 4.14 mit insgesamt 75 mg L⁻¹ Phycocyanin mit der Reinheit von 0,7.

⁴ Sofern Paramylon als Bioplastik verwendet werden würde, wurden hierzu die Staffelpreise von 10 Anbietern für derzeit verfügbares Bioplastik-Granulat (PLA, Polylactid) im Tonnenmaßstab verwendet.

ungefähren Vergleich herangezogen. Es wird schnell deutlich, dass sich insbesondere die Herstellung von Paramylon zur Nahrungsergänzung oder für die Kosmetikindustrie in der Gesamtbilanz positiv rechnet. Damit kann die Strategie einer neuen technischen Anlage so ausgelegt werden, dass zunächst Hochwertprodukte für eine schnelle Amortisationsphase hergestellt werden, bevor die Anlage für die Herstellung von Niedrigwertprodukten weitergenutzt werden kann (ausgenommen Verschleißteile). Werden nun die oben erwähnten Produktionskosten je kg Biotrockenmasse bei einer Flachplatten-*airlift*-Anlagengröße von 1 Hektar mit den Umsatzpotentieller Produkte aus Tabelle 21 verrechnet, ergeben sich potentiell gewinnbringende Produktionswege. Es wird hierbei schnell klar, dass ein solches Bioraffineriekonzept eine deutlich positivere wirtschaftliche Bilanz aufweist, wenn ein hochpreisiges Produkt wie Paramylon für die Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie in der Wertschöpfungskette integriert ist. Dabei wurde bei den Hochrechnungen nicht die Wiederverwendung der Medien erörtert, was die Kosten weiter senken würde. Ebenso wenig sind die Aufreinigungskosten einbezogen, zumal hochreines Paramylon verschiedene Aufreinigungsschritte erfordert. Hinsichtlich der Extraktion der Lipide und dem α -Tocopherol wurde bereits das Potential und die Kosteneffektivität von überkritischem CO₂ und einer konventionellen Nasswinterisierung von Fettsäuren umschrieben. Nichtsdestotrotz zeigt sich ein noch großer finanzieller Handlungsspielraum, wenn ein hochpreisiges Produkt koproduziert wird. Auch Phycocyanin mit einer Reinheit von mindestens 1,5 würde im *best case* Szenario laut Preisliste vom Soley Institute [2016] mehr als 13 Mio. \$ liefern ausgehend von 64 t Biotrockenmasse. Somit ergeben sich sowohl eine energetische als auch wirtschaftliche positive Bilanz bei der Wahl bestimmter Produkte und deren Qualität. Kombinationen von Wertschöpfungsketten ausschließlich mit Niedrigwertprodukten erbringen keine positive Bilanz im kleinen Maßstab von 1 Hektar. Hierzu wäre eine Großdimensionierung

Tabelle 21: Gewinn/Verlust-Rechnung auf Grundlage der Betriebskosten nach Norsker *et al.* [2011] und den Umsatz aus den Produkten aus Tabelle 20. Hierbei wurden immer die unteren Staffelpreise angenommen.

Ein hochpreisiges Produkt	<i>best case</i> mit 64 t ha⁻¹ a⁻¹	<i>worst case</i> mit 8 t ha⁻¹ a⁻¹
Produktionskosten 10,49 € kg ¹	-671360 €	-83920 €
Umsatz aus Paramylon als Nahrungs-/Kosmetikzusatz in €	+1060000 €	+132500 €
Umsatz aus ω 3-Fettsäuren als Nahrungs-/Kosmetikzusatz in €	+2941 €	+368 €
Umsatz aus α -Tocopherol als Nahrungsmittelzusatz in €	+3471 €	+434 €
Summe:	+395052 €	+49382 €

notwendig, wodurch der Produktionspreis weiter sinkt. Für eine ungefähre Halbierung der Produktionskosten ist eine Dimensionierung auf 100 Hektar nötig [Norsker *et al.*, 2011]. Doch auch unter diesen Bedingungen wäre mit Flachplattenphotobioreaktoren und ausschließlich Niedrigwertprodukten wie Biokraftstoffen oder Bioplastik kaum die Gewinnzone erreichbar, was auch in der Fachliteratur diskutiert wurde [Benemann, 2013]. Die logische Konsequenz wäre somit beispielsweise beim Paramylon ein Teil für das hochpreisige Produkt und ein Teil oder Überproduktionen für das Niedrigwertprodukt zu verwenden. Beide unterscheiden sich nur im Reinheitsgrad, also der Wiederholung der Reinigungsschritte. So könnten auch derzeit nicht in einem Bioraffineriekonzept gewinnbringend produzierte Rohstoffe lukrativer in der Herstellung werden und langfristig zunehmend von fossilen Quellen Rohstoffquellen getrennt werden.

5. Zusammenfassung

Mit der Verwendung von Biomasse aus Mikroalgen wurde in dieser Arbeit ein neues integriertes Bioraffineriekonzept mit *E. gracilis* entwickelt, dessen Umsetzung sich am Positionspapier BioÖkonomie 2030 orientierte. Dabei soll die Biomasse in Freiland-Photobioreaktoren mit Sonnenlicht und CO₂ als Kohlenstoffquelle wachsen, welches aus Rauch-/Abgasen genutzt werden kann. Im Zusammenhang mit der Anzucht von Mikroalgen im technischen Maßstab wurden aus der Fachliteratur bekannte Schwachstellen mit besonderer Sorgfalt optimiert. Technische Fragestellungen wurden dabei unter der Bedingung einer effektiven Skalierbarkeit gelöst. Unter anderem waren dies bestimmte Betriebskostenpunkte einer technischen Anlage, wie die Energiekosten für die Begasung von Mikroalgenkulturen und Ernte der Biomasse. Hier konnte gezeigt werden, dass bei der gewählten Mikroalge sehr geringe Gasvolumenströme diesen Kostenpunkt deutlich minimieren und ohne ein Einbruch in der Biomasseausbeute zu erhalten den Prozess sogar reproduzierbarer gestalten. Zur Reduktion der Erntebetriebskosten wurden zum einen die Möglichkeit der Biomassekonzentrierung bereits im Photobioreaktor mit Hilfe der Strömung vorgestellt. Zum anderen wurde eine tagesrhythmus-orientierte Ernte der Biomasse mit einem Zellabsetzer entwickelt. Kontaminationsprobleme wurden drastisch reduziert, indem zunächst eine nötige Sanitisierung der Photobioreaktor-Anlage mit dem Kultivierungsmedium entwickelt wurde. Dieses wurde in seine Säure- und Base-Bestandteile geteilt und getrennt dem Prozesswasser zugegeben. Die Wahl des Kultivierungs-pH-Wertes von 3,0 unterstützte im Weiteren zusätzlich den axenischen Zustand der Kultur. In vielen der genannten Punkte spielte die Wahl von *E. gracilis* eine zentrale Rolle bei der Umsetzung im Rahmen einer Massenkultivierung, wie z.B.: die Unbedenklichkeit beim Austritt in die Umwelt, ein gutes Wachstum bei sauren pH-Werten zur Minimierung des Kontaminationsrisikos, verwertbare Produkte für verschiedene Endanwendungen mit dem Potenzial, derzeit fossile Rohstoffquellen zu ersetzen, eine vereinfachte Ernte durch vergleichsweise große Zellen und ein einfacher Zugang zu den Produkten dank einer Pellikula als Zellhülle. Als vielversprechende primäre Produkte mit guter Zugänglichkeit wurden das Vitamin E α -Tocopherol, das β -1,3-Glucan Paramylon und die Lipidfraktion mit ihren Fettsäuren ausgewählt. Für ein reproduzierbares und stabiles Wachstum mit hoher Produktausbeute wurde das EG5.1-Prozessmedium zur Kultivierung von *E. gracilis* entwickelt, bei verschiedenen Kultivierungen charakterisiert und mathematisch hinsichtlich einer Reduktion des stofflichen Einsatzes weiter optimiert. Das finale EG6-Medium weist Kosten von 0,87 € m³ bei den aktuellen Handelspreisen der entsprechenden Stoffe im Großmaßstab – das EG5.1-Medium 0,1 € mehr. Kultivierungen bei verschiedenen Lichtflüssen und einer konstanten Schichtdicke von 1 cm zeigten die Abhängigkeiten in Bezug auf den Energiefluss und die maximalen Produktausbeuten. Lichtflüsse von 700 bis

1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erbrachten hierbei nach acht Tagen Schüttelkolbenkultivierung Biotrockenmassekonzentrationen von 5,6 bis 6,7 g L^{-1} mit rund 1 mg g^{-1} α -Tocopherol, etwa 45 % (w/w) Paramylon und ca. 25 % (w/w) Lipiden. Die Lipidfraktionen wiesen Konzentrationen an ω 3-Fettsäuren mit 250 bis 300 mg L^{-1} Kulturbrühe bzw. 60 bis 75 mg L^{-1} (20:5n3) und einem ω 3/ ω 6-Verhältnis von 1,8 auf. Bei repetitiven Satz- und kontinuierlichen Kultivierungen im Bioreaktor über lange Zeiträume wurden zum Teil höhere Produktausbeuten erzielt, wobei eine höhere Schichtdicke der Kultur im Bioreaktor die Biotrockenmassekonzentration durch Lichtlimitierung entsprechend minderte oder aber ein Tag/Nacht-Rhythmus bei der Illumination weniger Energie je Zeit lieferte. Dabei ergäben sich durch die repetitive Satzkultivierung sowie Ernte besonders im technischen Maßstab große Vorzüge: die Ernte umfasst nur einen Teil des gesamten Arbeitsvolumens, womit die technische Ernte-Ausstattung entsprechend kleiner dimensioniert werden könnte und täglich ausgelastet sein würde. Weiterhin kann die Ernte wie bei eigenen Versuchen über Nacht erfolgen, wo die motilen *E. gracilis*-Zellen eine maximale Sedimentationsfähigkeit im circadianem Tag/Nacht-Rhythmus aufwiesen. Hierbei konnte die Biomasse um den Faktor 24 bzw. 36 konzentriert über das Volumen bzw. die Biomasse erreicht werden, wobei eine höhere Konzentrierung durch einen längeren Zellabsetzer generell möglich sein sollte.

Wichtige Fragestellungen hinsichtlich eines Freilandbioreaktormodules wurden mit einer Photobioreaktor-Studie erörtert. Vorgeschlagen wird eine Reaktorgeometrie mit parallelen Platten, zwischen denen der Sonnenlichtfluss verdünnt werden kann. Je nach Abstand der Platten zueinander und deren Schichtdicke kann das Reaktormodul an die geographischen Lichtverhältnisse angepasst werden. Für minimale Materialkosten wurde Gewächshausfolie verwendet, welche mehrere Eigenschaften besitzt, die das Wachstum der Mikroalgen unterstützen. Für Freilandanwendungen sollte eine dickere Folie eingesetzt werden bzgl. eventueller durch Tiere verursachten Schäden. Für eine kostengünstige Begasungsmöglichkeit mit möglichst kleinen Blasen wurde die fluidische Oszillation vorgeschlagen, wo über erzeugte Druckwellen ein Blasenabriss an der Oberfläche erzwungen wird. Da in jeder einzelnen Platte der Reaktorstudie durch Führungen bestimmte Strömungsrichtungen entstehen, wurden diese genutzt, um eine Konzentrierung der Biomasse bereits im Reaktor zu ermöglichen, wobei ein hierzu notwendiger Sackgasse-Kanal bei der Realisierung der Studie mit Hilfe von Magnetschaltern oder ähnlichen Vorrichtungen die Materialkosten bzw. Investitionskosten erhöhen würde.

5.1 Ausblick

(Dieser Ausblick entspricht nicht einem konventionellen Ausblick gängiger Dissertationen). Die Umstellung der heutigen zum Großteil auf petrochemischen Wertschöpfungsketten basierenden Ökonomie hin zu einer Bioökonomie, wie sie im Positionspapier der BRD „Nationale

Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030“ vorgeschlagen ist, wird auch in kommender Zukunft die Gesellschaft vor zahlreiche Herausforderungen stellen. In dieser Arbeit wurde ein Konzept vorgestellt, wie dies mit Hilfe von Mikroalgen gelingen kann. Es stellt einen sinnvollen Ansatz dar, sich der wandelnden Welt in Hinsicht auf unsere Sicherstellung zukünftiger Ressourcen entsprechend aufzustellen und wird auch nur gelingen, wenn es in voller Breite gesellschaftlich, technisch und auch ethisch implementiert wird. Beispielsweise werden die kommunalen Versorger künftig nicht nur für die Entsorgung von Abwässern und Feststoffabfällen sorgen müssen – eine kommunale Abgasentsorgung von Betrieben und öffentlichen Einrichtung wird nötig, um das künftige Substrat CO₂ aufzufangen und wiederzuverwerten. Auf diese CO₂-Infrastruktur können sowohl kommunale Betriebe wie die Klärwerke zugreifen, welche mit Abwässern oder Klärschlammüberstand aus Biogasanlagen Mikroalgen kultivieren und so die nährstoffreichen Quellen sinnvoll weiterverwenden oder aber die Industrie, welche mit Mikroalgen eine große Palette an verschiedenen Stoffen von Lebensmittelzusätzen bis zu Plastik und Biokraftstoffen herstellt. Technische Anlage sollten an geographisch sinnvollen Orten wie bei Mülldeponien (aufgrund von nährstoffreichen Sickerwasser), an alten Übertagebauwerken (wo viel Grundwasser anfällt) oder integriert in einen landwirtschaftlichen Betrieb mit Gülleüberschuss und Biogasanlage. Dabei erfüllt die Strategie mit Mikroalgen den zentralen Punkt aus der Konkurrenz zur Lebensmittelproduktion zu treten, da Mikroalgen auf Brachland in entsprechend kostengünstigen Photobioreaktoren gezüchtet werden können. Beim vorgestellten Konzept dient hierfür ein Wildtyp von *E. gracilis*, welcher als natürlicher Organismus auch in europäischen Breitengraden in zahlreichen Gewässern vorkommt und Bestimmung der Wassergüte herangezogen wird. Somit ist er optimal an die hiesigen klimatischen Bedingungen adaptiert und nicht als giftige oder potentielle Plagealge einzustufen, wenn es unbeabsichtigt in die Gewässer gelangt. In Verbindung mit dem entwickelten Medium nach der aktuellen Richtlinie der Düngemittelverordnung stellt die Kulturbrühe beim eventuellen Austritt aus einem Photobioreaktormodul beispielsweise durch eine durch Tiere verursachte Leckage keine Bedrohung dar, da keine unerlaubte Substanzen ins Erdreich und Gewässer gelangen würden.

6. Quellen

Ackman, R. G., Sipos, J. C. (1964). Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detectors. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **41**: 377-378.

Ahrens, R. H. (2013). Rohstoff CO₂: ein Traum wird wahr. *VDI Nachrichten* **42**: 16.

Albertano, P., Ciniglia, C., Pinto, G., Pollio, A. (2000). The taxonomic position of *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* and *Galdieria*: an update. *Hydrobiologia* **433**: 137-143.

Albertsson, P. Å. (1986). Partition of cell particles and macromolecules. Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA. 321-324.

Altwater, E. (2007). Die Millenniumziele sind nicht erreicht In: Batosch, U. und Gansczyk, K.: Weltinnenpolitik für das 21. Jahrhundert. Carl-Friedrich von Weizsäcker verpflichtet. 1. Auflage 2007. Lit Verlag, Münster.

Ambati, R. R., Moi, P. S., Ravi, S., Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications – A Review. *Marine Drugs* **12**: 128-152.

Ación, F. G., Fernández, J. M., Magán J. J., Molina, E. (2012). Research review paper Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances* **30**: 1344-1353.

Anding, C., Brandt, R. D., Ourisson, G. (1971). Sterol biosynthesis in *Euglena gracilis* Z. *European Journal of Biochemistry* **24**: 259-263.

Arroyo, M., Heltai, L., Millán, D., De Simone, A. (2013). Reverse engineering the euglenoid movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 17874-17879.

Ban-Weiss, G., Chen, J., Buchholz, B. A., Dibble, R. W. (2007). A numerical investigation into the anomalous slight NO_x increase when burning biodiesel, A new (old) theory. *Fuel processing technology* **88**: 659-667.

Baker, H., Frank, O. (1968). Clinical Vitaminology: Methods and Interpretation. Chapter III - Biotin. Interscience Publishers, A Division of John Wiley & Sons. S. 22-29.

Baker, E. R., McLaughlin, J. J., Hutner S. H., DeAngelisa, B., Feingold, S., Frank, O., Baker, H. (1981). Water-Soluble Vitamins in Cells and Spent Culture Supernatants of *Poterochromonas stipitata*, *Euglena gracilis* and *Tetrahymena thermophila*. *Archives of Microbiology* **129**: 310-313.

Barclay, W. R., Abril, J. R. (1994). Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *Journal of Applied Phycology* **6**: 123-129.

- Barras, D. R., Stone, B. A. 1968. Carbohydrate composition, in Buetow, D. E., (Ed.): The Biology of *Euglena*, Academic Press, New York. **2**: 149-191.
- Barsanti, L., Bastianini, A., Passarelli, V., Tredici, M. R., Gualtieri, P. (2000). Fatty acid content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. *Journal of Applied Phycology* **12**: 515-520.
- Barsanti, L., Vismara, R., Passarelli, V., Gualtieri, P. (2001). Paramylon (1,3- β -glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*: Effects of growth conditions. *Journal of Applied Phycology* **13**: 59-65.
- Bauch, A., Lindtner, O., Mensink, G. B. M., Niemann, B. (2006). Dietary intake and sources of long-chain n-3 PUFAs in German adults. *European journal of clinical nutrition* **60**: 810-812.
- Bäumer, D., Preisfeld, A., Ruppel, H. G. (2001). Isolation and Characterization of Paramylon Synthase from *Euglena gracilis* (EUGLENOPHYCEAE). *Journal of Phycology* **37**: 38-46.
- Becker, E. W. (1994). Microalgae. Biotechnology and Microbiology. Reprint 1995. Cambridge University Press, Cambridge. S. 177-185.
- Ben-Amotz, A., Tornabene, T. G., Thomas, W. H. (1985). Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *Journal of Phycology* **21**: 72-81.
- Bene, P., Frommelius, H., Schulte, H.G., Meinhold, A. und Bergmann, E. (2008). Use of Esters as Coalescing Agents. US Patent: 12/598,505.
- Benemann, J., Oswald, W. (1996). Systems and Economic Analysis of Microalgae Ponds for Conversion of CO₂ to Biomass, Final Report to the US Department of Energy. Technical Report DOE/PC/93204--T5; ON: DE97052880; TRN: 97:004328 Pittsburgh Energy Technology Center. Auch erhältlich unter der URL: <http://www.osti.gov/scitech/biblio/493389> (zuletzt gesichert: 20.01.2016)
- Benemann, J. (2008). Open ponds and closed photobioreactors – comparative economics. Abstract from the 5th Annual World Congress on Industrial Biotechnology and Bioprocessing, 30.04.2008, Chicago, USA.
- Benemann, J. (2013). Microalgae for Biofuels and Animal Feeds. *Energies* **6**: 5869-5886.
- Benson, A. A. (1966). On the orientation of lipids in chloroplast and cell membranes. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **43**: 265-270.
- Benson, R. E., Hall, C. A. (1972). The effects of common salts on the *Euglena gracilis* bioassay of vitamin B 12. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine* **139**: 1096-1099.
- Benzie, I. F. F. (1996). Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *International journal of food sciences and nutrition* **47**: 233-261.

- Bergmann, P., Ripplinger, P., Beyer, L., Trösch, W. (2013). Disposable Flat Panel Airlift Photobioreactors. *Chemie Ingenieur Technik* **85**: 202-205.
- Betz, S. F. (1993). Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Science* **2**: 1551-1558.
- Birtigh, A., Johannsen, M., Brunner, G. (1995). Supercritical-fluid extraction of oil-palm components. *The Journal of Supercritical Fluids* **8**: 46-50.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total Lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**: 911-917.
- BMBF (2010). Nationale Forschungsstrategie - BioÖkonomie 2030. *BMBF Referat Bioökonomie*. DruckVogt, Berlin.
- Borowitzka, M. A. (1992). Algal biotechnology products and processes – matching science and economics. *Journal of Applied Phycology* **4**: 267-279.
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae – their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology* **25**: 743-756.
- Boussiba, S., Richmond, A. E. (1979). Isolation and Characterization of Phycocyanins from the Blue-Green Alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology* **120**: 155-159.
- Brandt, R. D., Pryce, R. J., Anding, C., Ourisson, G. (1970). Sterol biosynthesis in *Euglena gracilis* Z. *European Journal of Biochemistry* **17**: 344-349.
- Brennan, L. und Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**: 557-577.
- Brinkmann, K. 1966. Temperatureinflüsse auf die circadiane Rhythmik von *Euglena gracilis* bei Mixotrophie und Autotrophie. *Planta* **70**: 334-389.
- Brommund, U. (2004). Molekulare Identifizierung und Charakterisierung der Glucosyl-transferase EgPaS (Paramylon-Synthase) aus *Euglena gracilis* (Euglenozoa). *Dissertation*. Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Brown, G. D., Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**: 36-37.
- Buetow D. E., 1962. Differential effects of temperature on the growth of *Euglena gracilis*. *Experimental Cell Research* **27**: 137-142.
- Buetow, D. E. (1965). Growth, survival and biochemical alteration of *Euglena gracilis* in medium limited in sulfur. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **66**: 235-242.

- Buetow, D. E. (1968). The Biology of *Euglena* Vol. 1: General biology and ultrastructure. Academic Press, New York.
- Buetow, D. (1982). The biology of *Euglena* Vol 4: Subcellular Biochemistry and Molecular Biology. Academic Press, New York.
- Buetow, D. E. (2011) *Euglena*. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Bumbulis, M. J., Balog, B. M. (2013). UV-C exposure induces an apoptosis-like process in *Euglena gracilis*. *IRSN Cell Biology* **2013**: 1-6.
- Castelli, D., Colin, L., Camel, E., Ries, G. (1998). Pretreatment of skin with a Ginkgo biloba extract/sodium carboxymethyl- β -1,3-glucan formulation appears to inhibit the elicitation of allergic contact dermatitis in man. *Contact Dermatitis* **38**: 123-126.
- Carvalho, A., Meireles, L., Malcata, F. (2006). A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress* **22**: 1490-1506.
- Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P., Pinto, E.(2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **146**: 60-78.
- CCCryo (2015). Informationen zu *Chloromonas platystigma* aus der Schnee- und Permafrostalgen-Sammlung CCCryo. Daten sind verfügbar unter der URL: <http://cccryo.fraunhofer.de/web/strains/detail-view/big/show/020-99> (zuletzt gesichtet: 20.11.2015).
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* **25**: 294-306.
- 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**: 322-329.
- Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* **99**: 4044-4064.
- Chmiel, H. (2011). Bioprozesstechnik - Flotation und Schaumseparation: 313-316. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Deutschland.
- Choi, S. K., Lee, J. Y., Kwon, D. Y., Cho, K. J. (2006). Settling characteristics of problem algae in the water treatment process. *Water Science and Technology* **53**: 113-119.
- Clarke, A. E., Stone, B. A. (1960). Structure of the paramylon from *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* **44**: 161-163.
- Codd, G. A., Merrett, M. J. (1971). The Regulation of glycolate metabolism in division synchronized cultures of *Euglena*. *Plant Physiology* **47**: 640-643.

Cohen, Z., Norman, H. A., Heimer, Y. M. (1995). Microalgae as a source of omega-3 fatty acids. *World Review of Nutrition and Dietetics* **77**:1-31.

Conda Laboratorios (2013). PROTEOSE PEPTONE CAT N°: 1609. URL: www.conda-lab.com/pdf/1609.pdf (zuletzt gesichtet: 20.01.2016).

Constantopoulos, G., Bloch, K. (1967). Effect of Light Intensity on the Lipid Composition of *Euglena gracilis*. *The Journal of Biological Chemistry* **15**: 3538-3542.

Cook, J. R. (1963). Adaptations in Growth and Division in *Euglena* Effected by Energy Supply. *The Journal of Protozoology* **10**: 436-444.

Cook, J. R. (1966). Photosynthetic activity during the division cycle in synchronized *Euglena gracilis*. *Plant Physiology* **41**: 821-825.

Cook, J. (1968). A Continuous Culture Device for Protozoan Cells. *The Journal of Protozoology* **15**: 452-455.

Cook, J., (1973). Unbalanced growth and replication of chloroplast populations in *Euglena gracilis*. *Journal of General Microbiology* **75**: 51-60.

Cook, J., Kaiser, H. (1973). Factors affecting pH-dependent photo-inhibition of division in *Euglena gracilis*. *Journal of Cellular Physiology* **82**: 48-96.

Cook, J., Li, T. (1973). Influence of culture pH on chloroplast structure in *Euglena gracilis*. *The Journal of Protozoology* **20**: 652-653.

Covestro AG (2015). Internetbeitrag: Klimakiller macht sich nützlich. URL: <http://www.covestro.com/de/Sustainability/Productions/Polyols.aspx> (zuletzt gesichtet: 20.10.2015)

Davis, R., Aden, A., Pienkos, P. T. (2011). Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. *Applied energy* **88**: 3524-3531.

Degen, J., Krumm, A., Retze, A., Schmid-Staiger, U., Trösch, W. (2000). A new typee of Photobioreactor using the flashing light effect to enhance algal growth to produce high valuable chemical products. Proceedings of the 4th International Congress on Biochemical Engineering. Fraunhofer IRB Verlag, Stuttgart.

De Luca, P., Taddei, R., Varano, L. (1978). „*Cyanidioschyzon merolae*“: a new alga of thermal acidic environments. *Webbia* **33**: 37-44.

De Luca, P., Moretti, A. (1983). Floridosides in *Cyanidium caldarium*, *Cyanidioschyzon merolae* and *Galdieria sulphuraria* (Rhodophyta, Cyanidiophyceae). *Journal of Phycology* **19**: 368-369.

- De Moralis, M. G., Costa, J. A. V. (2007). Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnology Letters* **29**: 1349-1352.
- De Swaaf, M. E., de Rijk, T. C., Eggink, G., Sijtsma, L. (1999). Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *Journal of Biotechnology* **70**: 185-192.
- Demirbas, A. (2010). Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management* **51**: 2738-2749.
- Dong, G., Liu, X., Chen, Z. Pan, W., Li, H., Liu, G. (2007). The dynamics of tocopherol and the effect of high temperature in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) embryo. *Food Chemistry* **102**: 138-145.
- Douwes, J. (2005). (1-->3)-Beta-D-glucans and respiratory health: a review of the scientific evidence. *Indoor Air* **15**: 160-169.
- Dubash, P. J., Rege, D. V. 1968. Chlorophyll formation in *Euglena gracilis* var. *bacillaris* interference by Vitamin analogues. *Journal of general microbiology* **51**: 127-135.
- Eder, K. (1995). Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of chromatography B, Biomedical applications* **671**: 113-131.
- Edge, P. A., Rickett, T. R. (1977). The effect of nitrogen refeeding on the carbohydrate content into nitrogen-starved cells of *Platymonas striata* Butcher. *Planta* **136**: 159-162.
- Egesel, C. O., Wong, J. C., Lambert, R. J., Rocheford, T. R. (2003). Combining ability of maize inbreds for carotenoids and tocopherols. *Crop Science* **42**: 818-823.
- Einicker-Lamas, M., Mezian, G. A., Fernandes, T. B., Silva, F. L. S., Guerra, F., Miranda, K., Attias, M. und Oliveira, M. M. (2002). *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu²⁺ and Zn²⁺ toxicity and accumulation in eukaryotic cells. *Environmental pollution* **120**: 779-786.
- Einicker-Lamas, M., Soares, M. J., Soares, M. S., Oliveira, M. M. (1996). Effects of cadmium on *Euglena gracilis* membrane lipids. *Brazilian journal of Medical and Biological Research* **29**: 941-948.
- Eriksen, N. T. (2008). Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied microbiology and biotechnology* **80**: 1-14.
- Eroshin, V. K., Satroutdinov, A. D., Dedyukhina, E. G., Chistyakova, T. I. (2000). Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* with growth-coupled lipid synthesis. *Process Biochemistry* **35**: 1171-1175.
- Euglena (2015). Informationen zum Produkt Rejuna von Euglena Co, Ltd. Ebenfalls zu finden unter der URL: <http://www.euglena.jp/en/solution/> (zuletzt gesichtet 02.01.2016).

Evans, H. M., Bishop K. S. (1922). On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* **8**: 650-651.

Evonik (2014). Evonik Industries. Evonik investiert in Biotechnologiefirma Algal Scientific. Pressemitteilung, 28. April 2014.

FNR - Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (2013). Broschüre: Basisdaten Bioenergie Deutschland, Broschüre Nr. 469. August 2013, FNR.

FNR - Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (2014). Broschüre: Basisdaten biobasierte Produkte. Broschüre Nr. 755, 1. Auflage und unter URL: <https://mediathek.fnr.de/basisdaten-biobasierte-produkte.html> (zuletzt gesichtet: 20.01.2016).

FNR - Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (2015a). Mediathek: Biokunststoffe, 2. Auflage. Broschüre Nr. 224 und unter URL: <https://mediathek.fnr.de/biokunststoffe.html> (zuletzt gesichtet: 20.01.2016).

FNR - Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (2015b). Mediathek: Basisdaten Bioenergie Deutschland, Broschüre Nr. 469 (FNR 2015) und unter URL: <https://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten/anbauflache-fur-nachwachsende-rohstoffe.html> (zuletzt gesichtet: 20.01.2016).

FNR - Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (2015c). Mediathek: Maisanbau in Deutschland, Pressegrafik, Artikelnummer: 493 (FNR 2015) und unter URL: <https://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten/bioenergie/biogas/maisbau-in-deutschland.html> (zuletzt gesichtet: 20.01.2016).

Fournier, V., Destailats, F., Juanéda, P., Dionisi, F., Lambelet, P., Sébédio, J. L., Berdeaux, O. (2006). Thermal degradation of long-chain polyunsaturated fatty acids during deodorization of fish oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* **108**: 33-42.

De Fraiture, C., Giordano, M., Liao, Y. (2008). Biofuels and implications for agricultural water use: blue impacts of green energy. *Water Policy* **10**: 67-81.

Fredrick, J. F. (1987). Transition Stages in the Evolution of the Glucosyltransferase Isozymes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **503**: 438-448.

Freyssinet G. (1976). Relation between Paramylum Content and the Length of the Lag Period of Chlorophyll Synthesis during Greening of Dark-grown *Euglena gracilis*. *Plant Physiology* **57**: 824-830.

Friedrich, J., Pryde, E. (1984). Supercritical CO₂ extraction of lipid-bearing materials and characterization of the products. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **61**: 223-228.

Fryer, M. J. (1992). The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (alpha-tocopherol). *Plant Cell and Environment* **15**: 381-392.

Ge, Y., Ni, Y., Chen, Y., Cai, T. (2002a). Optimization of the supercritical fluid extraction of natural vitamin E from wheat germ using response surface methodology. *Journal and Food Science* **67**: 239-243.

Ge, Y., Yang, H., Hui, B., Ni, Y., Wang, S., Cai, T. (2002b). Extraction of natural vitamin E from wheat germ by supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 685-689.

Gershwin, M. E., Belay, A. (2007). *Spirulina* in human nutrition und health. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Gottlieb, J. (1850). Über eine neue, mit Stärkemehl isomere Substanz. *Annalen der Chemie und Pharmacie* **75**: 51-61.

Graverholt, O. S., Eriksen, N. T. (2007). Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Applied microbiology and biotechnology* **77**: 69-75.

Graziani, G., Schiavo, S., Nicolai, M., Buono, S., Fogliano, V., Pinto, G., Pollio, A. (2013). Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Food & Function* **4**: 144–152.

Green, J., Price, S. A., Gare, L. (1959). Tocopherols in Microorganisms. *Nature* **184**: 1339.

Grima, E., Belarbi, E.-H., Ancien Fernandez, F. G., Medina, A. R., Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites - process options and economics. *Biotechnology Advances* **20**: 491-515.

Grimm, P., Risse, J. M., Cholewa, D., Müller, J. M., Beshay, U., Friehs, K., 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* **2015**: 1-8.

Grobbelaar, J. (2000). Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. *Journal of Applied Phycology* **12**: 201-206.

Gross, S., Robbins E. (2000). Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts. *Hydrobiologica* **433**: 91-109.

Gross, W., Schnarrenberger, C. (1995). Heterotrophic growth of two strains of the acido-thermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant and Cell Physiology* **36**: 633-638.

Guehler, P. E., Peterson, L., Tuchiya, H. M., Dodson, R. M. (1964). Microbiological transformation. XIII. Composition of the wax formed by *Euglena gracilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **106**: 294-298.

Gunstone, F. D., Padley, F. B. (1997). *Lipid Technologies and Applications*. CRC-Press, NewYork.

- Hadolin, M., Skerget, M., Knez, Z., Bauman, D. (2001). High pressure extraction of vitamin E-rich oil from *Silybum marianum*. *Food Chemistry* **74**: 355-364.
- Harith, Z. T., Yusoff, F. M., Mohamed, M. S., Din, M. S. M., Ariff, A. B. (2009). Effect of different flocculants on the flocculation cells. *African Journal of Biotechnology* **8**: 5971-5978.
- Harris, J. 1696. VII. Some microscopical observations of vast numbers of animacula seen in water. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **19**: 254-259.
- Harris, R. C., und Kirk, JTO. 1969. Control of chloroplast formation in *Euglena gracilis* antagonism between carbon and nitrogen sources. *Biochemical Journal* **113**: 195-205.
- Hassapidou, M. N., Manoukas, A. G. (1993). Tocopherol and tocotrienol compositions of raw table olive fruit, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **61**: 277-280.
- Heasman, M., Diemar, J., O' Connor, W., Sushames, T., Foulkes, L., Nell, J. A. (2000). Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs – a summary. *Aquaculture Research* **31**: 637-659.
- Hedrich, S., Johnson, D. (2013). Aerobic and anaerobic oxidation of hydrogen by acidophilic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **349**: 40-45.
- Heelis, D. V., Kernick, W., Phillips, G. O., Davies, K. (1979). Separation and identification of the carotenoid pigments of stigmata isolated from light-grown cells of *Euglena gracilis* strain Z. *Archives of Microbiology. Archives of Microbiology* **121**: 207-211.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.
- Henzler, H. J. (2012). Kontinuierliche Fermentation mit tierischen Zellen Teil 2. Techniken und Methoden der Zellrückhaltung. *Chemie Ingenieur Technik* **84**: 1482-1496.
- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibanez, E. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry* **98**: 136-148.
- Ho, K., Kantor, A., und Warne, N. (2008). Development of freeze und thaw processes for bulk biologics in disposable bags PAT. *American Pharmaceutical Review* **11**: 64-70.
- Horum, M. A. , Schwartzbach, S. D. (1980). Nutritional regulation of organelle biogenesis in *Euglena*. Repression of organelle chlorophyll and NADP-glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase synthesis. *Plant Physiology* **65**: 382-386.
- Hosotani, K., Kitaoka, S. (1984). Determination of provitamin A in *Euglena gracilis* Z by high performance liquid chromatography and changes of the contents under various culture conditions. *Journal of Japan Society of Nutrition and Food Sciences* **37**: 519-524.

- Hosotani, K., Ohkochi, T., Inui, H., Yokota, A., Nakano, Y., Kitaoka, S. (1988). Photoassimilation of Fatty Acids, Fatty Alcohols and Sugars by *Euglena gracilis* Z. *Journal of general microbiology* **134**: 61-66.
- Hubbert, M. K. (1974). National Energy Conservation Policy Act of 1974: Hearings Before the Subcommittee on the Environment of the Committee on Interior and Insular Affairs, House of Representatives, Ninety-third Congress, Second Session, on H.R. 11343. U.S. Government Printing Office, Washington.
- Hugly, S., Somerville, C. (1992). A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature. *Plant Physiology* **99**: 197-202.
- Hulanicka, D., Bloch, K., Erwin, J. (1964). Lipid metabolism of *Euglena gracilis*. *Journal of biological chemistry* **239**: 2778-2787.
- Hurlbert, R., Rittenberg, S. (1962). Glucose Metabolism of *Euglena gracilis* var. *bacillaris*; Growth and Enzymatic Studies. *The Journal of Protozoology* **9**: 170-182.
- Hutner, S., Zahalsky, A., Aaronson, S., Baker, H., Frank, O. (1966). Culture Media for *Euglena gracilis*. In: Methods in cell physiology (Hg. D.M. Prescott), 2. Auflage. Academic Press, New York.
- IEA (2011). Technology Roadmap - Biofuels for Transport. International Energy Agency, Renewable Energy Division, Paris.
- Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y., Kitaoka, S. (1982). Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *FEBS Letters* **150**: 89-93.
- Isegawa, Y., Watanbe, F., Kitaoka, S., Nakano, Y. (1994). Subcellular distribution of cobalamin-dependent methionine synthetase in *Euglena gracilis*. *Phytochemistry* **35**: 59-61.
- Isuzu (2014). Isuzu and Euglena launch the DeuSEL® project, a joint effort to commercialize next-generation biodiesel. *Isuzu Motors Limited. Annual Report 2014*: 13-14. Auch erhältlich unter der URL: http://www.isuzu.co.jp/world/investor/annual/pdf/annual14e_08.pdf (zuletzt gesichtet 02.11.2015).
- Jones, C., Cook, J. (1978). Culture pH, CO₂ tension and cell division in *Euglena gracilis* Z. *Journal of Cellular Physiology* **96**: 253-260.
- Johnson, D. B. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology* **27**: 307-317.
- Kankkunen, P., Teirilä, L., Rintahaka, J., Alenius, H., Wolff, H., Matikainen, S. (2010). (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *Journal of Immunology* **184**: 6335-6342.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.-Å. (1996): The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**: 671-701.

- Kauss, H. (1968). Galaktosylglyzeride und Osmoregulation in Rotalgen. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **58**: 428-433.
- Kawabata, A., Miyatake, K., Kitaoka, S. (1982). Effect of temperature on the two energy-reserve substances, paramylon and wax esters, in *Euglena gracilis*. *Journal of Protozoology* **29**: 421-423.
- Kawabata A., Kaneyama M. (1989). The effect of growth temperature on wax ester content and composition of *Euglena gracilis*. *Journal of general microbiology* **135**: 1461-167.
- Kempner, E. S., Miller, J. H. (1964). The Molecular Biology of *Euglena gracilis*. I. Growth conditions and cellular composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **104**: 11-17.
- Kempner, E., Miller, J. (1972). Chapter 6 - Stimulation and Inhibition of the metabolism and growth of *E. gracilis* in: Buetow - The Biology of Euglena III. Academic Press, NY, USA.
- Kempner, E. S., Miller, J. H. (2003). The molecular biology of *Euglena gracilis*. XV. Recovery from centrifugation-induced stratification. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **56**: 219-224.
- Kerjean, V., Morel, B., Stiger, V., Bessières, M., Simon-Colin, C., Magné, C., Deslandes, E. (2007). Optimization of floridoside production in the red alga *Mastocarpus stellatus*: pre-conditioning, extraction and seasonal variations. *Botanica Marina* **50**: 59-64.
- Kitaya, Y., Azuma, H., Kiyota, M., (2005). Effects of temperature, CO₂/O₂ concentrations and light intensity on cellular multiplication of microalgae, *Euglena gracilis*. *Advances in Space Research* **35**: 1584-1588.
- Kiss, J. Z., Vasconcelos, A. C., Triemer, R. E. (1987). Structure of the Euglenoid storage carbohydrate, paramylon. *American Journal of Botany* **74**: 877-882.
- Knothe, G. (2008). "Designer" biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy & Fuels* **22**: 1358-1364.
- Knothe, G., Steidley, K. R. (2005). Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. *Fuel* **84**: 1059-1065.
- Koganemaru, A., Kawahara, Y. (2003). Development of a biodegradable film using paramylon prepared from *Euglena gracilis*. *Textile Research Journal* **59**: 457-460.
- Koll, M., Brandt, P., Wiessner, W. (1980). Hemmung der lichtabhängigen Chloroplastenentwicklung etiellierter *Euglena gracilis* durch Glucose. *Protoplasma* **105**: 121-128.
- Kondo, Y., Kato, A., Hojo, H., Nozoe, S., Takeuchi, M., Ochi, K. (1992). Cytokine-related immunopotentiating activities of paramylon, a beta-(1-3)-D-glucan from *Euglena gracilis*. *Journal of pharmacobio-dynamics* **15**: 617-621.

- Koritala, S. (1989). Microbiological synthesis of wax esters by *Euglena gracilis*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **66**: 133-134.
- Korn, E. D. (1964). The fatty acids of *Euglena gracilis*. *Journal of Lipid Research* **5**: 352-362.
- Kouyianou, K., Aivaliotis, M., Gevaert, K., Karas, M., Tsiotis, G., (2010). Membrane proteome of the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* (syn. *Chlorobaculum tepidum*) analyzed by gel-based and gel-free methods. *Photosynthesis research* **104**: 153-162.
- Kreger, D. R., Meeuse, B. J. (1952). X-ray diagrams of *Euglena*-paramylon, of the acid-insoluble glucan of yeast cell walls and of laminarin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **9**: 699-700.
- Krinsky, N. I., Goldsmith, T. H. (1960). The carotenoids of the flagellated alga, *Euglena gracilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **91**: 271-279.
- Lang, S. (2002). Biotenside. Grundlagen und Anwendungen. 1. Auflage. Teubner Verlag, Stuttgart.
- Larcher, W., (2003). Physiological Plant Ecology. Springer Verlag, Berlin.
- Lebert, M., Porst, M., Häder, D. P., (1999). Circadian Rhythm of Gravitaxis in *Euglena gracilis*. *Journal of Plant Physiology* **155**: 344-349.
- Lee, R. E. (2008). Phycology, 4. Aufl., S. 245-261, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Leenheer, A., Lambert, W., Bocxlaer, J. (2000). Modern chromatographic analysis of vitamins, 3. Edition, Marcel Dekker Inc., New York.
- Leland, N., Edmunds, J. R. (1965). Studies on synchronously dividing cultures of *Euglena gracilis* Klebs (Strain Z). II. Patterns of biosynthesis during the cell cycle. *Journal of Cellular Physiology* **66**: 159-181.
- Leu, S., Boussiba, S. (2014). Advances in the Production of High-Value Products by Microalgae. *Industrial Biotechnology* **10**: 169-183.
- Li, X. H., Fu, D., Latif, N. H., Mullaney, C. P., Ney, P. H., Mog, S. R., Whitnall, M. H., Srinivasan, V., Xiao, M., (2010). Delta-tocotrienol protects mouse and human hematopoietic progenitors from gamma-irradiation through extracellular signal-regulated kinase/mammalian target of rapamycin signaling. *Hematologica* **95**: 1996-2004.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q., Dubois-Calero, N., (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress* **24**: 815-820.
- Li, Y., Ghasemi Naghdi, F., Garg, S., Adarme-Vega, T. C., Thurecht, K. J., Ghafor, W. A., Tannock, S., Schenk, P. M. (2014). A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microbial Cell Factories* **13**:14.

- Li, Y., Tang, X., Song, W., Zhu, L., Liu, X., Yan, X., Jin, C., Ren, Q. (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Euglena gracilis*, *Euglena intermedia* and their extract. *IET Nanobiotechnology* **9**: 19-26.
- Linka, M., Jamai, A., Weber, A. P. M. (2008). Functional characterization of the plastidic phosphate translocator gene family from the thermo-acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria* reveals specific adaptations of primary carbon partitioning in green plants and red algae. *Plant Physiology* **148**: 1487-1496.
- Litton, R., Gilbert, J. (1975). Analysis of tocopherol in *Rhodotorula glutinis*, *Agaricus campestris* and *Euglena gracilis* using spectrofluorometry and rotifer bioassay. *Journal of General and Applied Microbiology* **21**: 345-354.
- Lohmann, T., Pahl, M. H. (1993). Mechanische Schaumzerstörung feststoffhaltiger Schäume. *Chemie Ingenieur Technik* **65**: 1362-1365.
- Maag, H. (1984). Fatty acid derivatives: important surfactants for household, cosmetic and industrial purposes. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **61**: 259-267.
- Graf, E. (1980). Vitamin E: A Comprehensive Treatise (Basic and Clinical Nutrition, Volume 1). Editiert von L. J. Machlin. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Mahapatra, D. M., Chanakya, H. N., Ramachandra, T. V. (2013). *Euglena* sp. as a suitable source of lipids for potential use as biofuel and sustainable wastewater treatment. *Journal of Applied Phycology* **25**: 855-865.
- Manirakiza, P., Covaci, A. und Schepens, P. (2001). Comparative study on total lipid determination using soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis* **14**: 93-100.
- Marcenko, E. (1978). Crystalloid bodies in *Euglena*. *European Journal of Cell Biology* **16**: 485-493.
- Marchessault, R. H., Deslandes, Y. (1979). Fine structure of (1→3)- β -d-glucans: curdlan and paramylon. *Carbohydrate Research* **75**: 231-242.
- Marquez, F. J., Sasaki, K., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S. (1993). Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **76**: 408-410.
- Masuda, M., Takahashi, K., Sakurai, N., Yanagiya, K., Komatsubara, S., Tosa, T. (1995). Further improvement of D-biotin production by a recombinant strain of *Serratia marcescens*. *Process Biochemistry* **30**: 553-562.
- Mata, T.M., Martins, A.A. und Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**: 217-232.

- McCormick, R.L., Graboski, M.S., Alleman, T.L., Herring, A.M. und Tyson, K.S. (2001). Impact of biodiesel source material and chemical structure on emissions of criteria pollutants from a heavy-duty engine. *Environmental science & technology* **35**: 1742-1747.
- McCree, K. J. (1981). Photosynthetically active radiation. In: Lange, O. L., Nobel, P. S., Osmond, C. B., Ziegler, H.: *Physiological Plant Ecology. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series 12A*: 41-55. Springer Verlag, Berlin.
- Mendes, R., Fernandes, H., Coelho, J., Reis, E., Cabral, J., Novais, J. und Palavra, A. (1995). Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry* **53**: 99-103.
- Mendes, R., Nobre, B., Cardoso, M., Pereira, A. und Palavra, A. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Protagonists in Chemistry* **356**: 328-334.
- Merola, A., Castaldo, R., de Luca, P., Gambardella, R., Musacchio, A., Taddei, R. (2009). Revision of *Cyanidium caldarium*. Three species of acidophilic algae. *Giornale botanico italiano* **115**: 189-195.
- Milledge, JJ., Heaven, S. (2013). A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **12**: 165-178.
- Molina, E., Fernandez, J., Acien, F.G., Chisti, Y. (2000). Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology* **92**: 113-131.
- Monfils, Anna K., Triemer, Richard E., Bellairs, Emily F. (2011). Characterization of paramylon morphological diversity in photosynthetic euglenoids (Euglenales, Euglenophyta). *Phycologia* **50**: 156-169.
- Mongrand, S., Bessoule, J., Cabantous, F., Cassagne, C. (1998) The C16:3\C18:3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plantspecies. *Phytochemistry* **49**: 1049-1064.
- Morales J., de la Noue J., Picard G. (1985). Harvesting marine microalgae species by chitosan flocculation. *Aquacultural Engineering* **4**: 257-270.
- Morweiser, M., Kruse, O., Hankamer, B., Posten, C. (2010). Developments and perspectives of photobioreactors for biofuel production. *Applied microbiology and biotechnology* **87**: 1291-1301.
- Müller, J. M., Risse, J. M., Jussen, D., Flaschel, E. (2013). Development of fed-batch strategies for the production of streptavidin by *Streptomyces avidinii* based on power input and oxygen supply studies. *Journal of Biotechnology* **163**: 325-332.
- Münder, P. (2014). Alternativer Treibstoff: Pack die Alge in den Tank. Zeit online. Artikel erhältlich unter URL: <http://www.zeit.de/mobilitaet/2014-11/kraftstoff-algen-alternative-energie> (zuletzt gesichtet 02.11.2015).

- Mutanda, T., Karthikeyan, S., Bux F. The utilization of post-chlorinated municipal domestic wastewater for biomass and lipid production by *Chlorella* spp. under batch conditions. *Applied biochemistry and biotechnology* **164**, 1126-1138.
- Nagai, J., Ohta, T., Saito, E. (1971). Incorporation of propionate into wax esters by etiolated *Euglena*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **42**: 523-529.
- Nicolas, P., Freyssinet, G. und Nigon, V. (1980). Effect of Light on Glucose Utilization by *Euglena gracilis*. *Plant Physiology* **65**: 631-634.
- Niki, E. (1987). Interaction of ascorbate and α -tocopherol. *Annals of the New York Academy of Sciences* **498**: 186-199.
- Noda, H., Akasaka, N., Ohsugi, M. (1994). Biotin production by bifidobacteria. *Journal of nutritional science and Vitaminology* **40**: 181-188.
- Norsker, N. H., Barbosa, M. J, Vermuë, M. H., Wijffels, R. H. (2011). Microalgal production - a close look at the economics. *Biotechnology Advances* **29**: 24-27.
- Norsker, N. H., Barbosa, M. J, Vermuë, M. H., Wijffels, R. H. (2012). On Energy Balance and Production Costs in Tubular and Flat Panel Photobioreactors. *Technikfolgenabschätzung - Theorie und Praxis* **21**: 54-62.
- Oesterhelt, C., Schmäzlin, E., Schmitt, J. M., Lokstein, H. (2007). Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **51**: 500-511.
- Ogbonna, J.C., Tomiyamal, S. und Tanaka, H. (1998). Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* Z for efficient production of α -tocopherol. *Journal of Applied Phycology* **10**: 67-74.
- Ogbonna, J., Ichige, E., Tanaka, H. (2002). Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**: 532-538.
- Ogbonna, James C. (2009): Microbiological production of tocopherols: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **84**: 217-225.
- Olaveson, M., Nalewajko C. (2000). Effects of acidity on the growth of two *Euglena* species. *Hydrobiologia* **433**: 39-56.
- Olofsson, M., Lamela, T., Nilsson, E., Bergé, J. P., del Pino, V., Uronen, P., Legrand, C. (2012). Seasonal Variation of Lipids and Fatty Acids of the Microalgae *Nannochloropsis oculata* Grown in Outdoor Large-Scale Photobioreactors. *Energies* **5**: 1577-1592.
- Ortiz, W. (1990). Protein synthesis during the initial phase of the temperature-induced bleaching response in *Euglena gracilis*. *Plant Physiology* **93**: 141-147

- Osipow, L., Snell, F.D., Marra, D. und York, W.C. (1956). Surface activity of monoesters fatty acid esters of sucrose. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **48**: 1462-1464.
- Packer L., Weber S. U., Rimbach G., 2001. Molecular Aspects of α -Tocotrienol Antioxidant Action and Cell Signalling. *Journal of Nutrition* **131**: 369S-373S.
- Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A. S., Raghavarao, K. S. M. S. (2006). Method to obtain C-phycoyanin of high purity. *Journal of Chromatography A* **1127**: 76-81.
- Patil, G., Raghavarao, K. S. M. S. (2007). Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoyanin. *Biochemical Engineering Journal* **34**: 156-164.
- Perkins, J. (2014). Going Commercial – Algenol Boosts Yields, Cuts Costs for Biofuel Production. *Biofuels Journal: Second Quarter Issue 2014*. Algenol LCA, USA.
- Phillips, J. N., Myers, J. (1954). Growth Rate of *Chlorella* in Flashing Light. *Plant Physiology* **29**: 152-161.
- Pimentel, D., Marklein, A., Toth, M. A., Karpoff, M. N., Paul, G. S., McCormack, R., Kyriazis, J., Krueger, T. (2009). Food Versus Biofuels: Environmental and Economic Costs. *Human Ecology* **37**: 1-12.
- Pohl, P. (1973). Light-induced changes of radioactivities in the ^{14}C -labeled lipids and fatty acids of dark grown *Euglena gracilis*. *Zeitschrift für Naturforschung* **28C**, 264-269.
- Polak, J., Balaban, M., Peplow, A. und Philips, A. (1989). Supercritical carbon dioxide extraction of lipids from algae. *Supercritical Fluid Science and Technology* **406**, 449-467.
- Popoff, M., Paspaleff, G. (1924). Experimentelle Zellstudien. VI. II. Teil: Encystierung und Stimulation. *Zellstimulat.-Forsch.* **1**: 129-148.
- Posten, C. (2009). Review: Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences* **9**: 165-177.
- Posten, C., Schaub, G. (2009). Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels – A process view. *Journal of Biotechnology* **142**: 64-69.
- Pulz, O., Scheibenbogen, K. (1998). Photobioreactors: Design and performance with respect to light and energy input. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* **59**: 124-152.
- Pulz O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**: 287-293.
- Pulz O., Gross W., (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**: 635-648.

- Quesada, L. A., de Lustig, E. S., Marechal, L. R., Belocopitow, E. (1976). Antitumor activity of paramylon on sarcoma-180 in mice. *Gann* **67**: 455-459.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Ashok Kumar, S., Sridhar, S., Rengasamy, R. (2008). A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical Reviews in Microbiology* **34**: 77-88.
- Reed, R. (1983). Taxonomic implications of osmoacclimation in *Cyanidium caldarium*. *Phycologia* **22**: 351-354.
- Regnault, A., Chervin, D., Chammai, A., Piton, F., Calvayrac, R., Mazliak, P. (1995). Lipid composition of *Euglena gracilis* in relation to carbon-nitrogen balance. *Phytochemistry* **40**: 725-733.
- Rhie, G., Beale, S. I. (1994). Regulation of heme oxygenase activity in *Cyanidium caldarium* by light, glucose, and phycobilin precursors. *The Journal of biological chemistry* **269**: 9620-9626.
- Ristau O. (2015a). Tiefer Ölpreis – und die Chemie stimmt. *VDI Nachrichten* **7**: 8.
- Ristau O. (2015b). Raps, Glück auf! *VDI Nachrichten* **37**: 16.
- Rochetta, I., Mazzuca, M., Conforti, V., Ruiz, L., Balzaretto, V. und Rios des Molina, M. (2006). Effect of chromium on the fatty acid composition of two strains of *Euglena gracilis*. *Environmental pollution* **141**: 353-358.
- Rodríguez-Zavala, J. S., Ortiz-Cruz, M. A., Mendoza-Hernández, G., 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., Posten, C. (2010). Die vielfältige Anwendung von Mikroalgen als nachwachsende Rohstoffe. *Chemie Ingenieur Technik* **82**: 1925-1939.
- Rosenberg, A. (1963). A comparison of lipid patterns in photosynthesizing and nonphotosynthesizing cells of *Euglena gracilis*. *Biochemistry* **2**: 1148-1154.
- Rosenberg, A., Pecker, M. (1964). Lipid Alterations in *Euglena gracilis* Cells During Light-induced Greening. *Biochemistry* **3**: 254-258.
- Rosenberg, A. (1967). *Euglena gracilis*: a novel lipid energy reserve and arachidonic acid enrichment during fasting. *Science* **157**: 1189-1191.
- Rösch H., (2010). Kraftwerk im Blattwerk. Die Zukunft der Energie. *Max Planck Forschung Spezial* **10**: 38-42.
- Ruggeri B. A., Gray R. J. H., Watkins T. R., Tomlins R. I. (1985). Effects of Low-Temperature Acclimation and Oxygen Stress on Tocopheron Production in *Euglena gracilis* Z. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 1404-1408.

- Ryll, J. (2009). Fermentative Gewinnung von Paramylon aus *Euglena gracilis* auf Nebenprodukten der Stärkeindustrie in einer Pilotanlage. Universität Hannover, Dissertation, 2005.
- Salim S., Bosma R., Vermue M., Wijffles R. (2011). Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *Journal of Applied Phycology* **23**: 849-855.
- Šantek, B., Felski, M., Friehs, K., Lotz, M., Flaschel, E. (2009). Production of α -tocopherol, 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., 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.
- Šantek, B., Friehs, K., Lotz, M., Flaschel, E. (2012). Production of paramylon, a β -1,3-glucan, by heterotrophic growth of *Euglena gracilis* on potato liquor in fed-batch and repeated-batch mode of cultivation. *Engineering in Life Sciences* **12**: 89-94.
- Santiago-Martínez, M. G., Lira-Silva, E., Encalada, R., Pineda, E., Gallardo-Pérez, J. C., Zepeda-Rodríguez, A., Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E., Jasso-Chávez, R. (2015). Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions. *Journal of Hazardous Materials* **288**: 104-112.
- Sastre R., Posten C. (2010). Die vielfältige Anwendung von Mikroalgen als nachwachsende Rohstoffe. *Chemie Ingenieur Technik* **82**: 1925-1939.
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussnug, J. H., Posten, C., Kruse, O., Hankammer, B. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenergy Research* **1**: 20-43.
- Scherder, C., Fehr, W., Welke, G., Wang, T. (2006). Tocopherol content and agronomic performance of soybeans lines with reduced palmitate. *Crop Science* **46**: 1286-1290.
- Schiermeier, Q. (2014). Water on tap. *Nature* **510**: 326-328.
- Schifrin, N. S., Chisholm, S. W. (1981). Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *Journal of Phycology* **17**: 374-384.
- Schuber F., Aleksijevic A., Blée, E. (1981). Comparative role of polyamines division and plastid differentiation of *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* **675**: 178-187.
- Schlagermann, P., Göttlicher, G., Dillschneider, R., Rosello Sastre, R., Posten, C. (2012). Composition of Algal Oil and Its Potential as Biofuel. *Journal of Combustion* **2012**: 1-14.
- Schmack, D., Schneider, G., Nusko, R. (2008). Effizienzsteigerung der Biogasnutzung durch Solarenergie: Schmack Biogas AG. Mediathek der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) oder unter der URL: <http://www.fnr-server.de/ftp/pdf/berichte/22017105.pdf> (zuletzt gesichtet 10.11.2015).

Schmidt, R. A., Wiebe, M. G., Eriksen, N. T. (2005). Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnology and bioengineering* **90**: 77-84.

Schnabel, G. (1968a). Der Einfluß von Licht auf die circadiane Rhythmik von *Euglena gracilis* bei Autotrophie und Mixotrophie. Dissertation. Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

Schnabel, G. (1968b). Der Einfluß von Licht auf die circadiane Rhythmik von *Euglena gracilis* bei Autotrophie und Mixotrophie. *Planta* **81**: 49-63.

Schönknecht, G., Chen, W.-H., Ternes, C. M., Barbier, G. G., Shrestha, R. P., Stanke, M., Bräutigam, A., Baker, B. J., Banfield, J. F., Garavito, R. M., Carr, K., Wilkerson, C., Rensing, S. A., Gagneul, D., Dickenson, N. E., Oesterhelt, C., Lercher, M. J., Weber, A. P. M. (2013). Gene Transfer from Bacteria and Archaea Facilitated Evolution of an Extremophilic Eukaryote. *Science* **339**: 1207-1210.

Schwartzbach, S. D., Schiff, J. A. and Goldstein, N. H. (1975). Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts V. Control of paramylum degradation. *Plant Physiology* **56**: 313-317.

Schwarzthans J.-P., Cholewa, D., Grimm, P., Beshay, U., Risse J.-M., Friehs, K., Flaschel, E. (2015). Dependency of the fatty acid composition of *Euglena gracilis* on growth phase and culture conditions. *Journal of Applied Phycology* **27**: 1389-1399.

Schwenker, U. (1971). Einfluß des Stoffwechsels auf die Pigmentzusammensetzung in alternierenden Kulturen von *Euglena gracilis*. *Planta* **101**: 101-116.

Shamlou, P. A., Breen, L. H., Bell, W. V., Pollo, M., und Thomas, B. A. (2007). A new scaleable freeze-thaw technology for bulk protein solutions. *Biotechnology and applied biochemistry* **46**: 13-26.

Sekar, S., Chandramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology* **20**: 113-136.

Sen, C. K., Khanna, S., Roy, S. (2007). Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family. *Mol Aspects Med* **28**: 692-728

Serbinova, E., Kagan, V., Han, D., Packer, L., (1991). Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radical Biology and Medicine* **10**: 263-275.

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P. (1998). A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program - biodiesel from algae. National Renewable Energy Laboratory.

Shen, H., Ren, Q. G., Mi, Y., Shi, X. F. Yao, H. Y., Jin, C. Z., Huang, Y. Y., He, W., Zhang, J., Liu, B. (2002). Investigation of metal ion accumulation in *Euglena gracilis* by fluorescence

methods. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **189**: 506-510.

Shibakami, M., Tsubouchi, G., Nakamura, M., Hayashi, M. (2013). Polysaccharide nanofiber made from euglenoid alga. *Carbohydr Polym* **93**: 499-505.

Shibakami, M., Tsubouchi, G., Hayashi, M. (2014). Thermoplasticization of euglenoid β -1,3-glucans by mixed esterification. *Carbohydrate polymers* **105**: 90-96.

Shibata K., Benson, A., Calvin M., (1954). The Absorptionspectra of suspensions of living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta* **15**: 461-470.

Shigeoka, S., Nakano, Y., Kitaoka, S. (1979). Metabolism of hydrogen peroxide in *Euglena gracilis* Z by L-ascorbic acid peroxidase. *Biochemical Journal* **186**: 377-380.

Shigeoka S., Onishi Y., Kitaoka S. (1986). The content and subcellular distribution of tocopherols in *Euglena gracilis*. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**: 1063-1065.

Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology advances* **27**: 409-416.

Siebertz, H. P., Heinz, E., Joyard, J., Douce, R. (1980). Labelling *in vivo* and *in vitro* of molecular species of lipids from chloroplast envelopes and thylakoids. *European journal of biochemistry / FEBS* **108**: 177-185.

Sijtsma, L., de Swaaf, M. E. (2004). Biotechnological production and applications of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Applied microbiology and biotechnology* **64**: 146-153.

Sim, T.-S. 1988. Comparison of centrifugation, dissolved air flotation and drum filtration techniques for harvesting sewage-grown algae. *Biomass* **16**: 51-62.

Simopoulos, A. P. (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American journal of clinical nutrition* **54**: 438-463.

Sinetova, M. P., Markelova, A. G., Los, D. A. (2006). The effect of nitrogen starvation on the ultrastructure and pigment composition of chloroplasts in the acidothermophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Russian Journal of Plant Physiology* **53**: 153-162.

Sirin, S., Trobajo R., Ibanez, C., Salvadó J. (2012). Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricorutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. *Journal of Applied Phycology* **24**: 1067-1080.

Sloth, J. K., Wiebe, M. G., Eriksen, N. T. (2006). Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme and Microbial Technology* **38**: 168-175.

Smedes, F. (1999). Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst* **124**: 1711-1718.

Sogin, M. L., Elwood, H. J., Gunderson J. H. (1985). Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **83**: 1383-1387.

Soll, J., Schultz, G. (1980). 2-methyl-6-phytylquinol and 2,3-dimethyl-5-phytylquinol as precursors of α -tocopherol synthesis in spinach chloroplasts. *Phytochemistry* **19**: 215-218.

Soley Institute (2016). Spirulina Normals. Zu finden unter der URL: <http://www.soley-bio.com/products/c-phycocyanin.html> (zuletzt gesichtet 20.01.2016) oder unter der URL: <http://www.algaecollection.com/phycocyanin.pdf>

Spolare, P., Joannis-Cassan, C., Isambert, A., (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **101**: 87 - 96.

Steiner, U. (2008). Biofuel's cost explosion necessitates adaption of process concepts European White Biotechnology Summit, 21-22.05.2008, Frankfurt, Germany.

Steiner, U. (2008) Biofuels' cost explosion necessitates adaptation of process concepts. Algae as alternative raw materials. Publiziert auf den Kongress European White Biotechnology Summit, 21-22 May 2008, Frankfurt, Germany.

Stephens, E., Ross, I. L., Mussgnug, J. H., Wagner, L. D., Borowitzka, M. A., Posten, C., Kruse, O. Hankamer, B. (2010). Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends in plant science* **15**: 554-564.

Sugiyama, A., Hata, S., Suzuki, K., Yoshida, E., Nakano, R., Mitra, S., Arashida, R., Asayama, Y., Yabuta, Y., Takeuchi T. (2010). Oral administration of paramylon, a beta-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.

Sukenik, A., Shelef, G., (1984). Algal autoflocculation - verification and proposed mechanism. *Biotechnology and Bioengineering* **26**: 142-147.

Sutherland, I. W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology* **16**: 41-46.

Tang, G., Suter, P., (2011). Vitamin A, Nutrition, and Health Values of Algae: *Spirulina*, *Chlorella*, and *Dunaliella*. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences* **1**: 111-118.

Tang, J. K-H., Xu, Y., Muhlmann G., Zare, F., Khin, Y., Tam, S. (2013). Temperature shift effect on the *Chlorobaculum tepidum* chlorosomes. *Photosynthesis Research* **115**: 23-41.

Tani, Y., Osuka, S. (1989). α -Tocopherol production by an analog-resistant strain of *Euglena gracilis* Z. *Agricultural and Biological Chemistry* **53**: 2313-2318.

- Tani, Y., Tsumura, H. (1989). Screening for tocopherol-producing microorganisms and α -tocopherol production by *Euglena gracilis* Z. *Agricultural and Biological Chemistry* **53**: 305-312.
- Takano, M., Sado, J. I., Ogawa, T., und Terui, G. (1973). Freezing und freeze-drying of *Spirulina platensis*. *Cryobiology* **10**: 440-444.
- Takeyama, H., Kanarmaru, A., Yoshino, Y., Kakuta, H., Kawamura, Y., 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.
- Taylor, G. (2008). Biofuels and the biorefinery concept. *Energy Policy* **36**: 4406-4409.
- Teerawanichpan, P., Qiu, X. (2010). Fatty acyl-CoA reductase and wax synthase from *Euglena gracilis* in the biosynthesis of medium-chain wax esters. *Lipids* **45**: 263-273.
- Terry, K. L. (1986). Photosynthesis in modulated light: quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. *Biotechnology and bioengineering* **28**: 988-995.
- Terry O. W., Leland N. E. (1970). Rhythmic settling induced by temperature cycles in continuously-stirred autotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Planta* **93**: 128-142.
- Tesar, V. (2013). New Fluidic-Oscillator Concept for Flow-Separation Control. *AIAA Journal* **51**: 397-405.
- Threlfall, D. R., Goodwin, T. W. (1967). Nature, Intracellular Distribution and Formation of Terpenoid Quinones in *Euglena gracilis*. *Biochemical Journal* **103**: 573-588.
- TMR - Transparency Market Research (2015). Yeast Extract and Beta Glucan. Market By Type (Yeast extract, Yeast beta glucan), By Application (Bakery and processed food, Dairy and functional foods products, Beverages, Pharmaceuticals)-Global Industry Analysis, Size, Share, Growth and Forecast 2015 - 2021. *Pressemitteilung vom 17.07.2015 mit frei verfügbaren Daten von Transparency Market Research, USA*. Auch erhältlich unter URL: <http://www.transparencymarketresearch.com/yeasts-products-market.html> (zuletzt gesichtet: 03.11.2015).
- Tredici, M. R., Carlozzi, P., Chini Zittelli, G., Materassi, R. (1991). A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresource Technology* **38**: 153-159.
- Tucci, S., Vacula, R., Krajcovic, J., Proksch, P., Martin, W. (2010). Variability of wax ester fermentation in natural and bleached *Euglena gracilis* strains in response to oxygen and the elongase Inhibitor Flufenacet. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **57**: 63-69.
- Umweltbundesamt (2004). Abschlussbericht für das Umweltbundesamt. INSTITUT FÜR SIEDLUNGSWASSERWIRTSCHAFT UND ABFALLTECHNIK der Universität Hannover. FKZ: 298 94 307/02. Untersuchungen zum Stand der Umsetzung des Integrierten Umweltschutzes in der Lebensmittelindustrie unter Zugrundelegung der EG-IVU-Richtlinie und Entwicklung von BVT-Merkblättern, Hannover.

Unger, E. C., Porter, T., Culp, W., Labell, R., Matsunaga, T. und Zutshi, R. (2004). Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. *Advanced drug delivery reviews* **56**: 1291-1314.

USDOE (2010). National Algal Biofuels Technology Roadmap. U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program.

Valentin, H. E., Qi, Q. (2005). Biotechnological production and application of vitamin E: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **68**: 436-444.

VDI 4630 (2006). Fermentation of Organic Materials. Characterisation of the Substrate, Sampling, Collection of Material Data, Fermentation Tests. Verein Deutscher Ingenieure, Beuth Verlag GmbH, Berlin.

Velasco, L., Fernandez-Martinez, J.M., Garcia-Ruiz, R., Dominguez, J. (2002): Genetic and environmental variation for tocopherol content and composition in sunflower commercial hybrids, *J. Agric. Sci.* **139**: 425-429.

Viola, R., Nyvall, P., Pedersén, M. (2001). The unique features of starch metabolism in red algae. *Proc. R. Soc. Lond. B* **268**: 1417-1422.

Vogel, K., Barber, A. (1968). Degradation of paramylon by *Euglena gracilis*. *The Journal of Protozoology* **15**: 657-662.

Vonshak, A. (1997). *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). Physiology, cell-biology and biotechnology. CRC Press, Taylor & Francis Group, Bristol.

Wahlund, T., Woese, C., Castenholz, R., Madigan, M. (1991). A thermophilic green sulfur bacterium from New Zealand hot springs, *Chlorobium tepidum* sp. nov. *Archives of microbiology* **156**: 81-90.

Wang, L., Pan, B., Sheng, J., Xu, J. und Hu, Q. (2007). Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chemistry* **105**: 36-41.

Ward, O. P., Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry* **40**: 3627-3652.

Warm, A., Naughton, A. B., Saikali, E. A. (2003). Process Development Implications of Biotin Production Scale-Up. *Organic Process Research & Development* **7**: 272-284.

Weber, A. P. M., Oesterhelt, C., Gross, W., Bräutigam, A., Imboden, L. A., Krassovskaya, I. Linka, N., Truchina, J., Schneidereit, J., Voll, H., Voll, L., Zimmermann, M., Jamai, A., Riekhof, W., Yu, B., Garavito, R., Benning, C. (2004). EST-analysis of the thermo-acidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts. *Plant Molecular Biology* **55**: 17-32.

Wen, Z., Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances* **21**: 273-294.

Wencker, T., (2013). Mikroalgen – neue Perspektiven für Landwirtschaft und Industrie. 20 Jahre für Nachwachsende Rohstoffe in Deutschland – 20 Jahre FNR. Mediahaus 2013, FNR e.V.

Wei, D., Zhang, L., Williams, D. L., Browder, I. W. (2002). Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis through a nuclear factor-1 dependent mechanism. *Wound Repair and Regeneration* **10**: 161-168.

Weiss, W., Hogan, J., Wyatt, D. (2009). Relative bioavailability of all-rac and RRR vitamin E based on neutrophil function and total α -tocopherol and isomer concentrations in periparturient dairy cows and their calves. *Journal of Dairy Science* **92**: 720-731.

Weissman, J. C., Göbel, R., Benemann, J. R. (1988). Photobioreactor Design: Mixing, Carbon Utilization, and Oxygen Accumulation. *Biotechnology and Bioengineering* **31**: 336-344.

Wilburn, E., Mahan, D., Hill, D., Shipp, T., Yang, H. (2008). An evaluation of natural (*RRR*- α -tocopheryl acetate) and synthetic (all-rac- α -tocopheryl acetate) vitamin E fortification in the diet or drinking water of weaning pigs. *Journal of Animal Science* **86**: 584-591.

Wijffels, R. H., Barbosa, M. J. (2010). An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science* **329**: 796-799.

Wismar, René, Brix, Susanne, Frøkiaer, Hanne, Laerke, Helle Nygaard (2010): Dietary fibers as immunoregulatory compounds in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1190**: 70-85.

Wood, L. A., Thompson, P. W. (1987). Applications of the Air Lift Fermenter. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **15**: 131-143.

Wolken, J. J. (1961). *Euglena*. An Experimental Organism for Biochemical and Biophysical Studies. Library of Congress Catalog Card Number: 61-10481. Quinn & Boden Company, Inc., New Jersey. S.105.

WWF Deutschland, Palmöl: Fluch oder Segen?, Berlin, März 2012, URL: http://http://www.wwf.de/fileadmin/fm-wwf/Publikationen-PDF/Dossier_Palmoel_WWF_Kurzfasung.pdf (Gesichert: 01.09.2014).

Xu, Z., Harvey, K., Pavlina, T., Dutot, G., Zaloga, G., Siddiqui, R. (2010). An improved method for determining medium- and long-chain FAMES using gas chromatography. *Lipids* **45**: 199-208.

Yamane, Y., Utsunomiya, T., Watanabe, M., Sasaki, K., (2001). Biomass production in mixotrophic culture of *Euglena gracilis* under acidic condition and its growth energetics. *Biotechnology Letters* **23**: 1223-1228.

Yamada, Y., Obayashi, M., Ishikawa, T., Kiso, Y., Ono, Y., Yamashita, K., (2008). Dietary tocotrienol reduces UVB-induced skin damage and sesamin enhances tocotrienol effects in hairless mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **54**: 117-123.

Yamamoto, Y., Fujisawa, A., Hara, A., Dunlap, W. (2001). An unusual vitamin E constituent (α -tocotrienol) provides enhanced antioxidant protection in marine organisms adapted to cold-water environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 13144-13148.

Yee, M., Bartholomew, J. (1988). Light regulation of the cell cycle in *Euglena gracilis* bacillaris. *Cytometry* **9**: 387-393.

Yokota A., Kitaoka, S. (1982). Synthesis, excretion, and metabolism of glycolate under highly photorespiratory conditions in *Euglena gracilis* Z. *Plant Physiology* **70**: 760-764.

Yongmanitchai, W., Ward, O. P. (1992). Growth and eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in batch and continuous culture systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **69**: 584-590.

Zempleni, J., Rucker, R., McCormick, D., Suttie, J. (2007). Handbook of Vitamins. 4. Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.

Zielinski, R. E., Price, C. A., Relative Requirements for Magnesium of Protein and Chlorophyll Synthesis in *Euglena gracilis*. *Plant Physiology* 1978 **61**: 624-625.

Zimba, P., Rowan, M., Triemer R., 2004. Identification of euglenoid algae that produce ichthyotoxin(s). *Journal of Fish Diseases* **27**: 115-117.

Zimba, P., Moeller, P., Beauchesne K., Lan H., 2010. Identification of euglenophycin – A toxin found in certain euglenoids. *Toxicon* **55**: 100-104.

7. Anhang

7.1 Instationäre kontinuierliche Kultivierung von *E. gracilis* im Flachplatten-airlift-Photobioreaktor

Der Flachplattenreaktor wurde mit zwei Edison EdiLine IV COB LED (je 6 W warmweiß und kaltweiß von Edison, New Taipei City, Taiwan) illuminiert, welche bei einem ausreichenden Abstand zur Reaktorwand einen relativ schwachen und leicht inhomogenen Lichtfluss von durchschnittlich $130 \mu\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}$ erzeugten. Trotz abschnittweiser Schwankungen der nur teilgeregelten Temperatur (nur Kühlung) und der Zulaufgeschwindigkeit (Zulaufmedium mit pH 3,0 – die Pumpgeschwindigkeit wurde beim Wechsel der Vorlagebehältnisse nicht nachgeregelt bzw. angepasst) wies der Prozess einen relativ stabilen pH von 2,5 und eine durchschnittliche Biotrockenmassekonzentration von etwa $0,5 \text{ g L}^{-1}$ in der Zulaufphase ab Tag 13 auf. Die Kultivierung von *E. gracilis* unter pH 2,5 hatte einen zusätzlichen positiven Effekt auf den Prozess. In dem sehr sauren Bereich war eine mögliche Kontamination auf acidotolerante Organismen beschränkt - ist jedoch selbst bei offenen Stutzen nicht eingetreten. Der Prozessverlauf ist in der folgenden Abbildung 7.1 dargestellt.

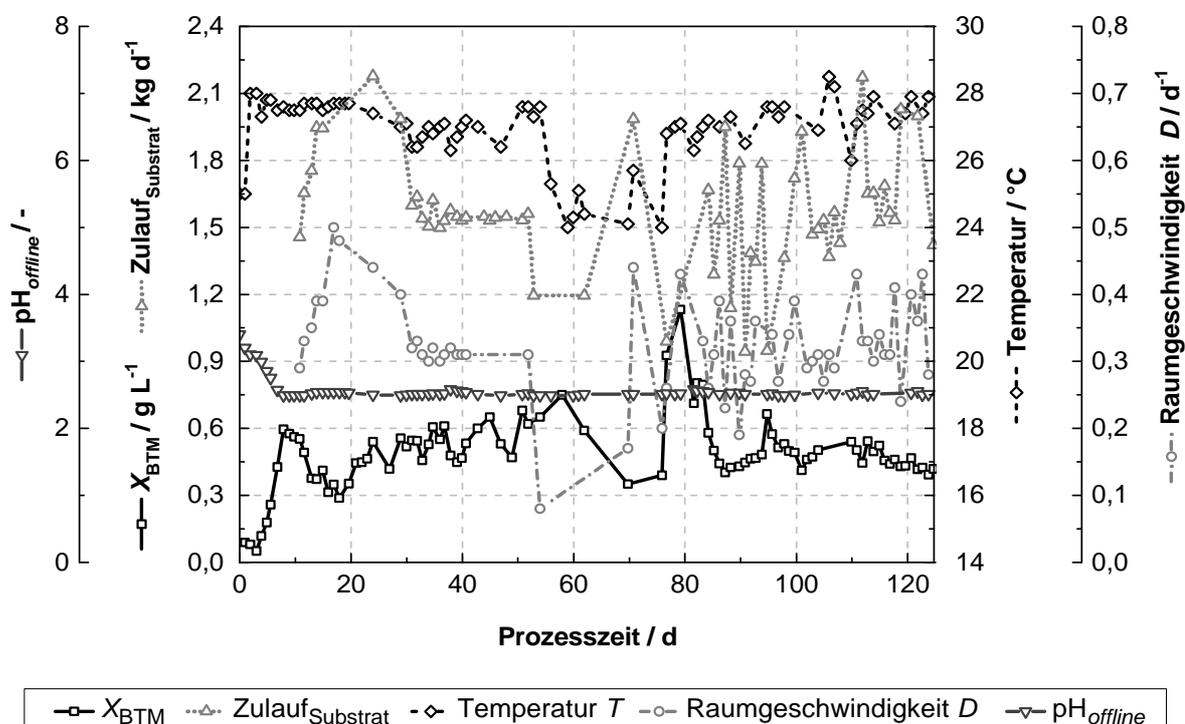


Abbildung 7.1: Verlauf einer instationären, kontinuierlichen, photoautotrophen Kultivierung von *E. gracilis*-Kulturen mit konstantem Volumen von 5 L EG5.1-Medium bei pH 3,0 und einem einseitigen Lichtfluss von $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Kulturschichtdicke: 5 cm. Der Gasvolumenstrom mit 5 % CO₂ und 95 % Luft lag bei 0,2 vvm.

7.2 Zusammensetzung der Rohglycerinqualitäten und des entsprechend modifizierten Ford-Mediums

Für die Zusammensetzung von identischen Medien mit verschiedenen Rohglycerinsorten wurden diese nach Herstellerangaben bewertet und durch die eigene Analyse weiter charakterisiert (siehe Abschnitt 3.7 Hach-Lange-Tests und 3.8 HPLC). Anhand dieser Ergebnisse wurden die folgenden in Tabelle 7.2 modifizierten Ford-Medien generiert. Die Spurenelemente wurden, wie in Tabelle 3 beschrieben, beibehalten. Die errechneten mengen orientieren sich an der Zugabe von 15 g L Rein- bzw. Rohglycerin.

Tabelle 7.2: Hauptbestandteile des Fordmediums und den modifizierten Varianten, welche an die Zusammensetzungen der Rohglycerinsorten angepasst wurden, um in allen Medienvariationen ähnliche Stoffzusammensetzungen zu ergatten. Weitere Bestandteile siehe Tabelle 3.

	Original	Cargill/ Verbio	Sepura ¹
Substanz	Konzentration / g L ⁻¹		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,50	1,50	1,50
MgSO ₄ × 7	0,30	0,30	0,30
K ₂ HPO ₄	0,30	0,30	-
CaCl × 2	0,02	0,02	0,02
NaCl	0,02	-	-

¹ Es wurden 0,35 mL L⁻¹ H₂SO₂ 85 % (w/w) zugegeben, um den pH-Wert und die Schwefelkonzentration anzugleichen.

Das Rohglycerin von Verbio (VERBIO Diesel Schwedt GmbH & Co. KG, Schwedt/Oder, BRD) beinhaltet 5 % Asche, welches im Wesentlichen aus Natriumchlorid besteht. Außerdem befinden sich im Rohglycerin freie Fettsäuren und natürliche Fettsäuremuster, die durch die Verarbeitung von Raps verbleiben. Ein Anschreiben der Firma VERBIO Diesel Schwedt GmbH & Co. KG lieferte folgende Informationen (Auszug):



Purchase Specification

Crude Glycerin

Technical Characteristics:

Parameter	Parameter info	Test method	Min.	Max.	Units
Glycerin		Ph.Eur. 8.0/0496 BS 5711-3	80		%
Water		DIN 51777		15	%
Ash		ISO 3987 DGF E-III 4 (55)		8	%
MONG		DGF E-III 9a (84)		2,5	%
Flashpoint		EN ISO 2719 EN ISO 3679	80		°C
Methanol concentration		According to EN 14110		0,2	%
Appearance	fluid, free from solid				

Additional Requirements:

Parameter	Parameter info	Test method	Min.	Max.	Units
Source	pure vegetable, kosher, non-GMO				
Content of NaCl in Ash			80		%

To be transported only in containers suitable for the transport of food stuff.

Compliance with Food Legislation:

The product must be in compliance with current relevant EU Food laws and Directives, including contaminants regulations and the recommendations made by EU Food laws. Packaging and transport must be conforming to the EU Food Regulations and Directives.

Date: 17.06.2014

Version: 1.0/2014/EN

Y. Schurig

quality management representative

Die Informationen zum Rohglycerin von Cargill (Cargill Incorporated, Wayzata, USA) ist im Folgenden dargestellt:

Crude Glycerin

September 6, 2007



3 COMPOSITION / INFORMATION ON INGREDIENTS

Chemical Name	CAS- No.	Concentration
Glycerin	56-81-5	> 80 %
Water	7732-18-5	< 15 %
Sodium chloride	7647-14-5	< 5 %
Methanol	67-56-1	< 1 %

*Components not listed are nonhazardous or below reportable limits.

4 FIRST AID MEASURES

Inhalation: Move to fresh air. Treat symptomatically. Get medical attention if symptoms persist.

Eye Contact: In case of contact, immediately flush eyes with plenty of water for at least 15 minutes. If easy to do, remove contact lenses, if worn. Get medical attention if symptoms persist.

Skin Contact: Wash with soap and water. Get medical attention if symptoms occur.

Ingestion: Seek medical advice.

5 FIRE-FIGHTING MEASURES

Extinguishing Media: Alcohol foam, dry chemical, carbon dioxide, water fog or material appropriate for surrounding fire.

Unsuitable Extinguishing Media: Water or foam may cause frothing.

Special Fire Fighting Procedures: Wear self-contained breathing apparatus and protective clothing.

Unusual Fire & Explosion Hazards: None known

Hazardous Combustion Products: Carbon oxides, sodium oxides

6 ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

Personal Precautions: Wear appropriate personal protective equipment (see Section 8).

Spill Cleanup Methods: Small Liquid Spills: Use a non-combustible material like vermiculite, sand or earth to soak up the product and place into a container for later disposal. Surfaces may become slippery when wet.

Large Spillages: Flush spill area with water spray. Prevent runoff from entering drains, sewers or streams. Dike for later disposal.

7 HANDLING AND STORAGE

2/7

Zum Produkt Rohglycerin von Sepura (sePura GmbH, Würzburg, BRD) lagen folgende Informationen vor (relativer Auszug wurde nur dargestellt). Für alle in der Arbeit durchgeführten Versuche wurde die methanolhaltige Sorte verwendet, bei der rund 69 % (w/w) Glycerin mittels HLPC ermittelt wurden. Wurde das Rohglycerin vor dem Einsatz dampfsterilisiert, sank der Methanolanteil auf 6 bis 8 % (w/w).



Produktinformation

Zum Einsatz in Biogasanlagen kommen üblicherweise Rohglycerine, die als Nebenprodukt der Biodieselherstellung erzeugt werden. Diese enthalten neben Glycerin Wasser und Salze, teilweise jedoch auch Fettsäuren und Methanol. Bedingt durch diese Komponenten weichen die tatsächlichen Energiegehalte und der Substratanfall von den Daten reinen Glycerins ab. Prinzipiell sind alle Rohglycerine in Biogasanlagen verwertbar, jedoch sollte nicht zwischen unterschiedlichen Qualitäten gewechselt werden. Genehmigungsrechtlich kann es insbesondere bei Verwendung von methanolhaltigem Rohglycerin besondere Anforderungen geben, da mit steigendem Methanolgehalt der Flammpunktes von ca. +180 °C auf bis zu +12 °C sinkt und dann verschärfte Anforderungen an die Lagerung zu berücksichtigen sind. Auch ist Methanol als gefährlicher Arbeitsstoff eingestuft. Mischungen mit mehr als 3 % Methanol sind als giftig im Sinne des Chemikaliengesetzes zu kennzeichnen, der Umgang hiermit ist nur unterwiesenen Personen gestattet, es gelten Umgangsbeschränkungen z.B. für Jugendliche (Ausbildungsbetriebe).

Typische Gehalte eines methanolfreien Rohglycerins sind 90 % Glycerin, 3 % Kaliumsulfat und 7 % Wasser. Das Kaliumsulfat wird in der Anlage nicht verwertet, wasserlösliches Kalium und Schwefel erhöhen den Anteil der beiden düngewirksamen Verbindungen im Gärrückstand. Durch den geringen Glyceringehalt sinken natürlich die Gas- und somit auch die Energieausbeute, die bei einem Verstromungs-Wirkungsgrad von 32 % mit 1240 kWh/t zu Veranschlagen ist. Der Verstromungserlös liegt demnach bei 142,80 €/t bei 11,5 Ct/kWh Vergütung bzw. bei 123,00 €/t bei 9,9 Ct/kWh. Die Substratanfallmenge steigt auf ca. 170 kg/t, 15 kg wasserlösliches Kaliumoxid und 5 kg wasserlöslicher Schwefel, entsprechend einem Düngewert von rund 5 €/t können positiv angerechnet werden.

Beispielhafte für ein methanolhaltiges Glycerin sind folgende Inhaltsstoffe: 60 % Glycerin, 10 % Methanol, 20 % Fettsäuren, 3 % Kalium, 7 % Wasser. Aufgrund des Anteiles an Methanol und Fettsäuren ist der Energiegehalt höher und beträgt hier 18.600 kJ/t. Zugleich steigt der Methangehalt im Gas auf 65 % an. Die Substratmenge geht gegenüber reinem Glycerin auf 40 l Wasser/t zurück, lediglich das Kalium ist auf die Substratmenge aufzuschlagen, kann jedoch als Düngewert veranschlagt werden. Bei 32 % Wirkungsgrad ist eine Stromausbeute von 1.650 kWh/t zu erwarten, was einem Stromerlös von 190 €/t bei 11,5 Ct/kWh bzw. von 163 €/t bei 9,9 Ct/kWh entspricht.

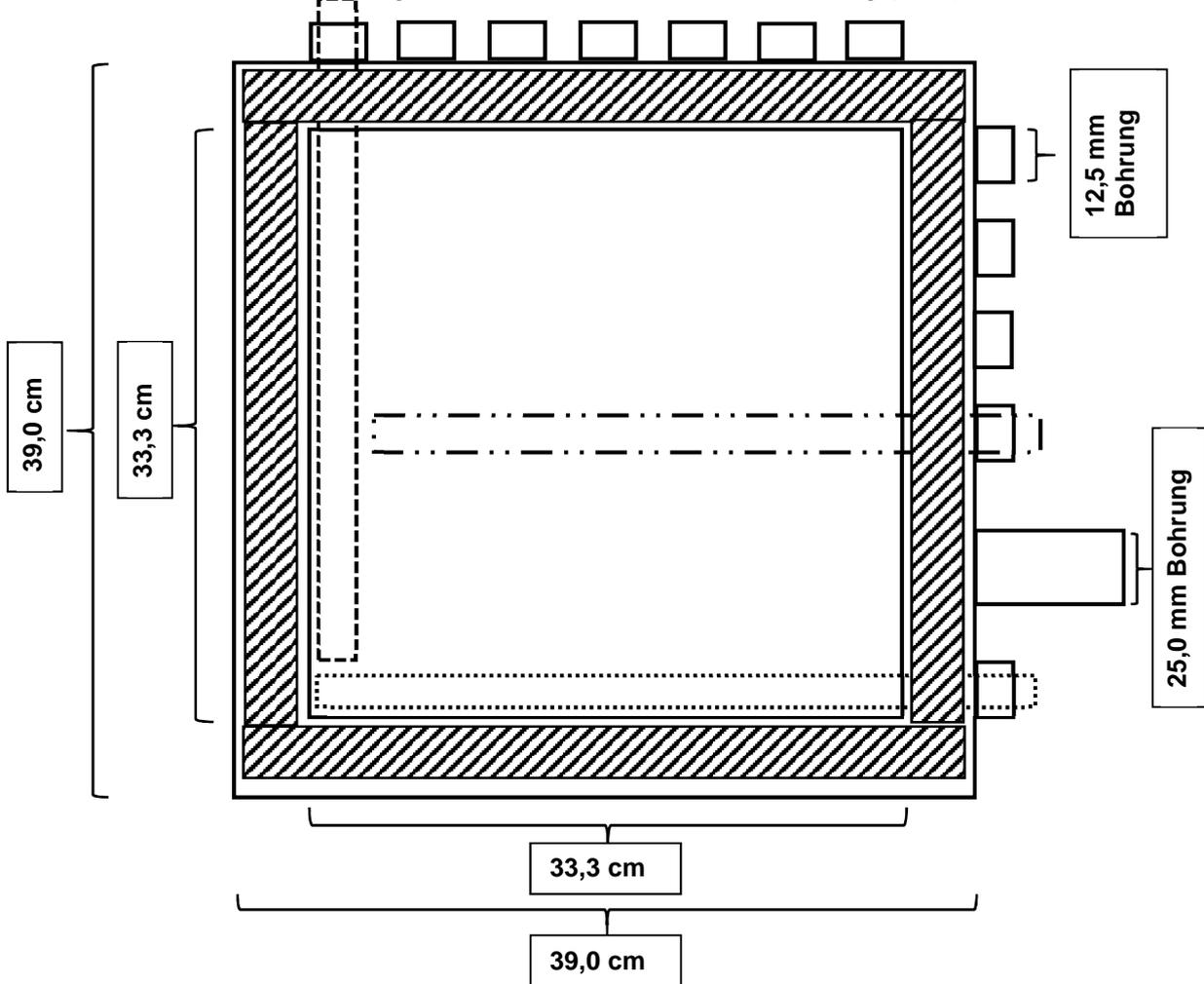
Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit Glycerinen:

Rohglycerine weisen oftmals einen hohen pH-Wert auf. Gerade bei hoher Dosierung in Anlagen mit schlechten Pufferkapazitäten kann sich der Anteil an freiem, für die Methanbakterien toxischem Ammoniak erhöhen und so zu Leistungsabfällen führen. Eine zu diesem Zeitpunkt verstärkte Glycerinzugabe verstärkt dieses Problem. Zudem befinden sich dann hohe Energiedichten im Substrat, die die Bakterien zusätzlich beeinträchtigen. Die Anlage kann bei

7.3 Abmessungen konstruierter Geräte

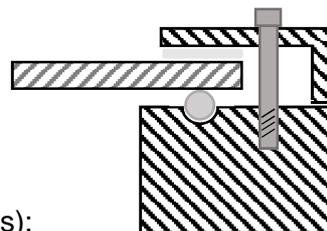
7.3.1 Flachplatten-airlift-Photobioreaktor

Ein Stutzen mit 25 mm Bohrung, sonst alle Stutzen 12,5mm Bohrung (M20). Seitenansicht:

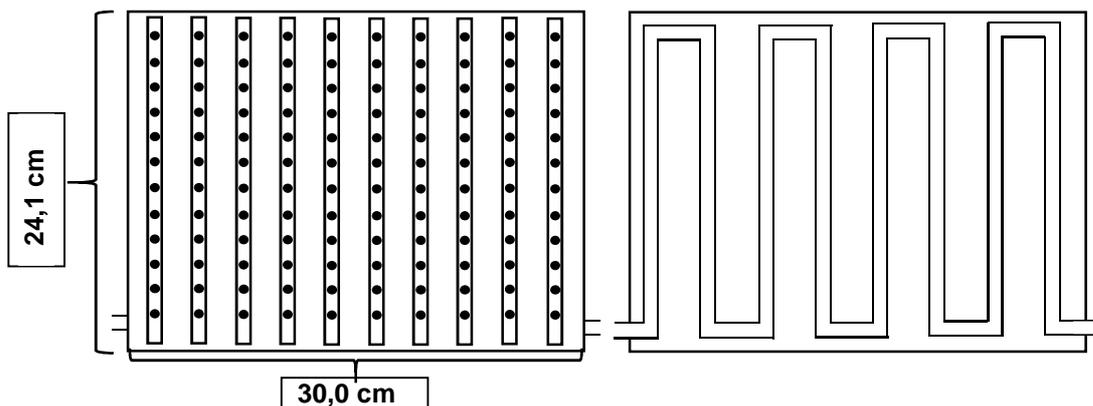


Rechts: Detailzeichnung der Glaseinfassung:

Das Glas (grau schraffiert) ist von beiden Seiten mit 3 mm Gummidichtungen versehen



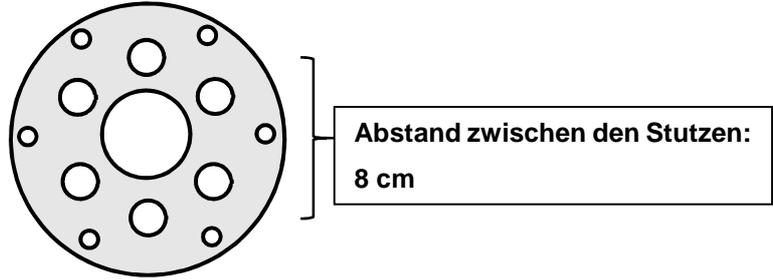
Illuminationseinheit (links) mit innerer Kühleinschlag (rechts):



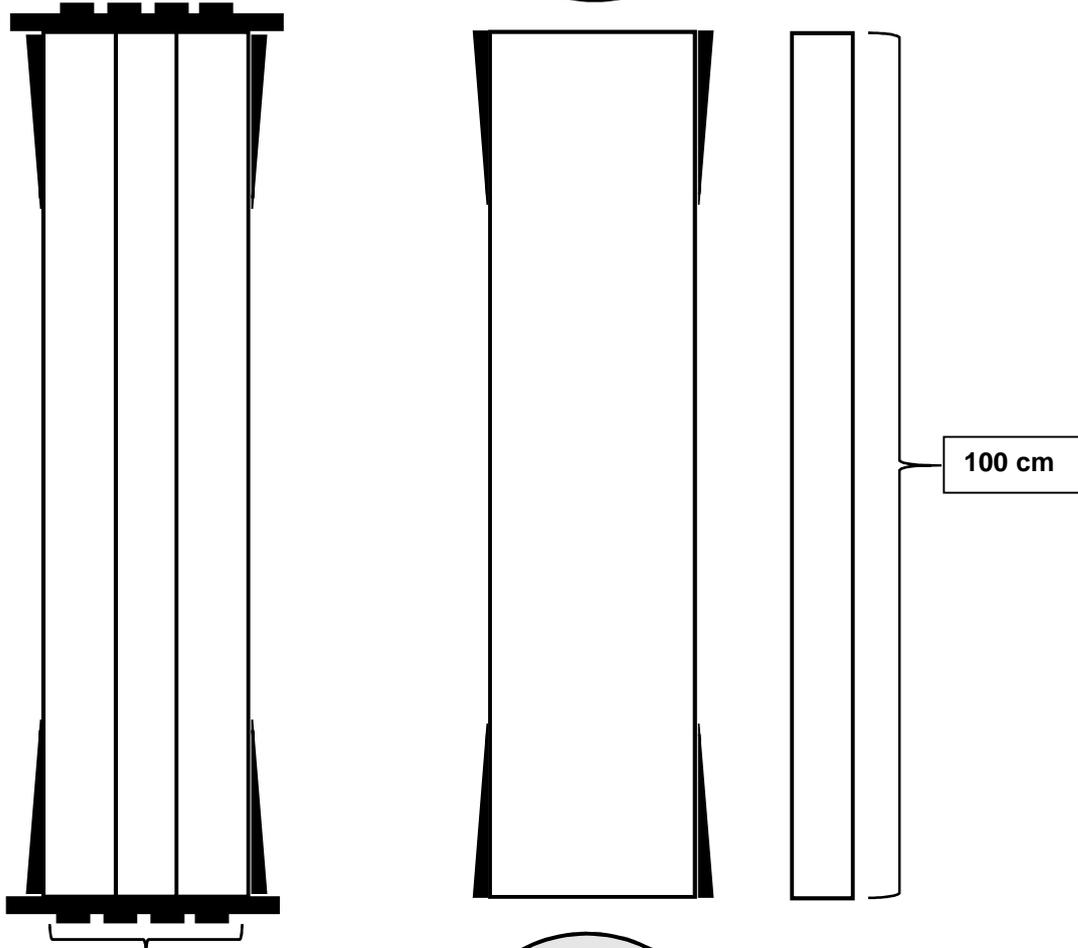
7.3.2 Intern illuminierter Blasensäulenreaktor

(Alle Stützen M20 mit 12,5 mm Bohrungen)

Seitenansicht montiert (links)
und in Einzelteilen (rechts) mit
Aufsicht vom Deckel (2x für das
Boden- und Kopfende)



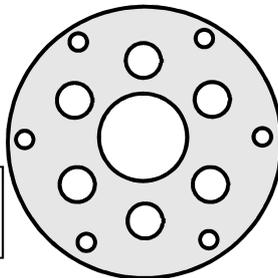
Abstand zwischen den Stützen:
8 cm



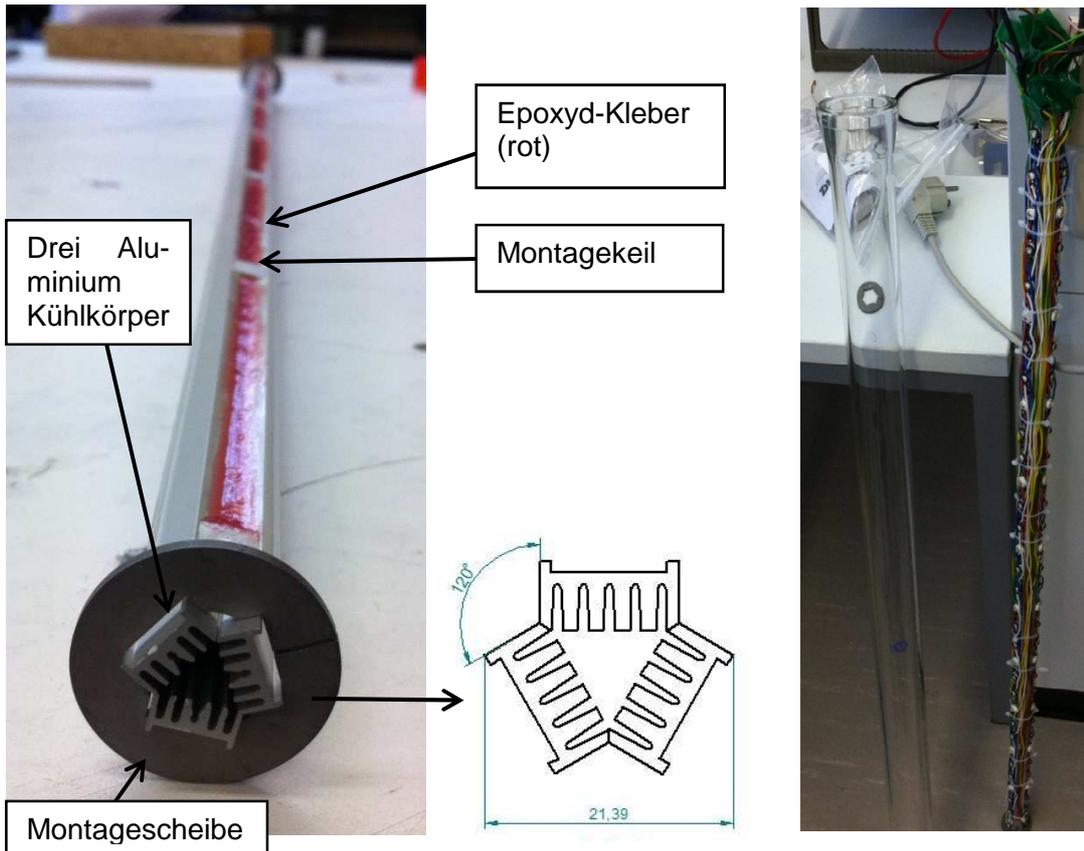
100 cm

Außenrohr QVF PS 100/1000
ID: 10,0 cm, AD: 11,8 cm

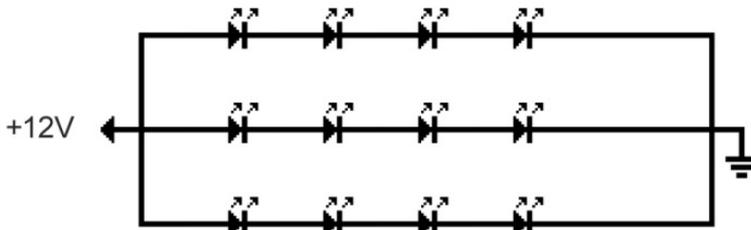
Innenrohr: QVF PS 40/1000
ID: 4,0 cm, AD: 4,8 cm



Die LED wurden auf Kühlleisten geklebt, welche zu einem dreieckigen Gerüst zusammengesetzt wurden. Hierzu waren Montagekeile behilflich.



Elektrische Schaltung der blauen und weißen LED:



Elektrische Schaltung der roten LED

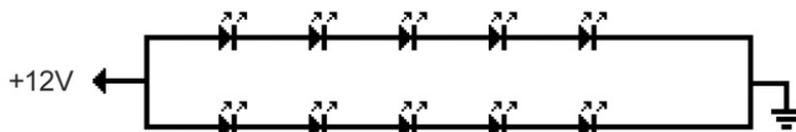


Tabelle 7.3.2: Verwendete LED – je 32 Stück

Typ	Hersteller	Abstrahlwinkel	Spannung	Strom	Leistung	Wellenlänge
Z-B4218-0	Seoul Semicon	130 °	3,25 V	350	1-3,5 W	465 (Max.)
Z-S4218-0/D	Seoul Semicon	124 °	3,25 V	350	1-3,0 W	-
EDEE-1LS4	Edison	120 °	2,2 V	350	1 W	660 (Max.)

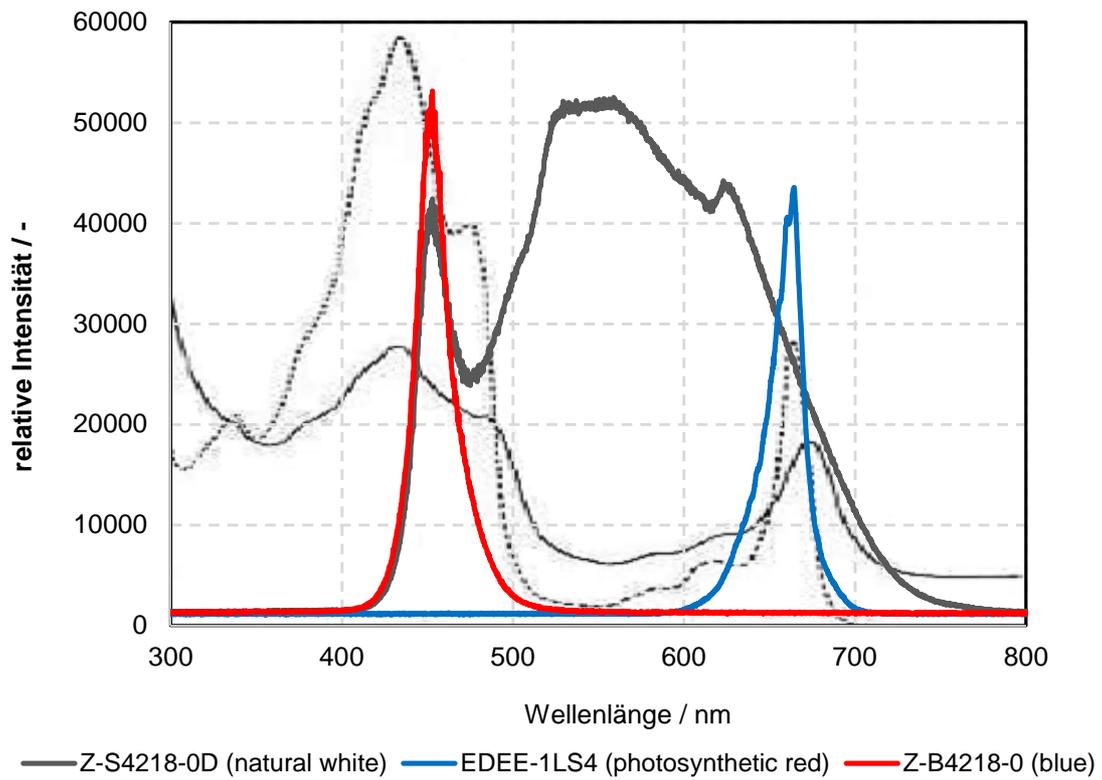


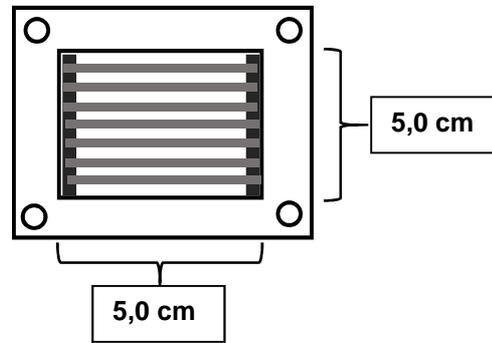
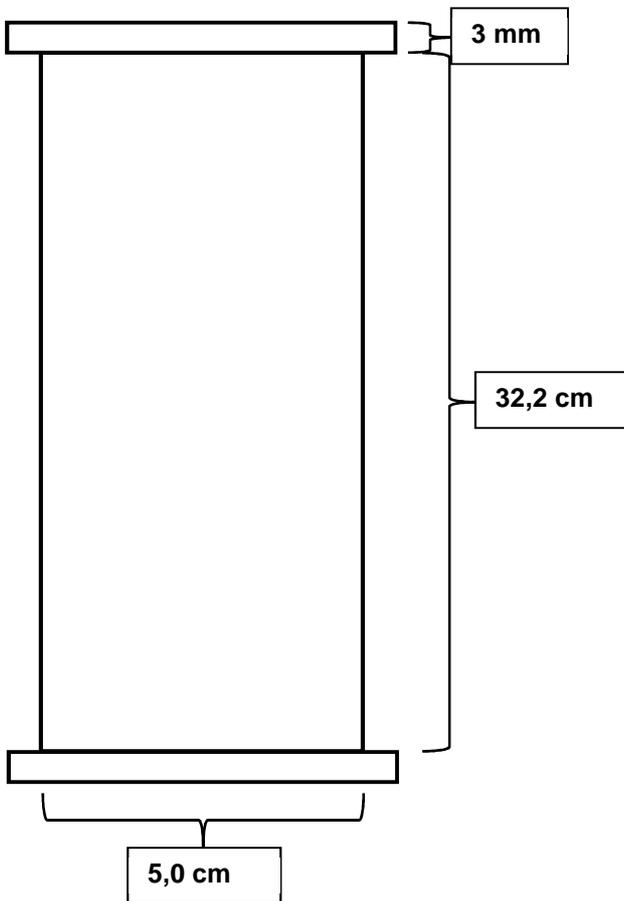
Abbildung 7.3.2: Verwendete LED, weitere Details siehe Tabelle 7.3.2. Im Hintergrund ist das Absorptionsspektrum von *E. gracilis* aus Shibata et al. [1954] dargestellt: durchgezogene schwarze Linie: Zell-extrakt, gestrichelte schwarze Linie Extrakt in Ethanol.

7.3.3 Zellabsetzer

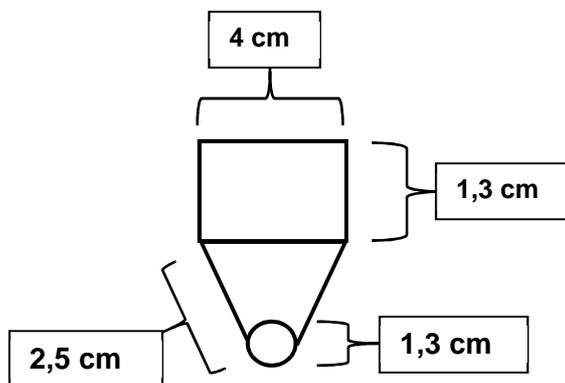
Alle Metallteile und Böden wurden elektropliert:

Sedimentationskanal von oben:

Im Querschnitt mit sieben Böden:



Kopf Zulauf/Ernte von unten:



Seitenansicht mit den Fließrichtungen:

