

Mikroalgenkultivierungen und die Überwachung des Kultivierungsprozesses mittels Durchflussmikroskopie

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von
Dipl. Chem. Mehmet Ünal
geb. 07.06.1981 in Kozakli (Türkei)

2013

Referent : Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent : PD Dr. Ulrich Krings

Tag der Promotion : 11.10.2013

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen durchgeführt habe. Diese Arbeit wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 11.10. 2013 _____

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2009 bis August 2013 am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ich möchte mich bei ihm herzlich für die freundliche Unterstützung, das stets angenehme Arbeitsklima und die gebotenen Möglichkeiten bedanken.

Herrn PD Dr. Ulrich Krings danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Frau Prof. Dr. Ursula Rinas möchte ich mich für die Bereitschaft, meine Prüfung abzunehmen, bedanken.

Ich bedanke mich bei der Sartorius AG für die Finanzierung und bei Herrn Dr. Richers für die Leitung des Projekts „Entwicklung eines innovativen in-situ Mikroskops zum Monitoring von Mikroalgenkultivierungen (Mikroalgen ISM); Entwicklung, Testung und Optimierung eines Laborfunktionsmusters“. Zudem danke ich den Mitgliedern der Forschergruppe für die gute Zusammenarbeit.

Mein spezieller Dank gilt:

Dr. Sascha Beutel für die Betreuung, das Korrekturlesen dieser Arbeit, der Berichte und Poster.

Daniela Mau und Christian Ude für die Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Bachelor- und Schwerpunktarbeit. Mike Schwalenberg danke ich für seine Hilfe während seines Freiwilligen Wissenschaftlichen Jahres.

Dr. Ivo Havlik, Dr. Stefanie Wagner, Dr. Öznur Kökpınar, Dr. Ismet Bice und Nabila Bice für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. Patrick Lindner für die Programme in-situ Control und in-situ Analysis.

Martina Weiß und Martin Pähler, ohne die der Institutsalltag niemals so unkompliziert und problemlos abgelaufen wäre.

Allen Mitarbeitern des TCI für die freundliche Arbeitsatmosphäre, insbesondere dem Technikumsteam.

Den Mitarbeitern der Mechanik- und Elektronikwerkstatt, insbesondere Thorsten Stempel für die vielen kleinen Hilfen bei dem Ausgleichgefäß.

Schließlich gilt ein großer Dank meinen Onkeln und Tanten, die mich während meines Studiums tatkräftig unterstützt haben.

Meinen Eltern Ahmet und Meryem Ünal danke ich herzlich für ihre Liebe und ihren Rückhalt. Bei meinem Bruder Erdinc Ünal, der mich zu jeder Zeit bei jeder Gelegenheit unterstützt hat, bedanke ich mich auch ganz herzlich. Ohne euch wären mein Studium und das Anfertigen dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Und ein ganz besonderer Dank geht an meine Frau Yasemin Ünal, die im letzten Teil meiner Arbeit mich weiter motiviert hat und immer zu mir steht.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung.....	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1. Mikroalgen	3
2.1.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4
2.1.2. <i>Chlorella vulgaris</i>	6
2.1.3. <i>Haematococcus pluvialis</i>	7
2.1.4. <i>Nannochloropsis oculata</i>	10
2.1.5. <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	11
2.1.6. <i>Spirulina platensis</i>	12
2.2. Messtechniken.....	14
2.2.1. Klassifizierung der Prozessanalytik.....	14
2.2.1.1. Offline Analytik.....	15
2.2.1.2. Atline Analytik	16
2.2.1.3. Online Analytik	16
2.2.1.4. Inline Analytik.....	17
2.3. Durchflussmikroskop	17
2.4. Photobioreaktoren	21
2.4.1. Allgemeines	21
2.4.2. Arten von Photobioreaktoren	24
2.4.2.1. Tubuläre Photobioreaktoren	24
2.4.2.2. Vertikale Säulen-Photobioreaktoren.....	25
2.4.2.3. Flache Photobioreaktoren.....	26
3. Ergebnisse und Diskussion	28
3.1. Entwicklung und Charakterisierung des Photobioreaktors.....	28
3.1.1. Bestimmung der Durchmischung im Photobioreaktor	32
3.1.2. Bestimmung der Verweilzeit im Photobioreaktor	35
3.1.3. Erstellung der Temperaturprofile im Photobioreaktor	39
3.1.4. Messung der Lichtintensitäten im Photobioreaktor.....	42
3.1.5. $K_L a$ -Wert-Bestimmung im Photobioreaktor.....	44

3.1.6. Fazit	47
3.2. Kultivierung von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	49
3.2.1. Kultivierungen im Schüttelkolben.....	50
3.2.1.1. Standard-Kultivierungen	50
3.2.1.2. Kultivierungen mit Begasung.....	52
3.2.1.3. Kultivierungen mit Glucose.....	56
3.2.1.4. Fazit	59
3.2.2. Kultivierungen im Photobioreaktor	60
3.2.2.1. Überwachung der Kultivierungen mit Hilfe des Durchflussmikroskops	61
3.3. Kultivierungen von <i>Chlorella vulgaris</i>	65
3.3.1. Kultivierungen im Schüttelkolben.....	65
3.3.1.1. Standard-Kultivierungen	65
3.3.1.2. Kultivierungen mit Begasung.....	67
3.3.1.3. Kultivierungen mit Glucose.....	70
3.3.1.4. Fazit	74
3.3.2. Kultivierungen im Photobioreaktor	76
3.3.2.1. Überwachung der Kultivierungen mit dem Durchflussmikroskop	76
3.4. Kultivierung von <i>Haematococcus pluvialis</i>.....	79
3.4.1. Kultivierungen im Schüttelkolben.....	79
3.4.1.1. Fazit	83
3.4.2. Kultivierungen im Photobioreaktor	85
3.5. Kultivierung von <i>Nannochloropsis oculata</i>	89
3.5.1. Kultivierungen im Schüttelkolben.....	89
3.5.1.1. Standard-Kultivierungen	90
3.5.1.2. Kultivierungen mit Begasung.....	91
3.5.1.3. Kultivierungen mit Glucose.....	94
3.5.1.4. Fazit	98
3.5.2. Kultivierungen im Photobioreaktor	99
3.6. Kultivierung von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	101
3.6.1. Kultivierungen im Schüttelkolben.....	101
3.6.1.1. Standard-Kultivierungen	101
3.6.1.2. Kultivierungen mit Begasung.....	103
3.6.1.3. Kultivierungen mit Glucose.....	106

3.6.1.4. Fazit	110
3.6.2. Kultivierungen im Photobioreaktor	111
3.7. Kultivierung von <i>Spirulina platensis</i>	112
3.7.1. Kultivierungen im Schüttelkolben.....	112
3.7.1.1. Standard-Kultivierungen	112
3.7.1.2. Kultivierungen mit Begasung.....	115
3.7.1.3. Kultivierungen mit Glucose.....	118
3.7.1.4. Fazit	121
3.7.2. Kultivierungen im Photobioreaktor	123
4. Zusammenfassung und Ausblick	125
4.1. Zusammenfassung	125
4.2. Ausblick	130
5. Anhang.....	132
5.1. Material und Methoden	132
5.1.1. Mikrobiologische Techniken.....	132
5.1.1.1. Stammhaltung.....	132
5.1.1.2. Kultivierung von Mikroalgenstämmen in Schüttelkolben.....	132
5.1.1.3. Die Kultivierungsbedingungen der verwendeten Mikroalgenstämme	133
5.1.2. Medien	133
5.1.2.1. TAP-Medium (Tris-Acetate-Phosphate)	133
5.1.2.2. Spirulina-Medium.....	135
5.1.2.3. MiEB12-Medium (Micrasterias + Erddekot + Vitamin B12)	137
5.1.2.4. F/2 -Medium	138
5.1.3. Kultivierungssystem	139
5.1.3.1. Photobioreaktor	139
5.1.4. Online Messmethoden	139
5.1.5. Offline Messmethoden	139
5.1.5.1. Optische Dichte	139
5.1.5.2. Glucose-Konzentration.....	139
5.1.5.3. Chlorophyll-Konzentration.....	140
5.1.5.4. Zellzahl	140

5.1.5.5. Ermittlung des pH-Wertes	141
5.1.5.6. Kalibration der Pumpe.....	141
5.1.6. Die in der Arbeit verwendeten Programme.....	142
5.1.6.1. In-situ Control	143
5.1.6.2. In-situ Analysis.....	145
5.1.7. Die Zellbilder von den verwendeten Mikroalgenstämmen	146
5.1.8. Die Abbildungen der Prozessanalytik-Anordnungen	147
5.2. Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	149
5.3. Verwendeten Chemikalien.....	152
6. Literatur	154
7. Lebenslauf	162
8. Übernahme fremder Leistungen.....	164

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Ac	Acetat
AXT	Astaxanthin
BTM	Biotrockenmasse
CAR	Carotenoide
c	Konzentration
$c_{\text{sättigung}}$	Sättigungskonzentration
C-Quelle	Kohlenstoff-Quelle
cd	Candela
CSTR	continuous flow stirred tank reactor
d	Durchmesser
DYCC	Double Yeast Cell Counter
et. al.	und andere
EZM	Extrazelluläre Matrix
FPA	flat panel airlift
g	Gramm
h	Stunde
ISM	in-situ Mikroskop
K_{La}	spezifischer Sauerstoffübergangskoeffizient
L	Liter
LED	Light Emitting Diode
mL	Milliliter
min	Minute
nm	Nanometer
N-Quelle	Stickstoffquelle
OTR	Sauerstofftransferrate
PFR	plug flow reactor
p_{O_2}	Sauerstoffpartialdruck
q_{O_2}	spezifische Sauerstoffaufnahme
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur

s	Sekunde
STR	stirred tank reactor
T	Tonne
t	Zeit
V	Volumen
v/v	Volumen zu Volumen
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
WR	Wachstumsrate
μm	Mikrometer
μs	Mikrosekunde
μL	Mikroliter
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ε	molarer Absorptionskoeffizient
λ	Wellenlänge
2D	zweidimensional

Zusammenfassung

Mikroalgen sind sehr vielfältig und können auch als Bioenergiequelle eine wichtige Rolle spielen. Sie können schließlich unter Einwirkung von Sonnenlicht klimaschädliches CO₂ binden und in Biomasse umwandeln. Diese Biomasse kann zur Energieerzeugung (z.B. Wärme, Bio-Erdgas oder Biodiesel), als Nahrungsmittelzusatz sowie in der Kosmetik- und Farbindustrie vielseitig genutzt werden. Aufgrund des wesentlich schnelleren Wachstums von Algen im Vergleich zu Landpflanzen setzen sie in kürzerer Zeit größere Mengen CO₂ um.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Kultivierung sowie die Überwachung des Kultivierungsprozesses von Mikroalgen mittels eines Durchflussmikroskops. Die Kultivierungen erfolgten sowohl im Schüttelkolben als auch im Photobioreaktor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst ein für Mikroalgenkultivierungen geeigneter Photobioreaktor aus Glas entwickelt und charakterisiert. Vor der Kultivierung der Mikroalgen wurden die Methoden für die Befüllung, Begasung und Beleuchtung des Reaktors sowie Methoden der Probeentnahme entwickelt und optimiert. Im selbstentwickelten Photobioreaktor wurden verschiedene Mikroalgenkultivierungen durchgeführt. Für die Überwachung des Kultivierungsprozesses stellen die Zellgröße, die Zellmorphologie und die Zellzahl wichtige Parameter dar. Eine Methode zur Messung dieser Parameter online und ohne Zeitverzögerung, stellt das Durchflussmikroskop dar. Durch die Auswertung der online-Bilder, welche direkt im Photobioreaktor aufgenommen wurden, werden mit Hilfe eines Bildauswertungsprogramms die Zellzahl und weitere Zellparameter wie Zellgröße, Zellmorphologie ermittelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Adaption des in-situ Mikroskops und des Durchflussmikroskops an die Überwachung von Mikroalgenkultivierungen durchgeführt. Das am Institut für Technische Chemie entwickelte Mess- und Auswertungssystem wurde erstmalig bei der Kultivierung des Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii* zur Überwachung und Auswertung eingesetzt. Hierbei korrelierten die online ermittelten Zellzahlen gut mit den mittels Neubauerkammer manuell bestimmten Zellzahlen. Nach erfolgreicher Durchführung wurde das gesamte Photobioreaktorsystem inklusive Durchflussmikroskop für andere Mikroalgenstämme etabliert.

Stichworte : Mikroalgen, Biomasse, Photobioreaktoren, Durchflussmikroskop

Abstract

Microalgae are very versatile and can also play an important role in energy production. They can employ sunlight for fixing atmospheric CO₂ and converting it to energy rich biomass which can further serve as raw material for many purposes: in the energy industry for heating or production of biofuels as biodiesel and biogas, in the food industry as a food supplement, and in the chemical industry in cosmetic products and for pigment and colorant production. Under optimal conditions, microalgae can grow faster than food crops and so can fix more CO₂ and produce more energy content in their biomass in the same time period.

This thesis deals with cultivation of microalgae accompanied by monitoring of the microalgal cultivation using a flow-through microscope. Cultivations were carried out both in shake flasks and in a photobioreactor. For the purpose of this thesis, a glass photobioreactor suitable for microalgal cultivations has been developed and characterized. Preceding cultivations of microalgae, methods were developed for filling, aeration and illumination of the reactor as well as sampling. The photobioreactor has been tested using several cultivation runs with different microalgal types.

Cell size, cell morphology and cell count are important parameters for the monitoring of a cultivation process. The flow-through microscopy provides a means to measure these parameters on-line, in real time and without time delay. Cell count and other parameters are determined using an image processing software which processes images recorded on-line directly in the photobioreactor. In this thesis, the existing in-situ Microscope and the Flow-Through-Microscope has been adapted for the monitoring of microalgal cultivations. The measuring and processing system developed in the Institute of Technical Chemistry was at first employed in the monitoring and analysis of the cultivation of the model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. The cell count determined on-line correlated well with cell counts determined manually using the Neubauer haemocytometer. Subsequently, after this first successful test, the photobioreactor system and the flow-through microscope were adapted also for other microalgal strains.

Keywords: Microalgae, biomass, photobioreactor, flow-through microscope

1. Einleitung und Zielsetzung

Die Knappheit der Energie erfordert die Untersuchung neuer Energiequellen, wobei neuerdings die Mikroalgen eine wichtige Rolle spielen. Die sehr energiereiche Biomasse der Mikroalgen gewinnt als erneuerbare Treibstoffquelle der Zukunft immer größere Bedeutung. Durch Mikroalgen kann nicht nur Energie produziert werden, sondern auch das in Verbrennungsprozessen entstehende CO₂ fixiert werden.

Die Mikroalgen zeichnen sich (ganz) allgemein durch eine wichtige Eigenschaften aus; sie betreiben Photosynthese. Sie werden in prokaryotische und eukaryotische Gruppen eingeteilt. Die prokaryotischen Mikroalgen stellen beispielsweise Cyanobakterien oder sogenannte Blaualgen dar, zu den eukaryotischen Algen gehören hingegen Grünalgen, Kieselalgen und Rotalgen. Die Mikroalgen kommen dabei vor allem in Süßwasser, Brackwasser, Salzwasser und feuchter Erde vor, können aber praktisch überall gefunden werden. Bis jetzt sind über 40.000 Mikroalgenspezies identifiziert worden [1]. Sie produzieren unter optimalen Bedingungen bis zu zehnmal energiereichere Biomasse als andere Pflanzen (z.B. Mais, Raps). Mit Mikroalgen können viele wichtige Produkte, wie z.B. Farbstoffe, Antioxidantien wie β -Carotin oder Omega-3-Fettsäuren, die als Nahrungsergänzungsmittel dienen, hergestellt werden.

Mikroalgen werden nicht in Stahlreaktoren, sondern in sogenannten Photobioreaktoren kultiviert, da sie für ihr Wachstum Licht benötigen. In Stahlreaktoren ist der Lichteintrag nur sehr gering oder gar nicht möglich, weshalb Photobioreaktoren vorwiegend aus Glas oder Plexiglas bestehen. Durch das Glas kann das Kulturmedium beleuchtet werden und somit die für das Mikroalgenwachstum notwendigen Wachstumsbedingungen geschaffen werden. Die Entwicklung von solchen Photobioreaktoren stellt eine besondere Herausforderung dar. Je nach Bauart können die Dicke, der Durchmesser und die Größe von Photobioreaktoren nicht beliebig variiert werden. Der wichtigste Aspekt ist die gleichmäßige Beleuchtung aller Mikroalgenzellen. Bei hohem Photobioreaktordurchmesser können die Mikroalgenzellen im Reaktorinneren nicht optimal mit Licht versorgt werden.

Neben Photobioreaktorkultivierungen können Mikroalgen großtechnisch in offenen Becken kultiviert werden. Die Kultivierung von Mikroalgen in geschlossenen Photobioreaktoren unter definierten Bedingungen bietet (hingegen) viele Vorteile, wie (u.a.) die höhere Produktivität im Vergleich zur Kultivierung im offenen Becken.

Im Fokus der Kultivierungsprozesse steht vor allem die hohe Effizienz, die lediglich durch eine aufwendige Prozessführung erzielt werden kann. Für einen optimalen Prozessverlauf ist es nötig, die Informationen über den Kultivierungsprozess ohne Zeitverzögerung zu erhalten und diese Informationen in Echtzeit auszuwerten [2]. Für die Überwachung des Kultivierungsprozesses stellt die Zellzahl einen wichtigen Parameter, welcher entweder durch offline-Zellzählung oder online bestimmt werden kann, dar. Am Institut für Technische Chemie wurde zur online Überwachung das in-situ Mikroskop entwickelt und in vielen Kultivierungsprozessen bereits erfolgreich eingesetzt [3].

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Photobioreaktorsystem etabliert werden, in dem verschiedene Mikroalgenstämme mit unterschiedlichen Morphologien kultiviert und online überwacht werden können. Hierzu wurde zunächst ein Photobioreaktor aus Glas entwickelt. Bei der Entwicklung des Reaktors stellen die leichte Befüllung des Reaktors, einfache und sterile Probeentnahme sowie die bestmögliche Platzierung des Ausgleichsgefäßes und der Messsonden wichtige Aspekte dar. Der Photobioreaktor muss dabei besondere Eigenschaften für Mikroalgenkultivierungen aufweisen, wie z.B. gute Durchmischung, ausreichende Beleuchtung sowie Temperierung und Begasung. Zudem soll durch einen Aufbau mit innenliegender Beleuchtungseinheit eine optimale Licht- und Energienutzung realisiert werden.

Zur online-Überwachung der Kultivierungen soll zusätzlich ein Durchflussmikroskop in das System integriert werden. Dieses Durchflussmikroskop basiert auf dem Konzept des in-situ Mikroskops und unterscheidet sich von herkömmlichen Mikroskopen (z.B. Lichtmikroskop) lediglich durch den Anschluss an den Photobioreaktor. Mit dem Durchflussmikroskop und in-situ-Mikroskop werden Kultivierungen unter sterilen Bedingungen überwacht und die wichtigen Zellparameter online bestimmt. Mithilfe des Durchflussmikroskops kann die Zellzahl online ohne Probenentnahme direkt während des laufenden Prozesses bestimmt werden. Durch die wegfallende Probeentnahme verringern sich die Kontaminationsgefahr und der Volumenverlust.

Nachdem das System komplett charakterisiert ist und die wichtigen Aspekte optimiert wurden, soll das Durchflussmikroskop an die Überwachung und Auswertung der Kultivierung der Referenzmikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* adaptiert werden. Zur Auswertung der online aufgenommenen Bilder der Zellen wurden die am Institut für Technische Chemie entwickelten ISM-Auswertungsalgorithmen verwendet [3, 4]. Weiterhin soll das entwickelte Durchflussmikroskop an verschiedenen Modell-Mikroalgenstämmen, die sich maßgeblich durch ihre Morphologien unterscheiden, getestet werden. Somit sind die Möglichkeiten und Grenzen des eingesetzten Durchflussmikroskops zu bestimmen.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Mikroalgen

Mikroalgen sind Algen, die als einzelne Zellen oder als kurze Zellketten frei im Wasser schweben. Sie leben in vielen Wasseransammlungen, wie Salz-, Brack-, Süß- und Abwasser, auch in extremen Lebensräumen wie Gletschern oder Salinen. Ihr Lebensraum ist das Wasser, selten sind sie an Land anzutreffen. Einige Arten leben an Land in einer Symbiose mit Pilzen und bilden die Gruppe der Flechten. Die Mikroalgen können phototroph, heterotroph und mixotroph wachsen.

Mikroalgen sind die einfachsten und ältesten Pflanzen unter den Pflanzengruppen und waren die ersten Organismen, die Photosynthese betrieben. Sie produzieren gegenwärtig schätzungsweise 50 % des Sauerstoffs in der Atmosphäre. Zurzeit sind etwa 40.000 Mikroalgenarten bekannt, wobei davon nur 1 % kommerziell genutzt werden [5]. Mikroalgen haben je nach Art verschiedene Färbungen und werden nach ihrer Farbe in Grünalgen, Rotalgen, Braunalgen und Blaualgen unterteilt.

Eine charakteristische Eigenschaft von Mikroalgen ist, dass sie schneller als jede andere Pflanze Nährstoffe in Biomasse umsetzen können. Des Weiteren können sie auf landwirtschaftlich unnutzbaren Flächen kultiviert werden, verbrauchen weniger Wasser als andere Pflanzen und ihre Produktion ist im Gegensatz zu den meisten anderen Pflanzen, die nur saisonal nutzbar sind, das ganze Jahr möglich. Für die Kultivierung kann auch nicht trinkbares Wasser verwendet werden, so dass kein Ressourcen-Wettbewerb um die Wassernutzung zu befürchten ist.

Flächen- und zeitbezogen haben Mikroalgen eine höhere Produktausbeute als andere Pflanzen. Auf diese Weise können beispielsweise mit Raps nur 3-4 t Biotrockenmasse pro Hektar und Jahr erzeugt werden, während mit Mikroalgen bis zu 200 t Biotrockenmasse produziert werden können. Bei dieser Produktion bindet Raps nur knapp 7 t Kohlenstoffdioxid, während die Mikroalgen bis zu 380 t Kohlenstoffdioxid binden. Die Eiweißproduktion pro Hektar liegt bei Mikroalgen bei etwa 50 t, bei Weizen hingegen bei 0,8 t und bei Rindfleisch nur bei 0,16 t [6]. In der Biotrockenmasse beinhalten manche Mikroalgen einen hohen Anteil an Fettsäuren, die entweder als Nahrung oder als Rohstoff für Biokraftstoffe verwendet werden können. Zudem enthält die durch Mikroalgenkultivierungen produzierte Biomasse im Trockengewicht bis zu 60 % unterschiedlicher Aminosäuren, Proteine, Vitamine und Pigmente, die als Nahrungsergänzungsmittel, pharmazeutische Wirkstoffe, Nahrungsmittel, Lebensmittel- und Tier-

futterzusatzstoffe und Pigmente für die Lebensmittel-, Textil und Kosmetikindustrie dienen können. Für die Produktion dieser hochwertigen Produkte wird die landbasierte Kultivierung von Mikroalgen eingesetzt. Einige grüne Mikroalgen produzieren unter anaeroben Bedingungen Wasserstoff, allerdings nur in geschlossenen Systemen [7]. Auch Ethanol wird mit Hilfe von Mikroalgen kommerziell produziert (Algenol Biofuels).

Die Verwendung von Mikroalgen für die Produktion von Biokraftstoffen ist aufgrund der niedrigen Energiepreise noch nicht wirtschaftlich, sowohl wegen hoher Bioreaktorkosten als auch wegen niedriger Produktivität der Niedrigkostensysteme (open ponds). Zudem erfordert die Trocknung der Biomasse sehr viel Energie. Aber trotzdem werden weltweit etwa 8.000 t Mikroalgen pro Jahr erzeugt, mit denen ein Umsatz von ca. 6,1 Mrd. US\$ erreicht wird [8]. Wenn für diese Probleme eine Lösung gefunden wird, nimmt die Mikroalgenproduktion weiter zu. Die Mikroalgenproduktion ist vor allem in Asien verbreitet, wo sie als Nahrungsmittel verwendet werden.

2.1.1. *Chlamydomonas reinhardtii*

Bei der Gattung *Chlamydomonas* handelt es sich um einzellige haploide Grünalgen, die sich entweder asexuell durch Zellteilung oder sexuell durch Verschmelzen von Gameten vermehren. Die Gattung *Chlamydomonas* lebt im Meer, im Süßwasser und auf feuchten Flächen. Die Süßwasseralge *Chlamydomonas reinhardtii* ist schon seit über hundert Jahren bekannt und der am besten charakterisierte einzellige Vertreter der Familie der *Volvocaceae*, da ihr Genom seit 2002 vollständig sequenziert vorliegt [9]. Sie diente in der biologischen Grundlagenforschung, insbesondere bei der Erforschung der Photosynthese, als Modellorganismus [10]. Des Weiteren wird *C. reinhardtii* auch als Modellorganismus verwendet, um die Fortbewegungen von Zellen zu untersuchen [11]. Ein schematischer Aufbau sowie licht- und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. reinhardtii* Zellen sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

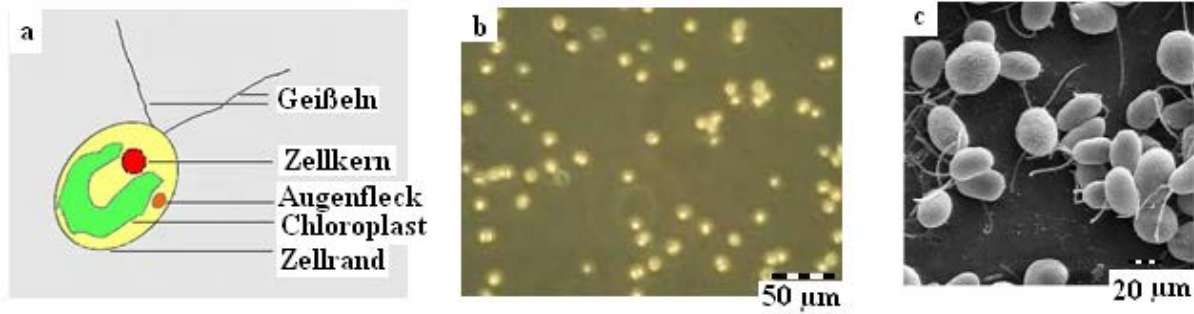


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau (a), lichtmikroskopische (b) und rasterelektronenmikroskopische (c) Aufnahmen von *Chlamydomonas reinhardtii* [12].

C. reinhardtii wächst sowohl phototroph als auch heterotroph und weist eine Verdopplungszeit von ca. 6-8 h auf. Die Kultivierungsbedingungen von *C. reinhardtii* werden in der Tabelle 5.1 im Anhang dargestellt.

Unter optimaler Nährstoffversorgung vermehren sich die Mikroalgen vegetativ [13]. Die Zellen wachsen bis sie ihre maximale Größe erreichen, ziehen dann ihre Geißeln zurück und runden sich ab. Anschließend findet die Teilung statt und es entstehen zwei Tochterzellen [14]. Hierbei wird die Zellwand der Mutterzellen abgebaut und die neuen Tochterzellen werden freigesetzt (siehe Abbildung 2.2) [15, 16, 17].

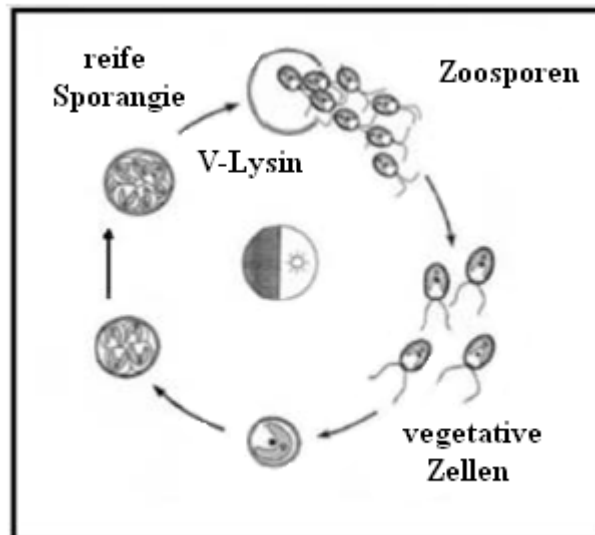


Abbildung 2.2: Vegetativer Reproduktionszyklus von *C. reinhardtii* [18].

Die meisten Zellen von *C. reinhardtii* haben becherförmige Chloroplasten, in denen die Photosynthese stattfindet. Am vorderen Pol besitzen die Zellen zwei Geißeln, die für die Bewegung der Zellen zuständig sind. Die Zellgröße liegt zwischen 10-20 µm und ist durch eine rundlich-ovale Morphologie gekennzeichnet.

Die Zellen von *C. reinhardtii* besitzen einen Augenfleck, welcher als Lichtsensor dient [19]. Die Mikroalgen sind von einer aus sieben Schichten bestehenden Zellwand aus Glykoproteinen umgeben [10]. Das Genom des zentralen Zellkerns setzt sich aus etwa 10^8 Basenpaaren zusammen und ist auf mindestens 16 Chromosomen verteilt [18].

C. reinhardtii wird heutzutage im Wesentlichen zur Bildung von Bio-Wasserstoff kultiviert, der unter Schwefelmangel produziert wird. An diesen können sich die Zellen (dementsprechend) schnell anpassen.

2.1.2. *Chlorella vulgaris*

Die Gattung *Chlorella vulgaris* zählt als einzellige Alge zu den einfachsten Formen der *Chlorophyceen*. Sie ist eine unbegeißelte unbewegliche Kugelalge und kommt in Fließgewässern auf festen und feuchten Oberflächen vor. Die im Süßwasser lebende Grünalge hat eine Zellgröße von 4-10 µm, die Morphologie ist rund/oval und die Zellen besitzen eine sehr dünne Membran als Zellwand. Wie bei *Chlamydomonas* haben *Chlorella*-Zellen auch einen glockenförmigen Chloroplasten [20]. *C. vulgaris* zählt zu den gewöhnlichen Grünalgen (*Chlorobionta*) und ist durch ihren hohen Chlorophyllanteil (bis zu 4 % in der Trockenmasse) eine der effektivsten Pflanzen in Hinblick auf die Biomasse, da aufgrund der hohen Teilungsfrequenz die Biomassekonzentration bei optimalen Bedingungen in kurzer Zeit enorm steigt. Die Vermehrung von *C. vulgaris* erfolgt vegetativ über Autosporenbildung. Sie durchlaufen innerhalb von 12-16 h bis zu 3 Teilungszyklen und teilen sich so in bis zu 16 Tochterzellen [20], weshalb sich dieser Mikroalgenstamm für die Biomasseproduktion sehr geeignet [21]. Die Kultivierungsbedingungen des Stammes *C. vulgaris* wird in der Tabelle 5.1 im Anhang zusammengefasst. In der durch *C. vulgaris* produzierten Biotrockenmasse befinden sich viele Mineralien, Vitamine, ungesättigte Fettsäuren und bis zu 50 % Proteine, darunter alle für den Menschen essentiellen Aminosäuren. Auf einer Fläche von einem Hektar wird von Weizen in einer Ernteperiode durchschnittlich ca. 3,5 t Trockenmasse (davon ca. 0,4 t Proteine) gewonnen. Im Gegensatz dazu beträgt die Biotrockenmasse von *Chlorella vulgaris* bei gleichen Randbedingungen etwa 45-60 t (davon ca. 22-30 t Proteine).

Wie (allgemein) bei Mikroalgen üblich beträgt die fixierte CO₂-Menge bei *C. vulgaris* bei einer Biotrockenmassenproduktion von 1 t, 2 t CO₂. Eine schematische Darstellung sowie eine lichtbildmikroskopische Aufnahme von *C. vulgaris* sind in Abbildung 2.3 dargestellt.

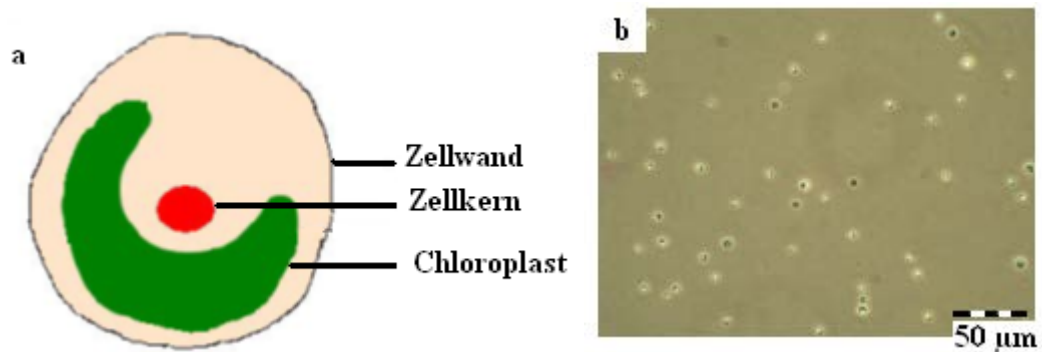


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung (a) und eigene lichtbildmikroskopische Aufnahme (20 fache Vergrößerung) (b) von *C. vulgaris*.

Die Zellwand von *Chlorella* besteht zu 31 % aus Hemicellulose, zu 27 % aus Proteinen, zu 15,4 % aus Cellulose, zu 9,2 % aus Lipiden, zu 3,3 % aus Glucosamin und zu 5,2 % aus anderen Stoffen [22]. Der Lebenszyklus von *C. vulgaris* ähnelt dem von *C. reinhardtii*.

2.1.3. *Haematococcus pluvialis*

Bei der Blutregenalge *Haematococcus pluvialis* handelt es sich um eine einzellige, eukaryotische Grünalge aus der Klasse der Chlorophyceae, die meistens in stehenden Gewässern wie Pfützen, Teichen und Vogeltränken vorkommt [23]. Zellen von *H. pluvialis* sind rundlich oval und haben eine Zellgröße von 20-80 µm. Die einzellige Süßwasseralge besitzt einen becherförmigen Chloroplast, körperlange Geißeln und einen Augenfleck. Der Augenfleck ist ein Photorezeptor, der Phototaxis ermöglicht [2]. Durch die Geißeln erfolgen die Fortbewegung der Zellen sowie die Anhaftung an festen Oberflächen, wie z.B. Reaktor- oder Schüttelkolbenwänden, selbst bei hohen Zelldichten. Die Kultivierungsbedingungen befinden sich in der Tabelle 5.1 im Anhang.

H. pluvialis vermehrt sich durch Zellteilung und sexuelle Fortpflanzung über Isogamie. Bei der Zellteilung werden 4-8 Zoosporen innerhalb einer Zelle gebildet und freigesetzt (Abbildung 2.4).

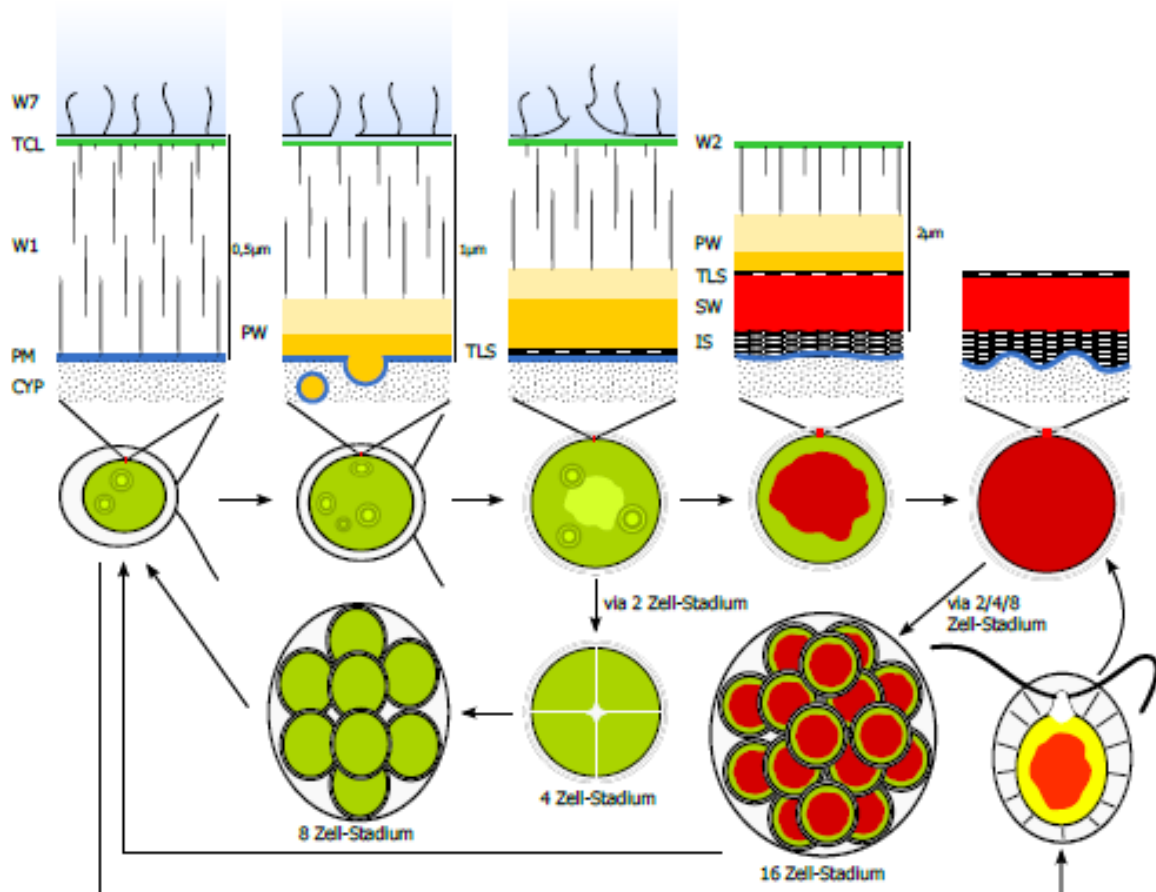


Abbildung 2.4: Entwicklungsstadien der Zellwand und Lebenszyklus von *H. pluvialis*. CYP: Cytoplasma, PL: Plasmamembran, W1/2: EZM, TCL: Dreiteilige kristalline Schicht, PW: Primäre Zellwand, SW: Sekundäre Zellwand, TLS: Trilaminare Schicht, IS: Zwischenraum [24, 25, 26].

Der Lebenszyklus von *H. pluvialis* erfolgt in drei Stadien. Erstes Stadium ist eine grüne freischwimmende doppelt geißelte Form [27]. In dieser Phase wird möglichst viel Biomasse produziert und es herrscht kein Stress für die Zellen, da optimale Bedingungen angeboten werden, um maximale Wachstumsgeschwindigkeiten zu erreichen. Bei der zweiten Phase handelt es sich um ein grünes Stadium ohne Geißel, in der die sogenannte Palmella-Form gebildet wird. Diese Phase kann bei einem Mangel an CO₂, Nährstoffen oder bei hoher Temperatur oder Lichtintensität eintreten.

Im letzten Stadium synthetisieren und akkumulieren die Mikroalgenzellen β -Carotinoide, z.B. Astaxanthin. Diese Phase fängt mit der Zellaussetzung an, und die vegetative Vermehrung kann stattfinden. Die Zellen entwickeln sich unter den genannten Stressbedingungen zu roten carotinoidreichen Aplanosporen, wobei das Zellvolumen zu- und der Proteingehalt abnehmen. Bei idealen Bedingungen bilden Aplanosporen 4 bis 8 oder gar bis zu 16 Zoosporen.

H. pluvialis Zellen besitzen eine gallertartige Zellwand, die Schutz für die Zelle bietet und aus vielen Schichten besteht (Abbildung 2.4). Der Protoplast ist über Plasmodesmen an der äußersten Schicht verbunden, dabei durchziehen die Plasmodesmen die EZM (Extrazelluläre Matrix), welche hauptsächlich aus Glycoproteinen (75 %) besteht [26]. Im Laufe der Transformation wird über sekretorische Vesikel eine erste primäre Zellwand auf der Zellmembran aufgebaut. Bei der Bildung von Aplanosporen wird zwischen der aufgebauten primären Zellwand und der Zellmembran eine sekundäre Zellwand aufgebaut, die hauptsächlich aus Kohlenhydraten (70 %) besteht, davon 89 % Polymannose. Abgeschlossen wird sie zur EZM durch eine trilaminare Schicht [26]. Die äußerste Schicht, welche die EZM zur Umwelt hin abschließt, besitzt einen erhöhten Cellulosegehalt [26, 28].

Durch Kultivierungen von *H. pluvialis* wird in großen Mengen und mit hoher Ausbeute Astaxanthin produziert. Die Farbänderungen und die Astaxanthin-Produktion von *H. pluvialis* sind in Abbildung 2.5 zu sehen. Die gesamte Kultivierung dauert bei optimalen Bedingungen etwa 3 Wochen. In der ersten Woche sind die Mikroalgen intensiv grün, ab der zweiten Woche ändert sich die Farbe von grün auf gelb bis orange. In der letzten Phase (ca. 3. Woche) hat die Kultur eine intensive rote Farbe.

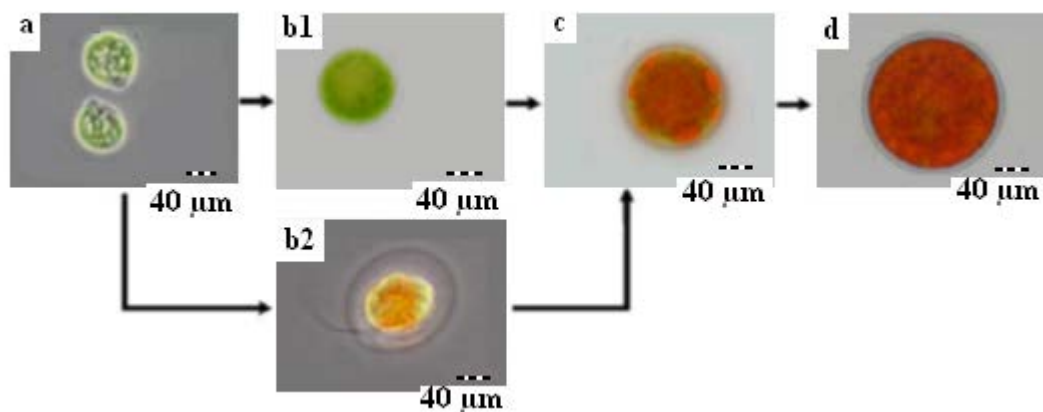


Abbildung 2.5: Mikroskopische Aufnahmen von *Haematococcus pluvialis* innerhalb einer kompletten batch-Phase: (a) vegetative Form (b1) Palmella-Stadium (b2) Astaxanthin-haltige vegetative Form (c) Übergang in Aplanosporen-Form (d) Aplanospore [29].

Astaxanthin ist (Abbildung 2.6) das wirkungsstärkste der Carotinoiden, das zur sauerstoffhaltigen Xanthophyll-Klasse der Carotinoide gehört.

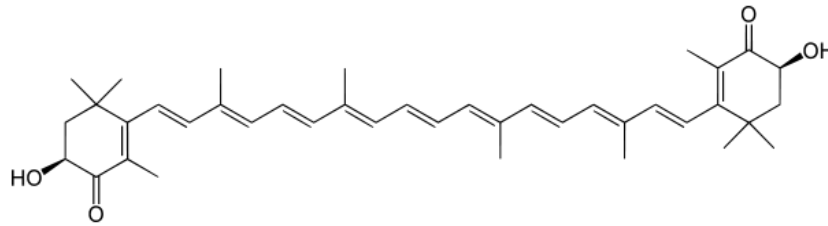


Abbildung 2.6: Molekular-Struktur von Astaxanthin.

Astaxanthin ist neben der antioxidativen Wirksamkeit (gesundheitsgezogene Wirkung) insbesondere für die lebensmittelverarbeitende Industrie interessant, da es einen natürlichen roten lebensmitteltauglichen Farbstoff darstellt (technische Funktionalität).

2.1.4. *Nannochloropsis oculata*

Die Mitglieder der Gattung *Nannochloropsis* sind in marinen Ökosystemen und besonders im Küstenwasser sehr verbreitet. Bei dieser Gattung wurden bis jetzt fünf Spezies in Salzwasser (*N. salina*, *N. granulata*, *N. oculata*, *N. oceanica* und *N. gaditana*) [30] und eine Spezies im Süßwasser (*N. limnetica*) [31] beschrieben. Die Zellgröße dieser Mikroalgen liegt zwischen 2-5 μm . Zu der Gattung *Nannochloropsis* gehörende Mitglieder werden durch das Fehlen von Chlorophyll b charakterisiert [32]. Die spezifische Eigenschaft dieser Gattung ist die Produktion von Fettsäuren, unter denen die Omega-3-Fettsäure Eicosapentaensäure (EPA, C20:5 ω 3) eine Hauptrolle einnimmt. Eine weitere wichtige Fettsäure, die durch diese Gattung synthetisiert wird, ist die Omega-6-Fettsäure Arachidonsäure (ARA, C20:4 ω 6).

In Abbildung 5.4 aus dem Anhang sind die mittels Durchflussmikroskop online aufgenommenen Bilder von *N. oculata* Zellen während der Photobioreaktorkultivierung dargestellt. Die Kultivierungsbedingungen sind in der Tabelle 5.1 im Anhang dargestellt. *N. oculata* ist eine einzellige Salzwassermikroalge, die in der Biotrockenmasse 40-45 % Lipide enthält [33]. Die *N. oculata* Zellgröße beträgt 1-2 μm und die Zellmorphologie ist sphärisch. Diese Mikroalge ist eine wichtige Nahrungsmittelquelle und Futterzusatzmittel in der kommerziellen Erzeugung vieler Wasserorganismen.

2.1.5. *Phaeodactylum tricornutum*

Die einzellige Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* kommt in drei unterschiedlichen Formen vor: einer drei hornigen Form, einer spindelförmigen und einer ovalen Form. Die Zellgröße in Abhängigkeit der Form beträgt 2-10 μm .

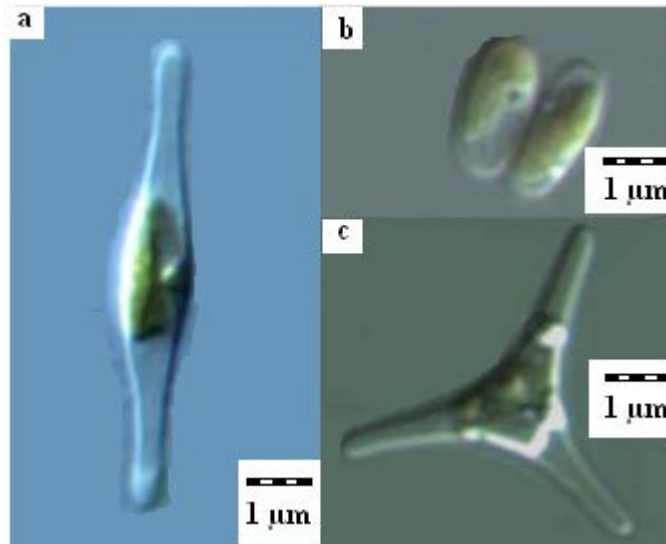


Abbildung 2.7: Unterschiedliche Morphologien von *Phaeodactylum tricornutum*. Zellen (a) Spindel-Form, ovale Form (b) und drei hornige Form (c) [34].

Abbildung 2.7 zeigt die drei verschiedenen Morphologien von *Phaeodactylum tricornutum*. Die Wachstumsraten und Morphologie dieses Stamms sind stark von Umwelt-Faktoren (Temperatur und Licht) abhängig und je nach Bedingung wird eine der drei Morphologien bevorzugt. Die Kultivierungsbedingungen werden in der Tabelle 5.1 im Anhang zusammengefasst.

Kieselalgen besitzen sehr stabile Schalen und sind in der Lage eine große Menge an hochwertigen Ölen herzustellen, welche in aktuellen Forschungsvorhaben auf ihre Eignung als Biokraftstoff als potenzieller Ersatz für Diesel-Kraftstoff überprüft werden. In Abbildung 5.5 aus dem Anhang sind die mittels Durchflussmikroskop online aufgenommenen Bilder während der Photobioreaktorkultivierung dargestellt.

2.1.6. *Spirulina platensis*

Die Cyanobakterien oder die Blaualgen gehören nicht zu der Gattung der Mikroalgen sondern zu den Bakterien. Cyanobakterien sind Prokaryoten und besitzen nicht die für Eukaryoten typischen Zellbestandteile, wie einen Zellkern, Mitochondrien und Chloroplasten. Cyanobakterien sind gramnegative, einzellige oder filamentöse, sauerstoffproduzierende, phototrophe Bakterien. Cyanobakterien sind die ältesten phototrophen Organismen und sind zur CO₂-Fixierungsfähig. Sie wachsen vorwiegend phototroph, photoautotroph und einige auch heterotroph. Ihr Lebensraum ist Süß- und Salzwasser sowie feuchter Boden (Stickstofffixierung).

Die Cyanobakterien werden in fünf Ordnungen eingeteilt: *Chroococcales*, *Pleurocapsales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales* und *Stigonematales* [35]. Diese unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Morphologie.

Die Fortpflanzung der Cyanobakterien erfolgt allgemein ungeschlechtlich durch Zellteilung. Im Vergleich zu anderen Pflanzen verfügen Cyanobakterien nicht über alle Chlorophyllarten, sondern nur über Chlorophyll a, welches in Cyanobakterien das für die Photosynthese zuständige Pigment darstellt.

Bei dem Stamm *Spirulina platensis* handelt es sich um ein Cyanobakterium der Gruppe *Oscillatoria*, die über unverzweigte und freibewegliche Trichome verfügen. Die Vermehrung der Zellen findet durch Zellteilung statt. Der Name *Arthrospira platensis* (synonym zu *Spirulina platensis*) wird ebenfalls für die Gattung verwendet. Sie besitzen eine länglich spiralförmige, helikale Morphologie, mit dem Durchmesser der Wendeln zwischen 35-50 µm. Die Zellen sind bis zu 500 µm lang und der Zelldurchmesser liegt im Bereich von 6-8 µm [36]. Die Struktur und Länge der helikalen Filamente können von Spezies zu Spezies, aber auch innerhalb der gleichen Spezies, stark variieren. Die Morphologie der Zellen hängt sehr stark von Umweltfaktoren (z.B. Temperatur, pH-Wert und Lichtintensität) ab. Bei Temperaturen oberhalb von 37 °C setzt eine/die Zellyse ein [37]. Die Einstellung des pH-Wertes erfordert auch große Sorgfalt bei der Kultivierungen von *S. platensis* Zellen [38]. Die Kultivierungsbedingungen von *S. platensis* werden in der Tabelle 5.1 im Anhang dargestellt. Wie oben beschrieben, besitzen die *S. platensis* Zellen eine spirale Morphologie, welche in der Abbildung 2.8 dargestellt sind.

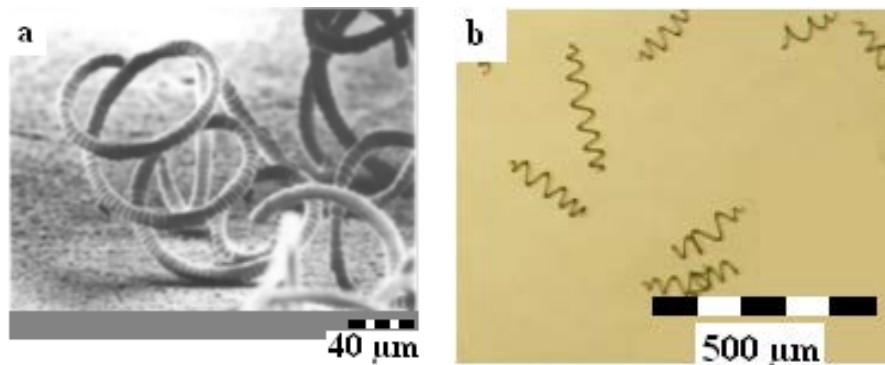


Abbildung 2.8 : Elektronenmikroskopische (a) [36] und eigene lichtmikroskopische Aufnahmen der Mikroalge *S. platensis* (b).

Der Lebenszyklus von *Spirulina*, gezeigt in Abbildung 2.9 wird in drei grundsätzlichen Stufen zusammengefasst: Zersplitterung des Trichoms, Zellvergrößerungs- und Zellreifungsprozesse der Hormogonia und Verlängerung des Trichoms.

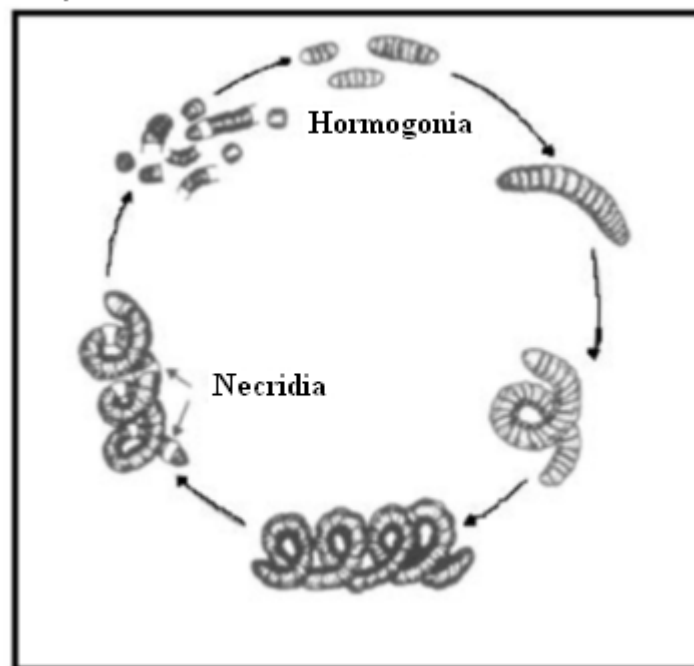


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *Spirulina platensis* [36].

Das Trichom zersetzt sich durch die Bildung spezieller Zellen in viele Fragmente, den Necridia. Die Fragmentierung des Trichoms bei Necridia führt danach zur Bildung kurzer Ketten, Hormogonia. Die Zahl von Zellen in Hormogonias wird durch die binäre Spaltung erhöht.

Anschließend finden die Zellvergrößerung und der Reifungsprozess bei Hormogonias statt. Im letzten Teil des Prozesses wächst das Trichom längsgerichtet und nimmt eine spiralförmige Form an [39].

S. platensis kommt in stark alkalischen Salzseen mit hohen Salzkonzentrationen in sehr warmen Gebieten wie Afrika, Mittelamerika und Australienvor. Seit ca. 700 Jahren wird *S. platensis* am afrikanischen Tschadsee und am mexikanischen Lago de Texcoco als Nahrung geerntet. Die jährliche Biomasseproduktion von *S. platensis* wird für das Jahr 2000 weltweit auf ca. 2.000 t geschätzt [40]. *S. platensis* hat einen sehr hohen Eiweißgehalt und die Biotrockenmasse von *Spirulina* weist einen Proteingehalt bis zu 65 % auf. Sie enthält alle essentiellen Aminosäuren und viele nicht essentielle Aminosäuren, außerdem Beta-Carotin (Provitamin A), die Vitamine B1, B2, B3, B5, B6, B12 und E [41]. *Spirulina* ist sehr reich an Mineralstoffen, sie enthält ca. 30-mal mehr Eisen als Fleisch.

2.2. Messtechniken

2.2.1. Klassifizierung der Prozessanalytik

Zur Beobachtung von Kultivierungsprozessen werden unterschiedliche Sensoren verwendet, mit denen mehrere Kultivierungsvariable überwacht werden können. Zur Überwachung wird sowohl offline Analytik als auch online Analytik eingesetzt. Die atline Analytik – eine Variante der offline Analytik - wird direkt neben dem Prozess aufgestellt und die Analyse erfolgt direkt vor Ort.

Für eine optimale Prozessbeobachtung von Kultivierungsprozessen ist es erforderlich, ohne Zeitverzögerung die Informationen über den Kultivierungsprozess zu erfassen und diese in Echtzeit auszuwerten.

Die Prozessanalytik kann in vier Kapiteln zusammengefasst werden. Eine kurze Zusammenfassung der unterschiedlichen Analytik-Systeme ist in der Tabelle 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1: Einteilung der unterschiedlichen Analytik Systeme.

Analytik-Systeme	Eigenschaften
offline Analytik	- Diskontinuierliche Untersuchung von entnommenen Proben ohne direkte Anbindung an den Prozessablauf.
atline Analytik	- Diskontinuierliche Untersuchung von entnommenen Proben ohne direkte Anbindung an den Prozessablauf, Untersuchung erfolgt in Prozessnähe.
online Analytik	- Untersuchung im Produktionsablauf ohne Probenentnahme, die Untersuchung erfolgt kontinuierlich oder diskontinuierlich, der Sensor ist in einem Bypass platziert.
inline Analytik	- Untersuchung des gesamten Produktionsablaufs ohne Probenentnahme, der Sensor ist direkt im Reaktor platziert

Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Analytik-Methoden mit deren Vor- und Nachteilen kurz beschrieben.

2.2.1.1. Offline Analytik

Bei der offline Analytik werden die Proben manuell entnommen. Die Probenaufbereitung, die Messungen und die Auswertungen sind diskontinuierlich und auch nicht grundsätzlich reproduzierbar, weil sich die Probeneigenschaften während der Probeentnahme und Messung ändern können. In mehr als 80 % aller Störungen der offline Prozessanalytik ist ein Fehler in der Probenentnahme die Ursache [42]. Ein Beispiel für offline Analytik ist die Bestimmung der Optischen Dichte. Die Vor- und Nachteile der offline Analytik können auf folgende Weise in der Tabelle 2.2 zusammengefasst werden.

Tabelle 2.2: Die Vor- und Nachteile von offline Analytik.

Vorteile	Nachteile
- Expertenwissen (Literaturquellen) steht zur Verfügung	- Keine Echtzeit-Prozesssteuerung möglich,
- Hohe Flexibilität und damit kostengünstig	- Diskontinuierliche und nicht reproduzierbare Probenaufbereitung
- Umgebung für analytische Fragestellungen geeignet (Probenahme, Aufbereitung etc.)	- Kontaminationsgefahr
	- Hoher Zeit- und Arbeitsaufwand

In der Abbildung 5.6 (siehe Anhang) ist darüber hinaus dargestellt, wie der Verlauf eines mit offline Analytik ausgestatteten Prozesses aussieht. Hier ist die Regelung und Steuerung des Prozesses erst nach der Messung möglich. Die Zeit, die für Probeentnahme und Messung gebraucht wird, wird verloren bzw. fließt als Verzögerung in die Regelungsschleife ein.

2.2.1.2. Atline Analytik

Bei der atline Analytik handelt es sich um eine Analyse, die direkt neben dem Prozess aufgestellt ist. Die Analyse erfolgt direkt vor Ort, nach einer manuellen oder (halb)-automatisierter Probenentnahme. Der einzige Unterschied zur offline Analytik ist, dass die analytischen Messungen direkt in Prozessnähe durchgeführt werden. Die Prozessregelung ist bei der atline Analytik genauso diskontinuierlich wie bei der offline Analytik. Der Prozessablauf ist in der Abbildung 5.7 (siehe Anhang) schematisiert dargestellt. Die Tabelle 2.3 fasst die Vor- und Nachteile der atline Analytik zusammen.

Tabelle 2.3: Die Vor- und Nachteile von atline Analytik.

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> - Für die Aufgabenstellung geeignetes Instrument als Schnellmethode - Einfache Probenentnahme 	<ul style="list-style-type: none"> - Relativ niedrige Geräteauslastung - Diskontinuierliche Prozesssteuerung - Kontaminationsgefahr bei manueller Probenentnahme

2.2.1.3. Online Analytik

Bei der online Analytik wird durch manuelle Probeentnahme keine Zeit verloren, weil die Messung direkt im Prozess erfolgt. Daher eignet sich online Analytik prinzipiell zur kontinuierlichen Prozesssteuerung. Im Vergleich zu offline Analytik wird die Kontamination durch Probeentnahme ausgeschlossen, weil keine Proben entnommen werden. Bei der online Analytik werden die Messungen praktisch ohne Zeitverzögerung durchgeführt und die Informationen über den Kultivierungsprozess erfasst, die dann direkt zur Prozessregelung und -steuerung genutzt werden können. Der verwendete Sensor wird in einem Bypass an das System angeschlossen - das ist der einzige Unterschied zur inline Analytik. Als Beispiel für online Analytik kann das Durchflussmikroskop genannt werden. Die online Analytik ermöglicht

somit neben der besseren Prozessüberwachung auch eine bessere Anpassung der Produkteigenschaften. Der Prozessablauf ist in der Abbildung 5.8 (siehe Anhang) dargestellt und die Vor- und Nachteile des Prozesses sind in der Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: Die Vor- und Nachteile von online Analytik.

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> - Schnelle Messung, keine manuelle Probenentnahme nötig - Die Prozessüberwachung ohne Zeitverzögerung möglich - Automatisierte Prozesssteuerung möglich - Keine Kontaminationsgefahr, da keine Probenentnahme nötig 	<ul style="list-style-type: none"> - Begrenzte Auswahl an geeigneten Sensoren und Messmethoden - Bei komplizierteren Sensoren, hoher Kostenaufwand für Beschaffung, Wartung und Kalibration

2.2.1.4. Inline Analytik

Inline Analytik kann als eine Variante der online Analytik betrachtet werden, wo der Sensor nicht im Bypass, sondern direkt im Prozessgefäß installiert ist. Die Aussagen im Abschnitt 2.2.1.3 und in der Tabelle 2.4 über die online Analytik treffen also auch auf die inline Analytik zu. Als Beispiel für inline Analytik kann das in-situ Mikroskop [3] genannt werden.

2.3. Durchflussmikroskop

Mikroskopische Methoden werden in der Biotechnologie seit langer Zeit zur Überwachung von Kultivierungsprozessen eingesetzt. Im Gegensatz zur offline Überwachung des Kultivierungsprozesses ist mit einem Durchflussmikroskop eine online Überwachung mit Bypass realisiert worden, die es ermöglicht, den Kultivierungsprozess in Echtzeit zu betrachten. Dabei können Zelldichte, Zellzahl und Zellmorphologie bestimmt werden. Außerdem ist eine zeitaufwändige Probeentnahme nicht mehr notwendig. Dadurch wird auch das Risiko einer Kontamination verringert. Ein anderer wichtiger Vorteil ist, dass die Komponenten des Durchflussmikroskops, die später mit dem Kulturmedium in Kontakt treten, durch Autoklavieren sterilisierbar sind. Mit diesem System werden Bilder einer Kulturprobe aufgenommen und

anschließend mit Hilfe von Bildverarbeitungsalgorithmen in Bezug auf Zellzahl, Zellgröße und Zellmorphologie ausgewertet. Die bildgebenden Durchflussmikroskope haben einen großen Stellenwert bei der Prozessoptimierung, -charakterisierung, -regelung und -überwachung. Bei möglicher Kontamination können andere Mikroorganismen sofort erkannt werden. Die Entwicklung dieses Durchflussmikroskops basiert auf den Erfahrungen der in-situ Mikroskopie. Es handelt sich hauptsächlich um eine Neukonzeption der Messzone. Die technischen Unterschiede zwischen dem in-situ Mikroskop und dem Durchflussmikroskop liegen in der Probenentnahme, dem Anschluss des Mikroskops an das System und der Beleuchtungseinheit. Mit einem Durchflussmikroskop ist im Gegensatz zum in-situ Mikroskop das Arbeiten mit geringem Volumen möglich. Bei beiden Mikroskoptypen befindet sich eine Lichtquelle (LED) am unteren Ende, allerdings ist die Stromversorgung der Lichtquelle anders aufgebaut. Das in-situ Mikroskop ist direkt in dem Ausgleichsgefäß, welches einen Teil des Reaktors darstellt (vgl. Abschnitt 2.5) mit Hilfe eines Stutzens platziert (Abbildung 2.10), das Durchflussmikroskop ist über einen Bypass an das System angeschlossen. Die Entwicklung des Durchflussmikroskops ist in [43] beschrieben und das System in mehreren Veröffentlichungen dargestellt [44, 45, 46].

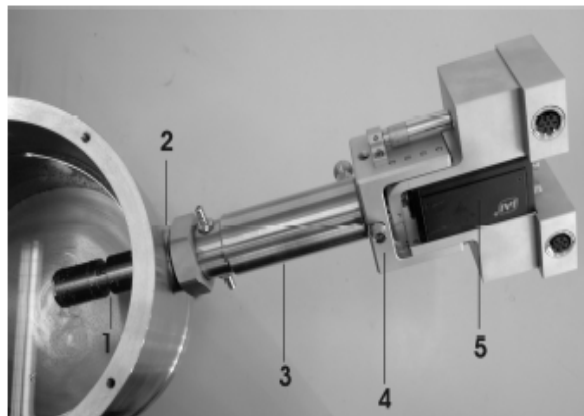


Abbildung 2.10: In-situ Mikroskop (Typ III-XTF), verschraubt an einen seitlichen Port eines Ausgleichsgefäßes am Photobioreaktorsystem: 1) Messzone; 2) Reaktorport; 3) Mikroskopkörper; 4) Optikeinheit; 5) Kamera [3].

In Abbildung 2.11 ist ein Prototyp des Durchflussmikroskops dargestellt. Es handelt sich bei dem Durchflussmikroskop um ein umgerüstetes in-situ Mikroskop vom Typ III XTF [43, 4], welches auf dem Prinzip eines Durchlicht-Hellfeld-Mikroskops mit endlich korrigierter Optik

basiert. Die wesentlichen Teile des Durchflussmikroskops sind der Mikroskop-Body mit der Messzone, der Kamera und dem Objektiv. Die Messzone, die sich durch Bewegung des inneren Tubus öffnen und schließen lässt, wird mithilfe eines Computers gesteuert. Die Beleuchtung der Messzone erfolgt durch eine LED unterhalb der Messzone. Die Bewegung des inneren Tubus führt zur Änderung des Volumens der Messzone, was durch einen mit Mikrometerschrauben verbundenen Schrittmotor eingestellt wird. Über einen zweiten Schrittmotor lässt sich ein Objektiv-Tubus positionieren, mit dem fokussiert wird [3]. Beide Schrittmotoren werden vom in-situ Control-Programm gesteuert [4].

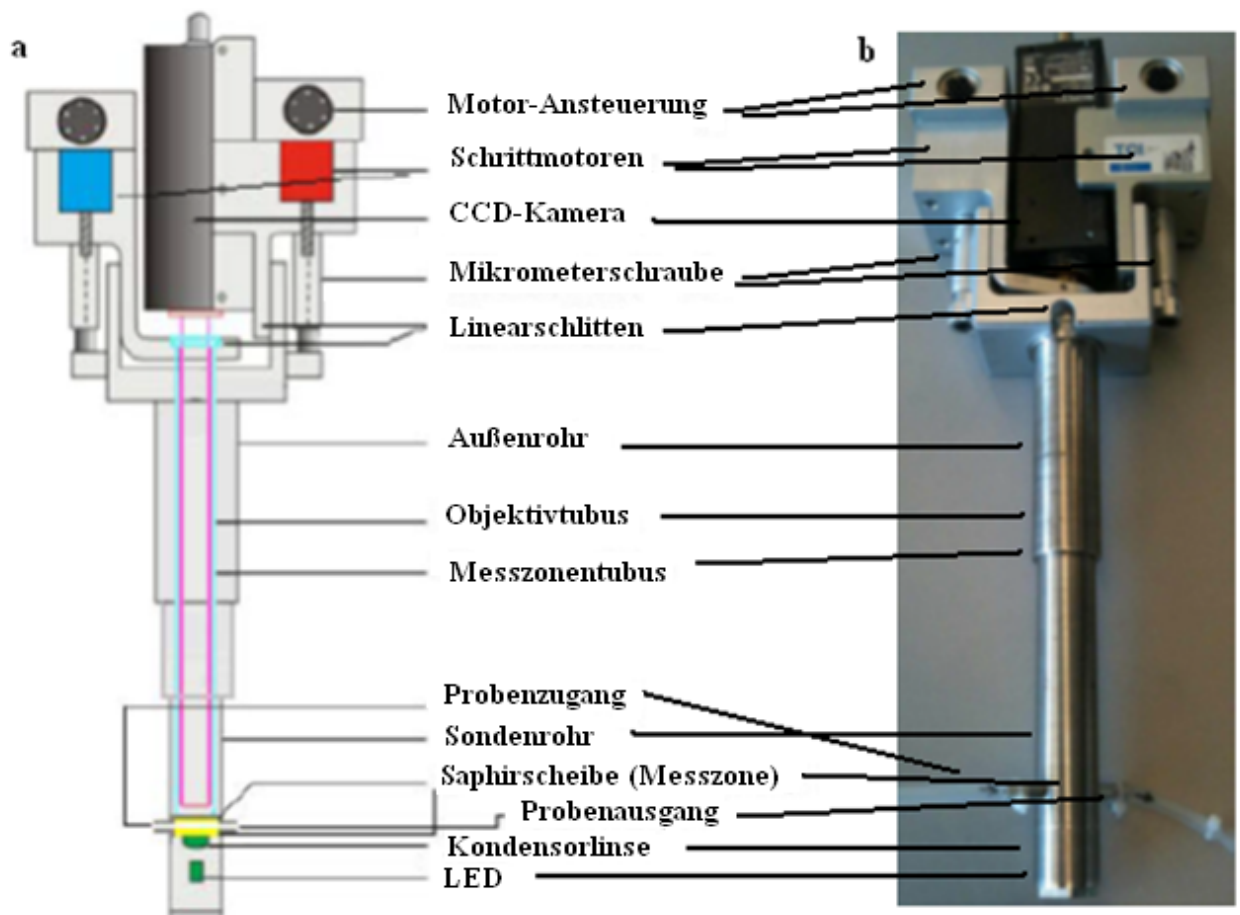


Abbildung 2.11: a) Schematischer Aufbau eines Durchflussmikroskops (Typ III-XTF-modifiziert). Alle Elemente abwärts des Außenrohres (inkl.) sind autoklavierbar b) Bauliche Veränderung am Modell ISM III XTF: Die Messzone ist als Durchflusszelle gestaltet (siehe Abbildung in-situ Mikroskop). Geräteentwicklung beschrieben in [43].

In Abbildung 2.12 ist die Messzone des Durchflussmikroskops dargestellt, welches an einen Reaktor angeschlossen ist. Mit der LED werden die Objekte beleuchtet und durch das Objektiv-

tiv auf den CCD-Chip der Kamera abgebildet. Die Bildinformationen der Kamera werden von der Software in-situ Control [4] empfangen und auf der Festplatte gespeichert. Das Programm dient neben der Aufnahme der Bilder zur Steuerung des Mikroskops.

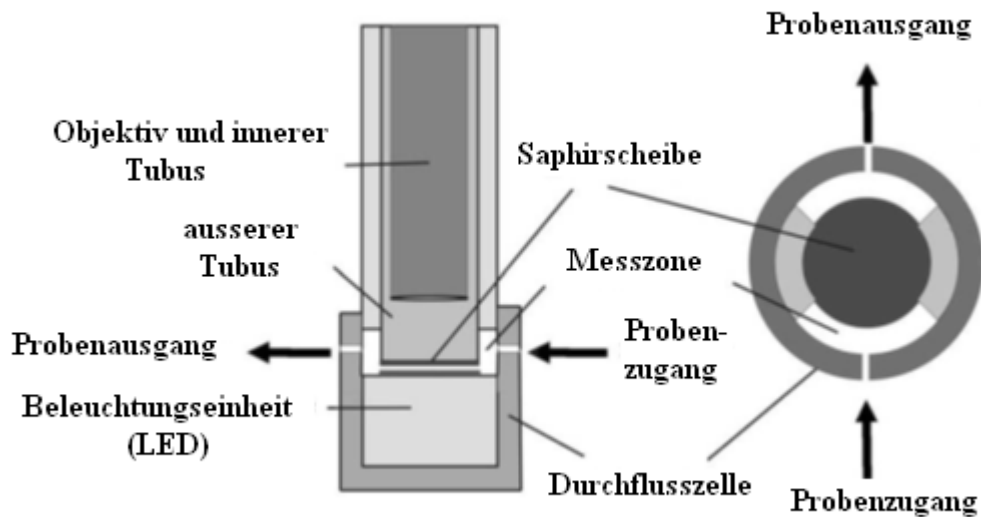


Abbildung 2.12 : Messprinzip des Durchflussmikroskops.

Um das genannte ISM für den Einsatz als Durchflussmikroskop zu benutzen, wurden Messzellen umgebaut, die über die Messzone gesteckt werden konnten und die mit Hilfe einer Peristaltikpumpe mit dem Kulturmedium durchströmt wurden. Der Durchfluss der Messzellen kann seitlich (von rechts nach links) oder von unten nach oben erfolgen. Die Messzelle besteht aus Edelstahl und die wird mit zwei Gummiringen abgedichtet. Im Zentrum der Messzelle befinden sich zwei Bohrungen, über die Schläuche mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm angeschlossen werden können.

2.4. Photobioreaktoren

2.4.1. Allgemeines

Photobioreaktoren (PBR) sind Reaktoren, in denen phototrophe, einzellige oder wenigzellige Mikroorganismen wie Mikroalgen, Cyanobakterien, pflanzliche Zellkulturen und Moospflanzen kultiviert werden können. Für die Kultivierungen von Mikroalgen gibt es zwei Reaktortypen: offene Systeme (eine Übersicht siehe [47]) und geschlossene Systeme (eine Übersicht siehe [48]). Beide Systemtypen werden im Allgemeinen Photobioreaktoren genannt, im Folgenden wird die Abkürzung PBR verwendet. Verschiedene PBR-Typen und Überlegungen zu ihrem Entwurf und Brauchbarkeit für individuelle Prozesse werden in eine Reihe von Reviews behandelt (z.B. [47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54]). Offene Systeme sind natürliche oder künstliche Becken (open ponds) und Raceway Ponds (etwa Laufbahnbecken, nach ihrer charakteristischen Form). In Raceway Ponds können die Mikroalgen in Bewegung kultiviert werden. Zwei dieser offenen Systeme sind in Abbildung 2.13 dargestellt.



Abbildung 2.13: Typische kommerzielle Mikroalgenproduktionsanlagen, Kalifornien und Hawaii [55].

In den offenen Kultivierungssystemen herrschen für die Mikroalgen Lebensbedingungen, die mit deren natürlichen Lebensraum vergleichbar sind. Hauptprobleme der offenen Kultivierungen sind Wasserverlust durch Verdunstung, anhaltende Kontaminationsgefahr durch andere Organismen und ein großer Flächenbedarf [56]. Der Lichteintrag ist bei den offenen Systemen gering und es gibt sehr begrenzte Möglichkeiten zur Kontrolle der Kultivierungsbedingungen (Temperatur, pH und CO₂-Begasung). Die Produktion von Wasserstoff durch Mikroalgenkultivierung ist in offenen Systemen völlig ausgeschlossen und das Biomassewachstum hängt stark vom Klima ab. In der folgenden Tabelle 2.5 werden offene Systeme und geschlos-

sene Photobioreaktoren verglichen. Neben vielen Nachteilen haben offene Systeme auch Vorteile im Vergleich zu geschlossenen Photobioreaktoren; so sind die Investitionskosten geringer und die Reinigung ist einfacher als bei geschlossenen Photobioreaktoren.

Tabelle 2.5: Vergleich verschiedener Reaktorsysteme [57].

Parameter	Open ponds/raceways	geschlossene Photobioreaktoren
Flächenbedarf	Hoch	gering
Wasserverlust	sehr hoch	gering
Ausfällungsgefahr	Hoch	gering
CO₂-Verlust	hoch (je nach Tiefe)	gering
O₂-Konz.	gering	sterile Gasaustausch elemente nötig
Temperatur	hoch variabel, je nach Tiefe, klimaabhängig	Kühlung notwendig
Scherstress	Gering	systemabhängig
Instandhaltung	Einfach	bei Mehrwegsystemen auf- wendig
Kontaminationsgefahr	sehr hoch	beherrschbar
Biomassenqualität	inkonsistent	reproduzierbar, konsistent
Biotrockenmasse	gering (große Flüssigkeits- menge nötig)	hoch
Produktionsflexibilität	gering	hoch (Sterilisierbarkeit Umstellung)
Betriebskosten	gering	hoch bis sehr hoch (Kontroll- und Steuerungssysteme)
Lichteintrag	gering	hoch (abhängig von Struktur)

Geringe Produktivitäten, hohe Kontaminationsgefahr, schlechte Überwachung sowie die Unbeständigkeit offener Systeme führte zur Entwicklung geschlossener Photobioreaktoren [58]. Geschlossene Photobioreaktoren sind in der Regel geschützt gegenüber Umwelteinflüssen. Kultivierungen können in geschlossenen Photobioreaktoren ohne Kontaminationsgefahr durchgeführt werden und die Ergebnisse und der gesamte Betrieb sind reproduzierbarer. Der

gesamte Prozess wird durch kontrollierten Lichteintrag, bessere Begasung, sorgfältige pH-Kontrolle und temperierbares Kulturmedium leichter überwacht werden.

Durch die besseren Bedingungen in geschlossenen Systemen wird die Produktivität erhöht, eine hohe Zelldichte erreicht und gleichzeitig die hochwertigen Produkte kostengünstig (abgesehen von Investitionskosten) hergestellt, weil für die Mikroalgenkultivierungen im Photobioreaktoren bessere Bedingungen (siehe in Tabelle 2.5) herrschen. Sowohl offene Systeme als auch geschlossene Photobioreaktorsysteme sind geeignet und gut brauchbar für die Biomasseproduktion. Für die Produktion von Nahrungsmittelzusätzen werden in der Regel geschlossene Photobioreaktoren verwendet, weil sie hohe Reinheit und bessere Qualität der Produkte aufweisen.

Mikroalgen verwenden Licht als Energiequelle mit Hilfe von Photosynthese. Somit können durch optimale Zellbeleuchtung hohe Zelldichten erzielt werden. Aus diesem Grund wird die Produktivität von Photobioreaktoren durch den Lichteintrag bestimmt [59]. Die Struktur von Photobioreaktoren spielt eine große Rolle bei der Produktion von Mikroalgen. Photobioreaktoren sind meistens aus Glas hergestellt, damit die Zellen gut beleuchtet werden können. Diese Photobioreaktoren ermöglichen durch transparente Reaktorwände einen Lichteintrag in die Kulturbrühe. In gewöhnlichen Edelstahlreaktoren werden Kultivierungen von Mikroalgen nicht durchgeführt. Folgende Faktoren, die auf den Lichteintrag in die Zellen einen Einfluss haben, sind im Folgenden erläutert:

- Zelldichte im Photobioreaktor
- Optische Eigenschaften der Zellen
- Länge des Lichtweges
- Geschwindigkeiten der Strömung im Photobioreaktor

Die Schichtdicke im PBR wird möglichst gering gehalten, damit die Zellen bei möglichst hoher Dichte weiterhin ausreichend beleuchtet werden können. Sobald eine sehr hohe Zelldichte im PBR erreicht wird, werden die Photonen, vor allem von den Mikroalgenzellen, die der Beleuchtungseinheit nahe stehen, absorbiert. Mikroalgenzellen, die weiter entfernt von der Beleuchtungseinheit stehen, werden unter Umständen nicht ausreichend versorgt. Das Licht ist also ein wachstumslimitierender Faktor. Gute Durchmischung im Photobioreaktor ist daher eine Voraussetzung sowohl zur ausreichenden Belichtung aller Mikroalgenzellen als auch zur homogenen Temperaturverteilung im PBR, so dass sich keine Zellen für längere Zeit in der Nähe der Lichtquelle befinden und so überhitzen.

In Deutschland steht die größte Mikroalgen-Produktionsanlage in Klötze, dargestellt in Abbildung 2.14. In einem 1,2 ha großen Gewächshaus werden dort Mikroalgen (*Chlorella vulgaris*) in einem 500 km langen Glasrohrsystem kultiviert. In dieser Anlage wird jährlich ca. 100 t trockene Biomasse produziert. Die produzierte Biomasse wird als Nahrungsergänzungsmittel verwendet [60].

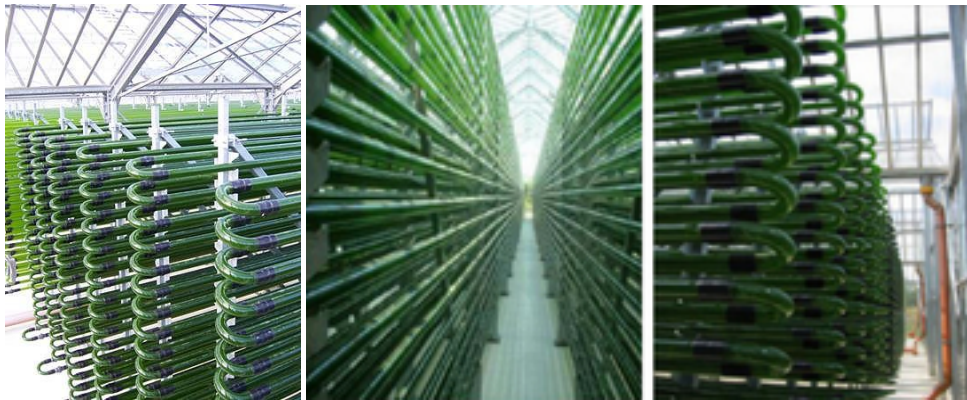


Abbildung 2.14: Geschlossene Mikroalgenproduktionsanlage im Gewächshaus in Klötze [60].

Es gibt eine Vielzahl an Variationen im Design und der Auslegung von Photobioreaktoren bezüglich Struktur und Geometrie, je nach Zweck und Größe. Unterschiedliche Photobioreaktormodelle werden im Folgenden ausführlich dargestellt.

2.4.2. Arten von Photobioreaktoren

Die Photobioreaktoren, die bisher entwickelt wurden, weisen drei unterschiedliche Formen auf und sind auf dem Markt erhältlich. Die Photobioreaktorarten werden im Folgenden ausführlich erklärt.

2.4.2.1. Tubuläre Photobioreaktoren

Tubuläre PBR-Typen sind sehr geeignet für die Outdoor-Kultivierungen von Algen. Die PBR-Rohren werden aus Kunststoff oder aus Glas hergestellt. Das Kultivierungsmedium wird entweder mit Hilfe einer Pumpe oder mit einem Airlift-System im Kreis gepumpt. Tubuläre Photobioreaktoren (Abbildung 2.15) besitzen eine große Oberfläche für die Beleuchtung und

können im Freien oder in einem Gewächshaus installiert werden, wo sie mit Sonnenlicht beleuchtet werden. Künstliche Beleuchtung wird bei diesen PBR-Typen im Outdoor-Einsatz aus ökonomischen Gründen nicht verwendet.

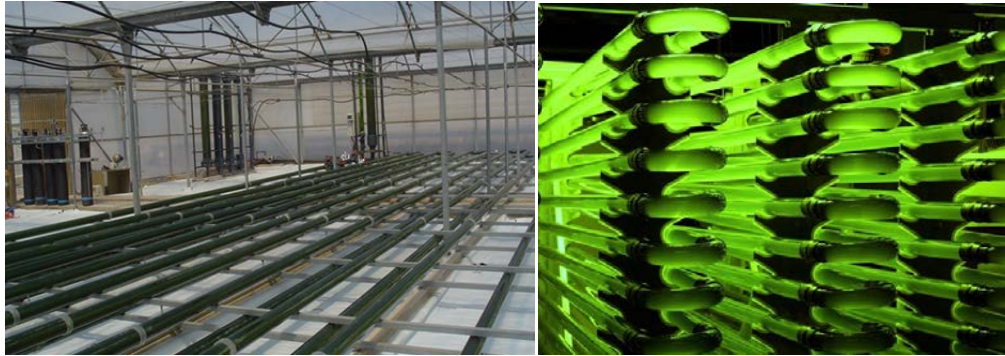


Abbildung 2.15: Tubuläre Photobioreaktoren [55].

Diese Photobioreaktoren sind relativ preiswert und die Installation ist unkompliziert. Gradienten bei der Temperatur, pH-Wert, O_2 - und CO_2 -Konzentration können beim Aufskalieren zum Problem werden. Ein Bewuchs der Reaktorwände mit Mikroalgenzellen kann durch Beschichtung der Wände gemindert werden, wobei die Kosten dafür hoch sind. Die Durchmesser der Rohre sollten nicht zu groß gewählt werden, da sonst die Lichtintensität im Inneren der Rohre zu stark abnimmt. Die Sterilisation wird bei dem tubulären PBR leicht durchgeführt. Die Gaseinleitung wurde nicht bei dem tubulären Photobioreaktor vorgestellt.

2.4.2.2. Vertikale Säulen-Photobioreaktoren

Vertikale Säulen-Photobioreaktoren können in unterschiedlichen Formen entworfen werden. Sie sind mit mechanischer Durchmischung oder einem Airlift-System sehr kompakt. Die Reinigung und die Sterilisierung sind einfach durchzuführen. Die Herstellung der vertikalen Säulen-Photobioreaktoren ist leicht und kostengünstig. Im Vergleich zu tubulären Photobioreaktoren weisen die vertikalen Säulen-Photobioreaktoren gute Gasaustauschwerte auf. Die Oberfläche für die Beleuchtung ist aber gering und sie sind für die Outdoor-Kultivierung nicht so gut geeignet, weil bei hoher Zelldichte eine starke Schattierung der Reaktoren auftritt. Bei der Indoor-Kultivierung kann dieses Problem durch die Wahl der Beleuchtungseinheiten teilweise

beseitigt werden. Abbildung 2.16 zeigt vertikale Säulen-Photobioreaktoren für Indoor- und Outdoor Anwendungen.



Abbildung 2.16: Photobioreaktoren in einer Versuchsanlage zur Sequestrierung von CO₂ aus Kraftwerk- Abgasen [61] und [62].

2.4.2.3. Flache Photobioreaktoren

Bei flachen Photobioreaktoren ist die Akkumulation von gelöstem Sauerstoff im Vergleich zu horizontalen röhrenförmigen Photobioreaktoren relativ gering. Mit flachen Platten-Photobioreaktoren kann eine hohe Photosynthese-Effizienz erreicht werden [59]. Für dieses System ist eine starke Pumpe nicht notwendig [33, 59], weil durch die Begasung eine turbulente Strömung im System entsteht, die eine für hohe Effizienz notwendige Voraussetzung ist [59a]. Beim Kunststoff als Baumaterial sind die Wiederverwendbarkeit, die Sterilisierung und die Reinigung problembehaftet. Des Weiteren sind die Photobioreaktoren manchmal undicht. Flach-Photobioreaktoren sind sowohl für die Indoor- als auch für Outdoor-Massenkultivierungen geeignet, wobei im Indoor-Betrieb die Beleuchtungseinheit kostenaufwändig ist [33]. Bilder von unterschiedlichen Flach-Photobioreaktoren sind in Abbildung 2.17 gezeigt.



Abbildung 2.17: Flache Photobioreaktoren [63] und [64].

In Tabelle 2.6 werden die Vor- und Nachteile von Kunststoff und Glas als Konstruktionsmaterial für Photobioreaktoren verglichen.

Tabelle 2.6: Vergleich von Glas- und Kunststoffphotobioreaktoren.

Parameter	Kunststoffphotobioreaktoren	Glasphotobioreaktoren
Gesamtkosteneffizienz	- gering (aufgrund kurzer Lebensdauer)	- hohe Lebensdauer
Lebensdauer	- geringe UV- und O ₂ Beständigkeit	- hohe UV- und O ₂ Beständigkeit
Chemische Eigenschaften	- geringe chem. Beständigkeit gegen Lösungs- und Reinigungsmittel	- hohe chem. Beständigkeit gegen alle Arten von Chemikalien
Sterilisationstemperatur	- unter 100 °C	- bis zu 450 °C
Reinigung	- die meisten Standard-Reinigungsmittel wie Alkohol oder Aceton können nicht verwendet werden	- alle Standard-Reinigungsmittel können verwendet werden

3. Ergebnisse und Diskussion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Kultivierung unterschiedlicher Mikroalgenstämme mit unterschiedlichen Morphologien sowie in der Überwachung des Kultivierungsprozesses mittels Durchflussmikroskop. Dazu wurde zunächst ein Photobioreaktorsystem entwickelt und charakterisiert. Des Weiteren wurde ein früher entwickeltes [4, 43, 44, 45] geeignetes Durchflussmikroskop (Abschnitt 2.3) eingesetzt und das gesamte System wurde an das Kultivierungssystem von verschiedenen Mikroalgen angepasst [65]. Durch die Kultivierung von Mikroalgen mit unterschiedlicher Morphologie wurde der Anwendungs- und Optimierungsbereich der Durchflusszelle möglichst breit gehalten, damit die Grenzbedingungen für den Einsatz vom entwickelten System in Bezug auf Mikroalgen mit verschiedener Morphologie und Zellgröße bestimmt werden.

Zunächst wird in Abschnitt 3.1 Entwicklung und Charakterisierung des Photobioreaktors ausführlich beschrieben. Für die Durchführung und Überwachung der Mikroalgenkultivierungen wird ein spezielles Reaktorsystem angefertigt und charakterisiert. Für einen erfolgreichen Einsatz des Photobioreaktors ist die reaktionstechnische Charakterisierung des entwickelten Systems sinnvoll. Zudem werden grundlegende technische Daten für das Photobioreaktorsystem ermittelt.

Ab dem Abschnitt 3.2 werden die Kultivierungen der gewählten Mikroalgenstämmen (*C. reinhardtii*, *C. vulgaris*, *H. pluvialis*, *N. oculata*, *P. tricornutum* und *S. platensis*) im Schüttelkolben und im Photobioreaktor mit verschiedenen Kultivierungsbedingungen erläutert. Die Photobioreaktorkultivierungen werden mit Durchflussmikroskop online überwacht und die online aufgenommenen Bilder ausgewertet. Bei der Wahl der kultivierten Mikroalgenstämme spielen die Morphologie, die Produktivität, technische und industrielle Anwendungen eine große Rolle. Durch die Kultivierungen verschiedener Mikroalgen mit unterschiedlicher Morphologie wird die Anwendbarkeit des Durchflussmikroskops an verschiedene Mikroalgen betrachtet, damit die Beschränkungen des Systems ermittelt werden.

3.1. Entwicklung und Charakterisierung des Photobioreaktors

Mikroalgen betreiben Photosynthese und brauchen zum Wachstum CO₂ und Licht. Wegen der Lichtversorgung der Zellen werden die Mikroalgen nicht in Stahlreaktoren, sondern in

lichtdurchlässigen Photobioreaktorsystemen kultiviert. Für die Kultivierung der Mikroalgen wurde aus den genannten Gründen (Tabelle 2.6) Glas als Material für das Photobioreaktorsystem gewählt. Aufgrund der direkten Abhängigkeit der Produktivität von der Lichtausbeute wurde eine innenliegende zentrierte Beleuchtungseinheit realisiert, die eine maximale Ausnutzung der eingestrahlt Lichtenergie ermöglicht [66, 67]. Von innen beleuchtete Photobioreaktoren erreichen im Allgemeinen höhere photosynthetische Effizienz als Blasensäulen- oder Airlift-Reaktoren [68]. Ihre volumetrische und spezifische Biomasse-Produktivität ist vergleichbar zu der von Blasensäulenreaktoren, aber bei signifikant niedrigeren Begasungsraten (als Gasvolumendurchsatz pro Kulturvolumen und Minute) [69].

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Reaktorsystem zur Kultivierung unterschiedlicher Mikroalgenstämme besteht aus zwei Glasrohren (Glasmodulen) und einem Ausgleichsgefäß (rundes Gefäß mit vielen Sensoren, siehe Abbildung 3.2) zur Adaption weiterer prozessanalytischer Sonden, wie Temperatur, pO_2 , pH und CO_2 im Abgas. Das Kulturmedium wird in den Glasrohren durch Leuchtstoffröhren (Osram, 13 W, 640, Universalweiß) beleuchtet. Die Leuchtstoffröhren sind im Inneren der Glasrohren platziert. Das Ziel der mittigen Platzierung besteht darin, die Zellen gleichmäßig zu beleuchten und die Wärmeenergie im Reaktor zu halten. In Abbildung 3.1 a sind die beiden Glasrohre und das Ausgleichsgefäß dargestellt.

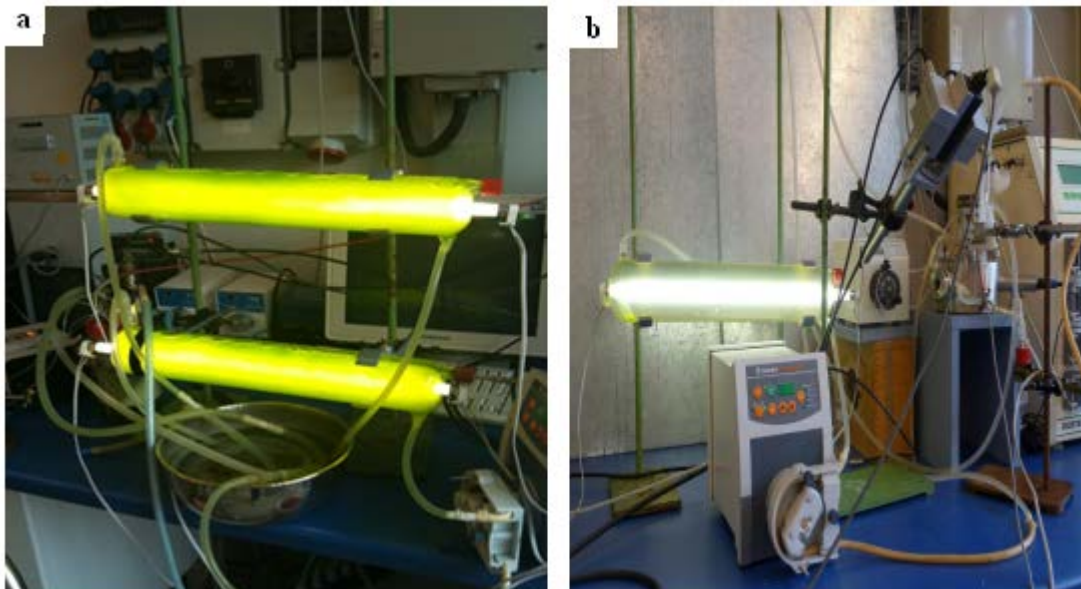


Abbildung 3.1: a) Das gesamte Reaktorsystem mit beiden Glasreaktoren und Ausgleichsgefäß während einer Kultivierung von *Chlamydomonas reinhardtii*. b) Das Reaktorsystem mit einem Glasreaktor und Ausgleichsgefäß während einer Kultivierung von *Chlorella vulgaris*.

Die Photobioreaktoren können nicht mit beliebig großem Durchmesser gebaut werden, weil bei hoher Zelldichte die Beleuchtung der innenliegenden Zellen nicht mehr möglich ist. Die Länge von einem Glasrohr beträgt 45 cm, der Innendurchmesser zur Platzierung der Leuchtstoffröhre ist 2,4 cm und der Aussendurchmesser ist 8 cm. Die Wellenlänge und die Lichtintensität-Messungen der Leuchtstoffröhre werden im Abschnitt 3.1.4 ausführlich erläutert. Daraus resultiert, inklusive Ausgleichsgefäß (siehe Abbildung 3.2), ein Gesamtreaktorvolumen von 4 L. Die Reaktorelemente sind über entsprechende Anschlüsse mit Schläuchen verbunden. Mittels einer Peristaltikpumpe wird das Kulturmedium kontinuierlich im Kreis gepumpt, wodurch eine gleichmäßige Beleuchtung und eine gleichmäßige Temperaturverteilung im Photobioreaktorsystem erzielt wird. Durch den kontinuierlichen Kreislauf wird die Sedimentation der Zellen verhindert und die Kulturbrühe nahezu homogen gehalten.

In der folgenden Abbildung 3.2 ist das gesamte Photobioreaktorsystem inkl. Durchflussmikroskop, welches über einen Bypass an das System angeschlossen ist, dargestellt. Über die Vorlage wird das unsterile Kulturmedium mithilfe einer Peristaltikpumpe durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,2 μm) in das System gefüllt. Im Ausgleichsgefäß werden ein Temperatursensor, eine pH-Elektrode, ein Rührer und die Anschlüsse für den Photobioreaktor und das Durchflussmikroskop untergebracht. Der Rührer im Ausgleichsgefäß sorgt für eine homogene Durchmischung. Durch die spezielle Konstruktion der Rührblätter wird kein Scherstress auf die Mikroalgenzellen ausgeübt. Das gesamte System wird über das Ausgleichsgefäß begast, welches gleichzeitig auch zum Druckausgleich dient. Das Kulturmedium wird mithilfe einer kleinen peristaltischen Pumpe in die Messzone des Durchflussmikroskops geschickt und anschließend ohne Volumenverlust in das System zurückbefördert.

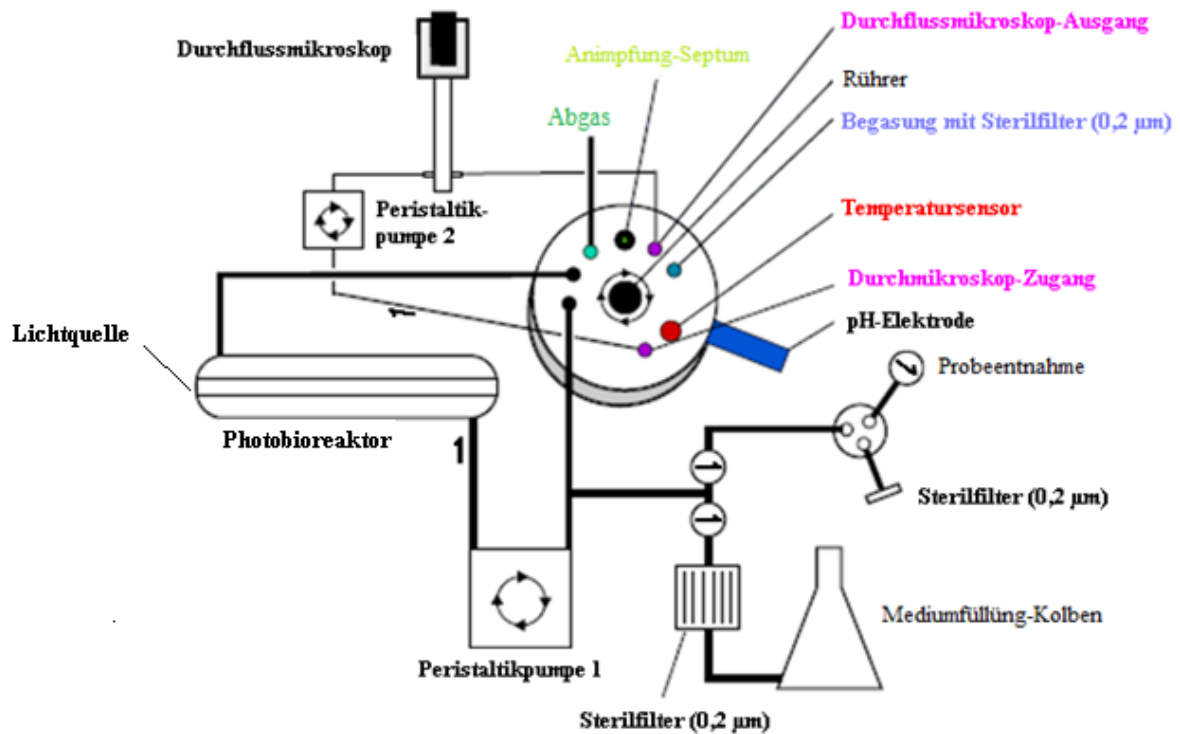


Abbildung 3.2: Gesamtes Photobioreaktorsystem inkl. Durchflussmikroskop. Rechts oben ist das Ausgleichsgefäß mit den Begasungs- und Messstellen abgebildet.

Für eine erfolgreiche Verwendung des Photobioreaktorsystems ist eine reaktionstechnische Charakterisierung des entwickelten Systems notwendig. Dafür werden grundlegende reaktor-technische Daten und Kennzahlen für das System ermittelt. Um Aussagen über die Durchmischung und die Verweilzeit im Reaktor treffen zu können, wurden Messungen zur Bestimmung der Verweilzeit und des Durchmischungsverhalten bei unterschiedlichen Pumpgeschwindigkeiten durchgeführt. Um den Wärmeübergang des Systems und den Wärmeeffekt der Leuchtstoffröhre zu ermitteln, wurde die Temperaturverteilung in dem Photobioreaktorsystem überwacht. Ein weiterer wichtiger Faktor zur Charakterisierung des Photobioreaktorsystems ist der durch den $k_L a$ -Wert beschriebene Sauerstoffeintrag in das System und der aus den Daten einer modifizierten Messmethode (Sulfit-Methode) berechnet wird. Zuletzt werden die Lichtintensitätsmessungen des Belichtungssystems durchgeführt.

Die Messungen wurden für die einzelnen Reaktorteile sowie für das Komplettsystem bei unterschiedlichen Pumpgeschwindigkeiten durchgeführt. Mit den daraus erhaltenen Ergebnissen wird das entwickelte System evaluiert, wie weit das Photobioreaktorsystem in unterschiedlichen Mikroalgenkultivierungen eingesetzt werden kann.

3.1.1. Bestimmung der Durchmischung im Photobioreaktor

Die Durchmischungsmessung ist für die Reaktorcharakterisierung wichtig. So wird die Bestimmung der Durchmischung und Verweilzeit meistens als erster Schritt bei der reaktortechnischen Charakterisierung durchgeführt. Die Zeit, die in einem Reaktor benötigt wird, bis eine Substanz eine gleichmäßige Verteilung erreicht hat, wird als Durchmischungszeit bezeichnet. Für die Bestimmung des Durchmischungsverhaltens wird das gesamte Volumen im geschlossenen System zirkulär gepumpt. Mithilfe der Durchmischungsmessungen werden Informationen erhalten, wie sich die Teilchen im Photobioreaktor verhalten. Für die Messung der Durchmischung in einem Reaktorsystem gibt es unterschiedliche Methoden; in dieser Arbeit wurden die Veränderungen der Leitfähigkeit gemessen. Die Leitfähigkeit wurde durch eine im System installierte Leitfähigkeitssonde (Tetra Con 325, Nova Analytics Deutschland GmbH und Co. KG, Weilheim) verfolgt. Die Durchmischung lässt sich anhand der Konzentrationsänderungen im Photobioreaktorsystem gut darstellen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Tracer-Zugabe. Meistens werden das Stufensignal und das Impulssignal verwendet. Die Bestimmung der optimalen Durchmischung erfolgte durch Zugabe eines Impulssignals. Als Tracer wurde 1 mL einer 0,02 M KNO_3 -Lösung injiziert. Die Zugabe des Tracers zur Erzeugung des Impulssignals im Photobioreaktorsystem soll möglichst schnell erfolgen. Danach wird der Konzentrationsverlauf in Abhängigkeit der Zeit gemessen.

Die Experimente wurden zunächst für einen Glasreaktor mit einem Ausgleichsgefäß und einem Gesamtvolumen von 2,3 L durchgeführt. In Abbildung 3.3 ist der Verlauf der Durchmischungen bei unterschiedlichen Pumpgeschwindigkeiten (60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 und 200 rpm) wiedergegeben.

Zur besseren Übersicht ist in Abbildung 3.3 die maximal benötigte Zeit für eine homogene Durchmischung dargestellt. Im Reaktorsystem ist eine homogene Durchmischung erreicht, sobald nach dem Kurvenmaximum der einzelnen Pumpgeschwindigkeiten eine Abweichung von weniger als 10 % des Endwertes der Leitfähigkeit vorliegt.

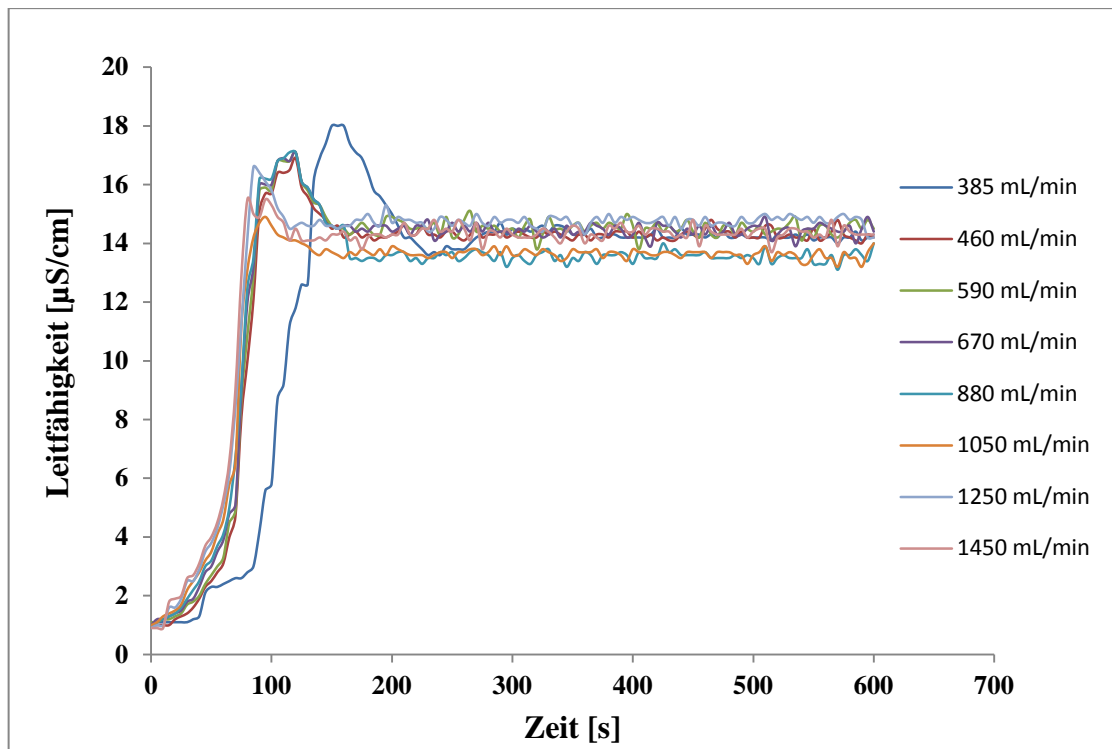


Abbildung 3.3: Experimentell ermittelte Durchmischungszeiten durch Zugabe eines Impulssignals bei unterschiedlichen Pumpgeschwindigkeiten.

Anhand der durchgeführten Durchmischungsexperimente wird ersichtlich, dass bei einem Volumenstrom von $880 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (140 rpm) eine homogene Durchmischung nach 140 s erreicht wird. Auch bei Erhöhung der Pumpgeschwindigkeit bleibt dieser Wert konstant.

Die zur Erreichung einer homogenen Lösung benötigte Zeit ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Wie in der Abbildung zu sehen ist, erreicht die Durchmischungszeit ab $880 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ Volumenstrom einen konstanten Wert von 140 s (gelb markiert) und ist bei weiterer Volumenstromsteigerung von dem Volumenstrom unabhängig.

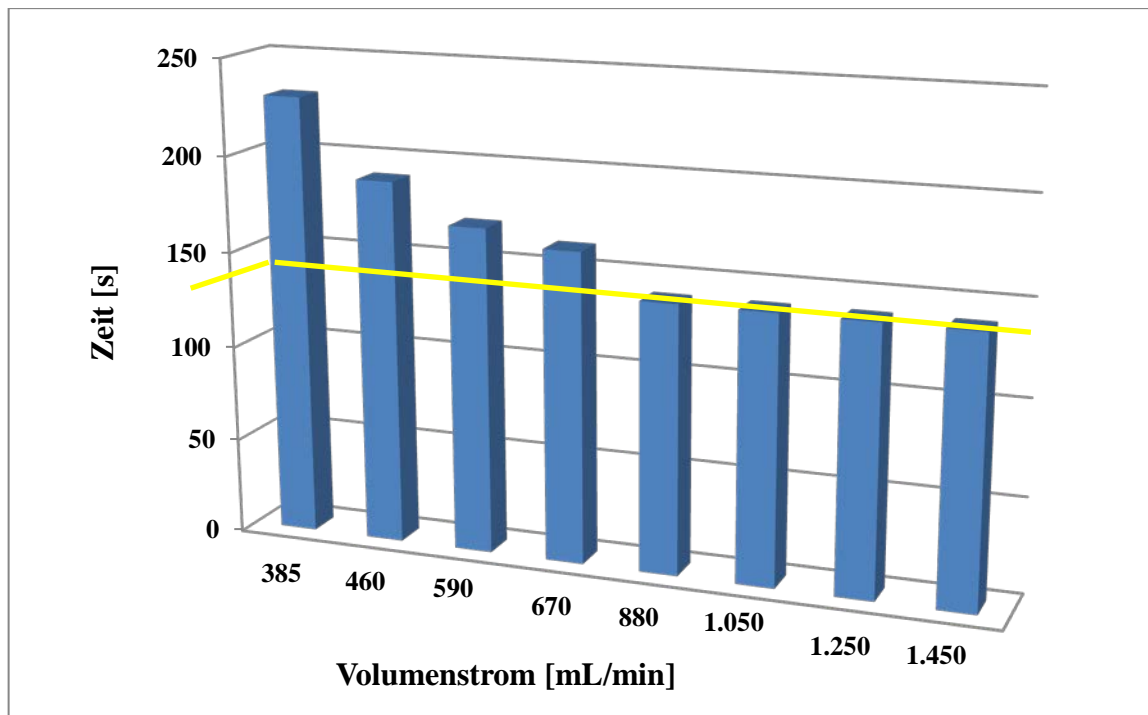


Abbildung 3.4: Benötigte Zeit zum Erreichen einer homogenen Durchmischung in Abhängigkeit des Volumenstroms für einen Glasreaktor und ein Ausgleichsgefäß.

Da in dieser Arbeit auch Kultivierungen mit zwei Glasreaktormodulen und einem Ausgleichsgefäß durchgeführt werden sollen, wurden die Durchmischungsmessungen mit diesem erweiterten Reaktorsystem wiederholt. Das Volumen des Systems erhöht sich bei diesem Versuch von 2,3 L auf 4 L. Die verwendete Tracermenge (KNO_3 -Lösung) bleibt bei 1 mL.

Die Durchmischungszeit bis zur Homogenität erhöht sich, da das Volumen des Reaktorsystems größer geworden ist (Abbildung 3.5). Die homogene Durchmischungszeit beträgt für den Volumenstrom $880 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 160 s und bleibt bei Erhöhung der Pumpgeschwindigkeit wiederum konstant.

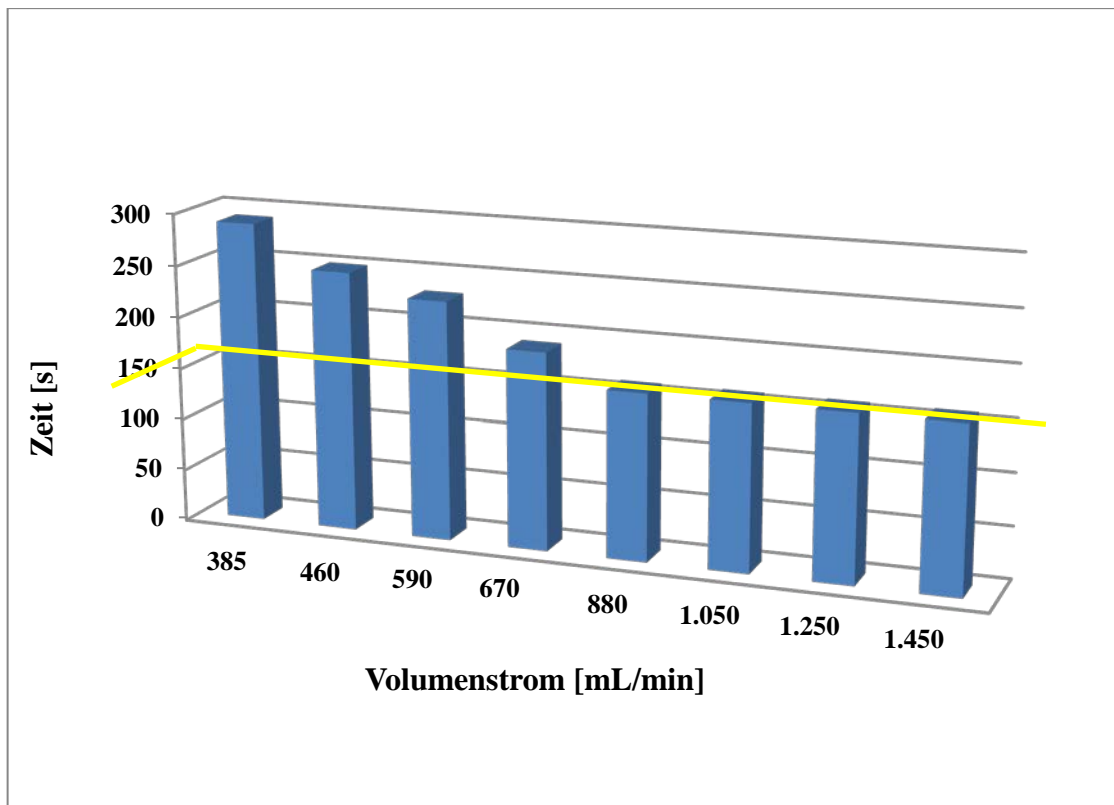


Abbildung 3.5: Durchmischungszeit in Abhängigkeit des Volumenstroms für das erweiterte Reaktorsystem (zwei Glasmodulen und ein Ausgleichsgefäß).

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass dieses Photobioreaktorsystem (sowohl mit einem Glasmodul als auch mit zwei Glasmodulen) eine schnelle Durchmischung (140 s und 160 s) erzielt. Diese schnelle Durchmischung wurde durch die Konstruktion des Photobioreaktors erreicht, weil durch die Anschlüsse (an der die Reaktormodule über Silikonschläuche miteinander angeschlossen wurde (Abbildung 3.1)) eine gute turbulente Strömung ermöglicht wurde. Der Rührer im Ausgleichsgefäß half auch bei der schnellen Durchmischung, weil die Lösung durch den Rührer schneller homogen gemischt wurde.

3.1.2. Bestimmung der Verweilzeit im Photobioreaktor

Die hydrodynamische Verweilzeit spielt bei der Charakterisierung reaktionstechnischer Kenngrößen ebenfalls eine wichtige Rolle. Die Verweilzeit ist die Aufenthaltszeit, die ein Volumenelement in einem Reaktor verbraucht hat. Bei der Verweilzeitverteilung wird das Reaktorvolumen nicht zirkulär gepumpt, sondern linear gepumpt. Die Verweilzeit τ hat eine große Bedeutung und ist von Reaktor zu Reaktor sehr unterschiedlich. Bei idealen Reaktoren,

unter Annahme konstanter Volumenströme und keiner Volumenänderung während der Reaktion, wird die Verweilzeit mit folgender Formel berechnet:

Formel 3.1: Verweilzeit

$$\tau = \frac{V_g}{\dot{V}}$$

τ = Verweilzeit

V_g = Gesamtvolumen

\dot{V} = Volumenstrom

Die Verweilzeitverteilung wird allgemein mit unterschiedlichen Methoden bestimmt, in dieser Arbeit wurde, wie beim Durchmischungsverhalten, die Leitfähigkeitsänderung unter Verwendung eines Impulssignals gemessen. Als Tracer wurde, wie bei den Durchmischungsmessungen, 1 mL einer 0,02 M KNO_3 -Lösung verwendet und der Konzentrationsverlauf in Abhängigkeit der Zeit gemessen.

Zunächst wurden die Experimente wieder für einen Glasreaktor mit Ausgleichsgefäß durchgeführt. In Abbildung 3.6 sind die Ergebnisse für 8 verschiedene Pumpgeschwindigkeiten (60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 und 200 rpm) dargestellt, die Volumenströme von 385, 460, 590, 670, 880, 1.050, 1250 und 1.450 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ entsprechen. Aus dem Antwortsignal wurde die Verweilzeitdichtefunktion $E(\Theta)$ abgeleitet.

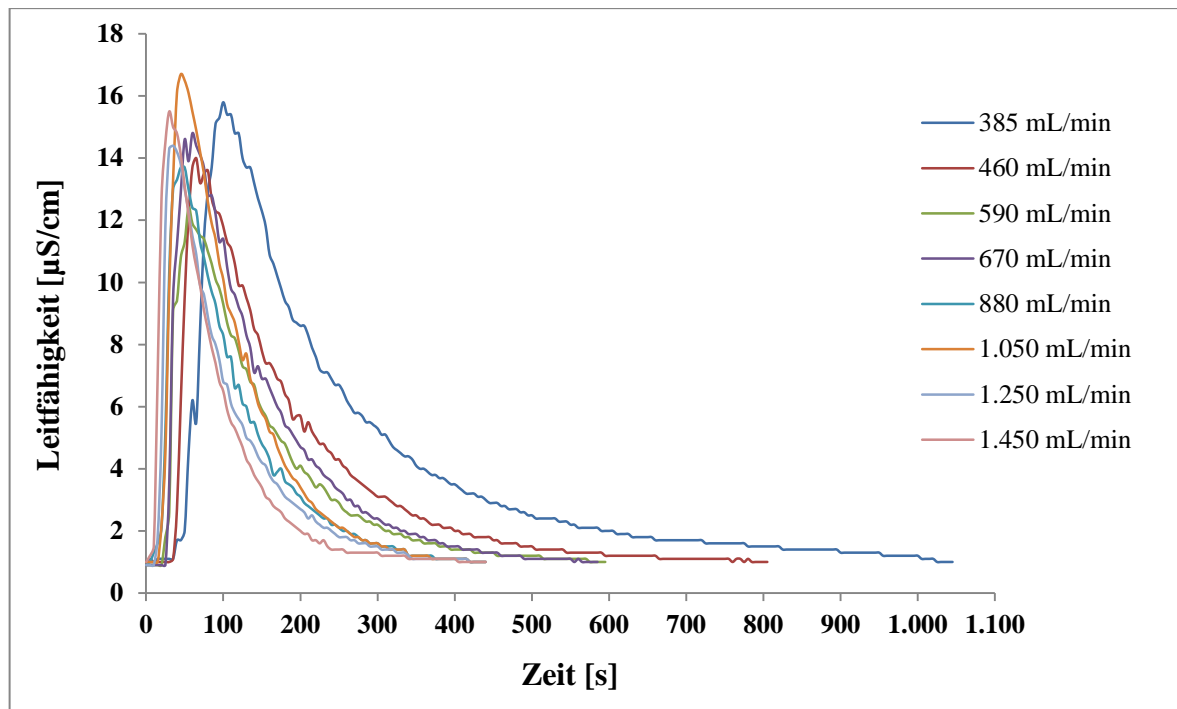


Abbildung 3.6: Experimentell ermittelte Verweilzeitverteilung durch Zugabe eines Impulssignals in einem Glasreaktor mit Ausgleichsgefäß (gesamtes Volumen 2,3 L) bei unterschiedlichen Pumpgeschwindigkeiten. Als Tracer wird 1 mL einer 0,02 M KNO_3 injiziert. Die Änderung der Leitfähigkeit wird mit der Leitfähigkeitselektrode Tetra Con 325 (Nova Analytics Deutschland GmbH und Co. KG, Weilheim) am Reaktorausgang gemessen.

Bei den Ergebnissen ist festzuhalten, dass im Photobioreaktorsystem die Variation der Pumpgeschwindigkeit zwischen 880-1.450 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ keinen bedeutsamen Einfluss auf die Verweilzeitverteilung zeigt. Aufgrund der experimentell bestimmten Daten wurde für die Kultivierungsprozesse der Mikroalgen ein Volumenstrom von 880 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ gewählt. Die Erhöhung der Pumpgeschwindigkeit bzw. des Volumenstroms ändert die Zeit, in der die Anfangswerte der Leitfähigkeit wieder erreicht wurden, nicht; nach 400 s haben alle Teilchen das System wieder verlassen. Das gesamte Volumen betrug für diese Messung 2.300 mL. Nach Formel 3.1 berechnete Verweilzeit für jeweilige Volumenströme (385, 460, 590, 670, 880, 1.050, 1.250 und 1.450 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) sind 6, 5, 3,90, 3,43, 2,61, 2,19, 1,84 und 1,59 min.

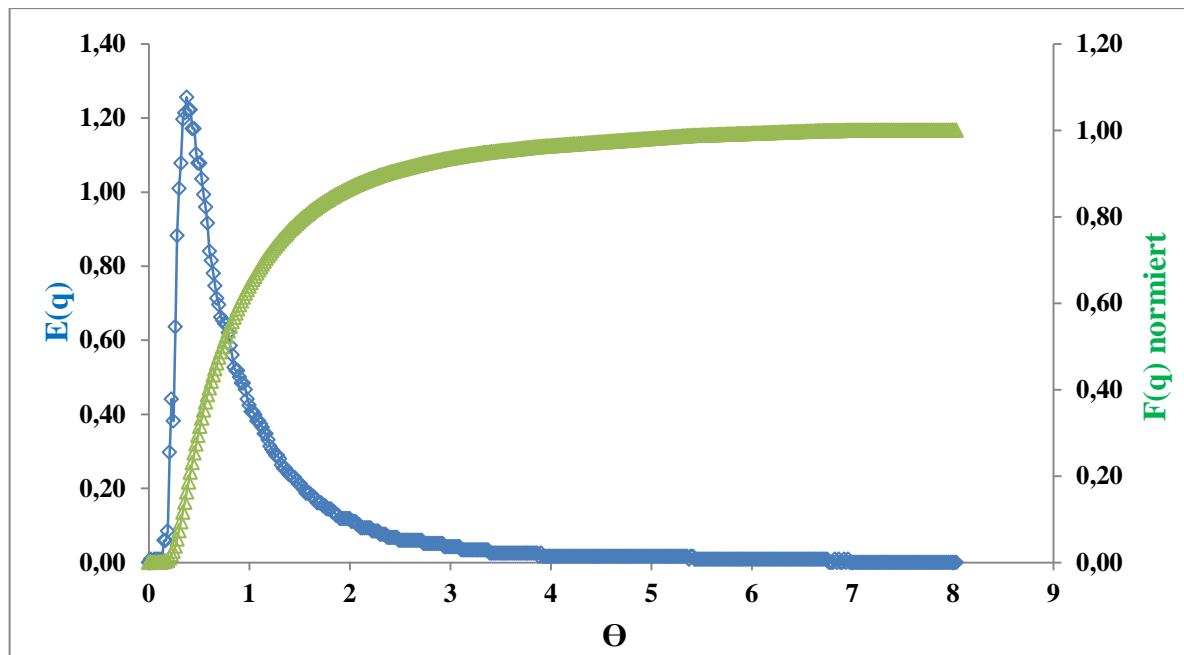


Abbildung 3.7: Experimentell ermittelte Verweilzeitdichtefunktion $E(\Theta)$ durch Zugabe eines Impulssignals sowie die theoretisch berechnete Verweilzeitsummenfunktion $F(\Theta)$ mit einem Glasreaktormodul und Ausgleichsgefäß bei $880 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ Volumenstrom (Pumpengeschwindigkeit 140 rpm). Als Tracer wird 1 mL einer 0,02 molaren KNO_3 injiziert. Die Änderung der Leitfähigkeit wird mit der Leitfähigkeitselektrode am Reaktorausgang gemessen.

Aus dem Antwortsignal des Impulssignals lässt sich die Verweilzeitdichtefunktion $E(\Theta)$ ableiten. Abbildung 3.7 zeigt die experimentell bestimmte Verweilzeitdichtefunktion $E(\Theta)$ sowie die daraus berechnete Verweilzeitsummenfunktion $F(\Theta)$ für den Photobioreaktor mit einem Glasreaktormodul und Ausgleichsgefäß bei einer Rührgeschwindigkeit von 140 rpm. Durch die kalkulierten Daten lässt sich festhalten, dass sich der Photobioreaktor mit einem Glasreaktormodul und Ausgleichsgefäß reaktionstechnisch nahezu wie ein kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor verhält.

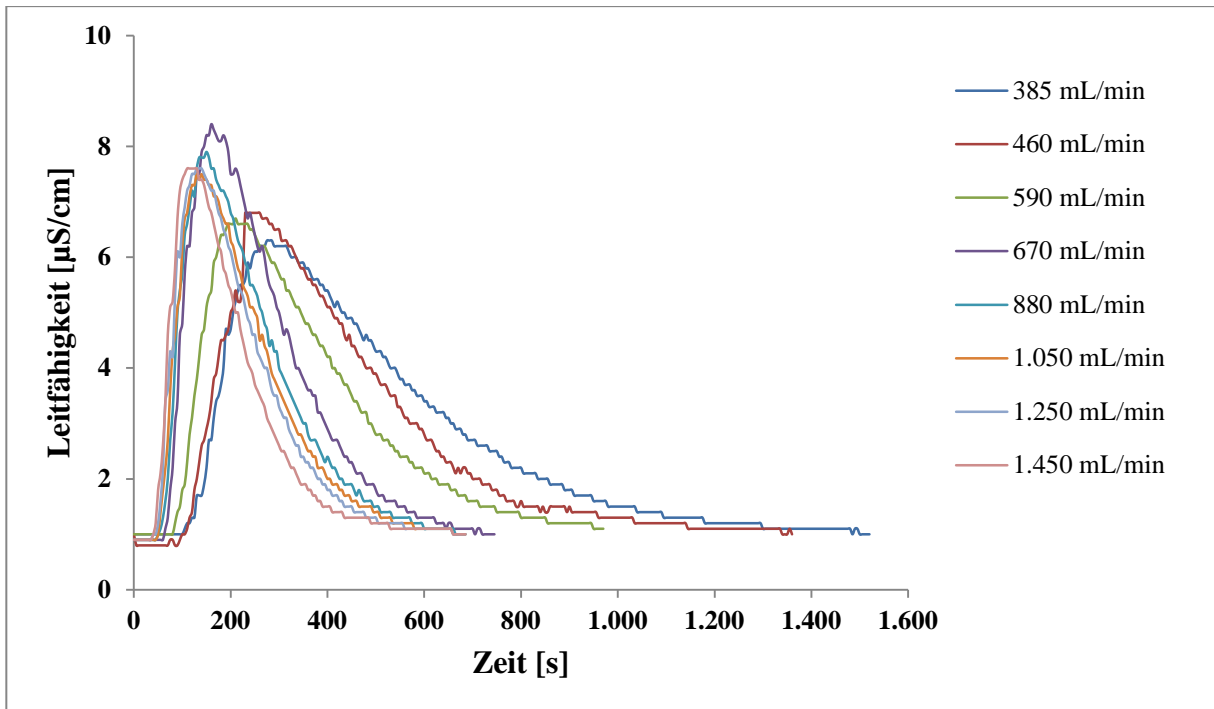


Abbildung 3.8: Experimentell ermittelte Verweilzeitverteilung durch Zugabe eines Impulssignals mit zwei Glasreaktoren und Ausgleichsgefäß (gesamtes Volumen 4 L) bei unterschiedlichen Pumpengeschwindigkeiten. Als Tracer wird 1 mL einer 0,02 molaren KNO_3 injiziert. Die Änderung der Leitfähigkeit wird mit der Leitfähigkeitselektrode Tetra Con 325 (Nova Analytics Deutschland GmbH und Co. KG, Weilheim) am Reaktorausgang gemessen.

In Abbildung 3.8 sind die Verweilzeitergebnisse für das gesamte Reaktorsystem (zwei Glasreaktormodulen mit Ausgleichsgefäß) dargestellt. Durch das steigende Volumen werden bei gleichem Tracersignal niedrigere Leitfähigkeitswerte gemessen worden, weil sich das Volumen des gesamten Reaktorsystem vergrößert hat. Diese Volumenvergrößerung hatte direkten Einfluss auf die Leitfähigkeit und die Zeit, in der die homogene Mischung erreicht wurde. Das Volumen des gesamten Reaktorsystems beträgt 4.000 mL. Nach Formel 3.1 berechnete Verweilzeit für jeweilige Volumenströme (385, 460, 590, 670, 880, 1.050, 1.250 und 1.450 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) sind 10,4, 8,7, 6,78, 5,97, 4,55, 3,81, 3,2 und 2,76 min.

3.1.3. Erstellung der Temperaturprofile im Photobioreaktor

Die konstante Temperatur im Photobioreaktor ist ein wichtiger Faktor bei der Charakterisierung von Reaktorsystemen, weil das Wachstum bei den Stämmen *C. reinhardtii*, *C. vulgaris*, *H. pluvialis*, *N. oculata* und *P. tricornutum* über 28 °C negativ beeinflusst wird. Daher ist es sinnvoll, den Wärmeübergang des Reaktorsystems zu charakterisieren und zu optimieren.

Schon durch sein grundlegendes Konstruktionsprinzip wurde das PBR für einen optimalen Lichteintrag und Wärmeübergang ausgelegt. Hierfür werden verschiedene Temperaturprofile für das Photobioreaktorsystem aufgenommen, die das Kühlungs- und Heizungsverhalten des gesamten Systems beschreiben.

Um die mögliche Temperaturerhöhung durch die Leuchtstoffröhre zu erfassen, wird an mehreren Stellen der Temperaturverlauf in Abhängigkeit der Zeit gemessen und somit ein Temperaturprofil des Reaktors erstellt. Die Temperaturmessungen wurden an drei unterschiedlichen Stellen im Photobioreaktorsystem durchgeführt: Im Ausgleichsgefäß mit einem Temperaturfühler, auf der Glasoberfläche des Photobioreaktors und schließlich die Raumtemperatur. Mit diesen Messungen wird untersucht, wie stark der Einfluss der Strahlung der Leuchtstoffröhre auf den zeitlichen Temperaturverlauf im Photobioreaktor ist. Die sechs unterschiedlichen, in dieser Arbeit kultivierten, Mikroalgenstämme zeigen unterschiedliche Temperaturoptima und Empfindlichkeit gegenüber höheren Kultivierungstemperaturen. Einige Stämme werden bei Raumtemperatur, einige bis maximal 25 °C und einige bei 30 °C kultiviert. Die passende Temperatur wird daher bei Kultivierungen mit einer Biostat B-Kontrolleinheit (Sartorius) über den Mantel des Ausgleichsgefäßes geregelt. Die Messungen zum zeitlichen Temperaturverlauf erfolgen ohne Mantelheizung und ohne Mantelkühlung. Abbildung 3.9 zeigt, wie sich die Beleuchtung mit der Leuchtstoffröhre auf die Temperatur des Photobioreaktorsystems auswirkt.

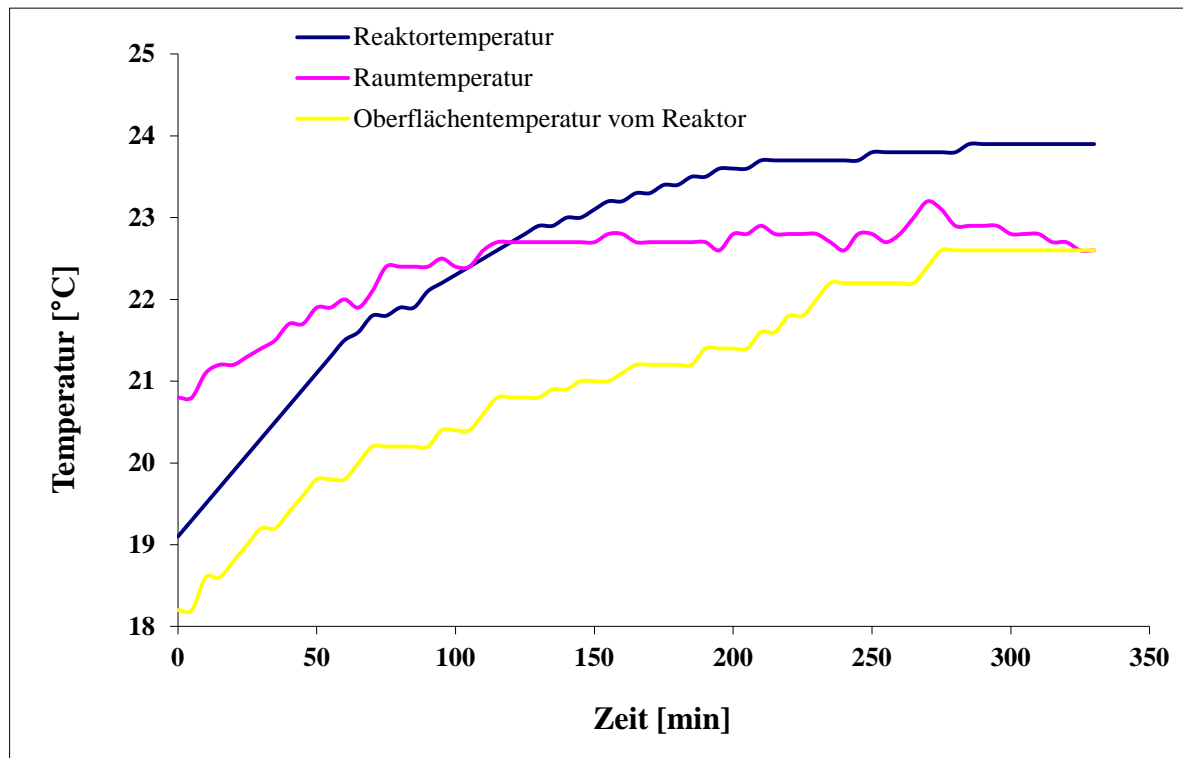


Abbildung 3.9: Zeitliche Temperaturprofile zur Charakterisierung des Wärmeübergangs für den Photobioreaktor. Die benutzte Pumpgeschwindigkeit beträgt 140 rpm (der Volumenstrom $880 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Die Glasoberflächentemperatur ist als gelbe Linie gekennzeichnet, die Innentemperatur im Reaktor mit blauer Linie und die Raumtemperatur mit rosa Linie.

Als Medium wurde deionisiertes Wasser verwendet. Die in der Abbildung 3.9 dargestellten Temperaturprofile entsprechen den Erwartungen. Die Leuchtstoffröhre hat einen messbaren Einfluss auf die Temperatur des gesamten Photobioreaktorsystems. Die Anfangsraumtemperatur betrug $21 \text{ }^\circ\text{C}$, die Reaktorinnentemperatur $19 \text{ }^\circ\text{C}$ und die Glasoberflächentemperatur des Reaktors $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Nach 6 h Messzeit wurde für die Raumtemperatur eine Temperaturerhöhung um $2 \text{ }^\circ\text{C}$, für den Reaktorinnenraum um $5 \text{ }^\circ\text{C}$ und für die Oberfläche des Reaktors um $4 \text{ }^\circ\text{C}$ festgestellt. Während der Messung erhöhte sich die Raumtemperatur durch äußere Einflüsse um $2 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Erhöhung der Reaktorinnenraumtemperatur liegt nicht nur an Leuchtstoffröhre, sondern auch an der Erhöhung der Raumtemperatur. Nachdem die Werte konstant blieben, wurde die Messung gestoppt. Durch diese Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die verwendete Leuchtstoffröhre auf die Temperaturzunahme einen Einfluss hat, der bei der Einstellung der Prozessbedingungen von Mikroalgenkultivierungen berücksichtigt werden muss, da die Leuchtstoffröhre das Medium unter diesen Bedingungen um mindestens $3 \text{ }^\circ\text{C}$ aufheizt. Die Temperatur wird während der Kultivierung über Temperaturfühler mithilfe einer Biostat-B-Kontrolleinheit (Sartorius) gemessen und bei einigen Kultivierungen (*C. reinhardtii* und *C.*

vulgaris) im bestimmten Bereich konstant gehalten. Die Kühlung des Photobioreaktors erfolgt über den Mantel des Ausgleichsgefäßes.

3.1.4. Messung der Lichtintensitäten im Photobioreaktor

Die Lichtintensität spielt bei der Mikroalgenkultivierung eine wichtige Rolle. Erhalten die Mikroalgenzellen nicht ausreichend Licht, so wird das Algenwachstum gehemmt. Hohe Lichtintensitäten dagegen sind für die Mikroalgenzellen schädlich (Photoinhibition). Um die richtige Beleuchtungsintensität wählen zu können, wurden Lichtintensitätsmessungen mit der Leuchtstoffröhre und dem gesamten Photobioreaktor durchgeführt.

Die Lichtintensität der photosynthetisch aktiven Lichtstrahlung im Bereich zwischen 400-700 nm wird mit der physikalischen Größe PAR (Photosynthetic Active Radiation, PAR, die Einheit $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.) beschrieben. Diese Größe charakterisiert den Wellenlängenbereich, den die Photosysteme phototropher Organismen effizient nutzen können. Leistungsmäßig entspricht sie 43 % der auf die Erde treffenden Lichtenergie.

Für die Messungen der Lichtintensität wurde ein Diodenarrayspektrometer, Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH mit 1024 Dioden und Messbereich 200-800 nm verwendet [70]. Das Licht wird über einen Gittermonochromator auf die Dioden spektral verteilt. Der Messabstand zwischen den Dioden beträgt 0,6 nm und die Halbwertsbreite 1,2 nm (Auflösung). Der Meßkopf ist eine Ulbrichtkugel mit Teflonbeschichtung. Die Eingangsöffnung des Meßkopfs war bei einer Messung direkt auf der Oberfläche der Leuchtstoffröhre oder auf der äußeren Reaktorwand befestigt.

Zuerst wurde die Lichtintensität direkt auf der Oberfläche der Leuchtstoffröhre gemessen, danach wurden die Lichtintensitäten auf der äußeren Reaktorwand mit leerem und mit wassergefülltem Photobioreaktor bestimmt. Die Lichtintensitäten auf der Leuchtstoffröhre (rosa Linie) und auf der Photobioreaktorwand mit leerem Photobioreaktor (gelbe Linie) sind in der Abbildung 3.10 dargestellt. Die Leuchtstoffröhre strahlt im Bereich 300-700 nm. Wie in Abbildung 3.10 dargestellt, die Lichtintensität auf der Photobioreaktorwand ist im gesamten Verlauf um etwa 40 % niedriger als die Lichtintensität auf der Leuchtstoffröhre, was zum überwiegenden Teil auf die größere Entfernung von der Lichtquelle und zum kleinen Teil auf die Lichtabsorption im Glas zurückzuführen ist.

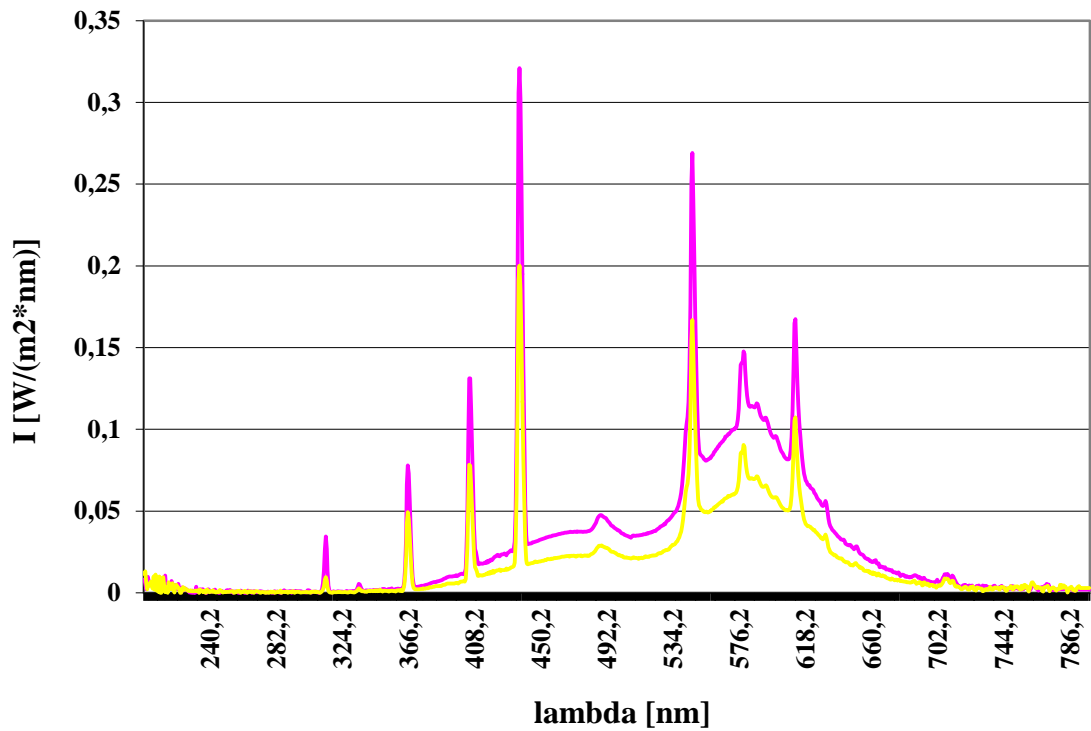


Abbildung 3.10: Lichtintensitäten auf der Oberfläche der Leuchtstoffröhre und auf der Oberfläche des leeren Photobioreaktors (rosa: Leuchtstoffröhre, gelb: Photobioreaktor).

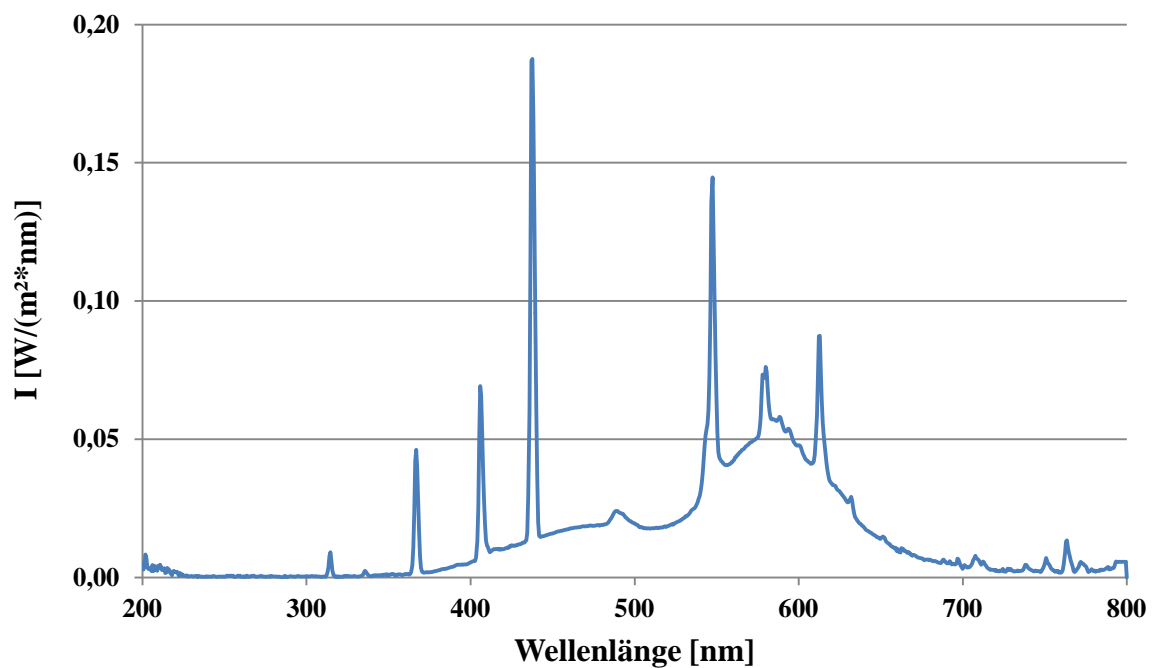


Abbildung 3.12: Lichtintensität auf der Oberfläche des mit bidestilliertem H_2O befüllten Photobioreaktor.

In der Abbildung 3.12 ist die Lichtintensität auf der Oberfläche des mit destilliertem Wasser befüllten Photobioreaktor dargestellt. Die Lichtintensität sinkt hier im Vergleich zum leeren Photobioreaktor um weitere etwa 10 %.

Die gemessene integrierte Lichtintensität für den PAR-Bereich (400-700 nm) beträgt für die Oberfläche der Leuchtstoffröhre $79 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, für die Oberfläche des leeren Photobioreaktors $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und für die Oberfläche des mit Wasser gefüllten Photobioreaktors $45 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, wenn man vom Umrechnungsfaktor 4.59 von $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ zu $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ für den verwendeten Leuchtstoffröhrentyp ausgeht [71].

Eine ausreichende Lichtversorgung der Mikroalgen ist also bei zentraler Belichtung zumindest am Anfang der Kultivierung auch an der Außenwand gewährleistet.

3.1.5. $K_L a$ -Wert-Bestimmung im Photobioreaktor

In einem Bioreaktor-System stellt die Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen einen wichtigen Parameter für das Zellwachstum dar. Ausreichende Sauerstoffversorgung und die Überwachung der Konzentrationsänderung während der Kultivierung ist unverzichtbar. In Bioreaktoren sollte die Sauerstoffkonzentration im Nährmedium bei aeroben Kultivierungsprozessen mindestens in der gleichen Größenordnung liegen wie die biologische Sauerstoffaufnahme.

Bei Mikroalgenkultivierungen hingegen muss die Versorgung der Zellen mit genügend CO_2 und die Entfernung des produzierten O_2 gewährleistet werden. Um die Gasversorgung im Photoreaktorsystem zu charakterisieren, wird unter Verwendung der Sulfit-Methode der $k_L a$ -Wert bestimmt. Eine 10 % Natriumsulfitlösung mit katalytischer Menge (10 μL) Cobalt (II)-Ionen ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) wird angesetzt und der Reaktor mit dieser Lösung aufgefüllt. Damit wird ein künstliches, sauerstoffverbrauchendes System erzeugt. Durch den in die Lösung transportierten und dann gelösten Sauerstoff werden Sulfit-Ionen zu Sulfat-Ionen oxidiert, wobei die Metallionen die Reaktion katalysieren. Die Bruttooxidationsreaktionsgleichung ist wie folgt:



Aus dem Zeitintervall zwischen dem Begasungsbeginn und dem Anstieg der Sauerstoffkonzentration auf annähernd 100 % der Saturation wird der $k_L a$ -Wert mit Hilfe der folgenden Formeln berechnet:

Formel 3.2: Formel für die OTR-Berechnung.

$$\text{OTR} = \frac{C_{\text{SO}_3}}{dt} * \frac{16}{126} * 1000$$

Formel 3.3: Formel für die $k_L a$ -Berechnung.

$$k_L a = \frac{\text{OTR}}{c^*}$$

$k_L a$	volumetrischer Sauerstofftransferkoeffizient	$[\text{h}^{-1}]$
C_{SO_3}	Konzentration von Na_2SO_3	$[\text{g L}^{-1}]$
dt	Messzeit	$[\text{h}]$
OTR	Sauerstofftransferrate	$[\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}]$
c^*	Sauerstoffsättigungskonzentration	$[\text{mg L}^{-1}]$

Die Messung der Sauerstoffkonzentration wurde mittels Sauerstoffsensoren (Presens, Oxy-4) durchgeführt. Der Sauerstoffsensor wurde unter Standard-Bedingungen kalibriert. Die Messung und die Berechnung wurde mit den folgenden Werten durchgeführt: Sulfitkonzentration $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; Messzeit 200 min ; Sauerstoffsättigungskonzentration $8,83 \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($22 \text{ }^\circ\text{C}$); Luftvolumenstrom $1,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. Der ermittelte $k_L a$ -Wert beträgt 431 h^{-1} und liegt also im Bereich der Werte einer Blasensäule ($50\text{-}1.000 \text{ min}^{-1}$) und eines Rührkesselreaktors ($300\text{-}3.000 \text{ min}^{-1}$) [72]. Dieser Wert zeigt, dass dieses neuentwickelte Photobioreaktorsystem einen guten Gasübergang ermöglicht. Bei den Mikroalgenkultivierungen werden also die CO_2 -Zufuhr und die O_2 -Abfuhr keinen limitierenden Faktor darstellen.

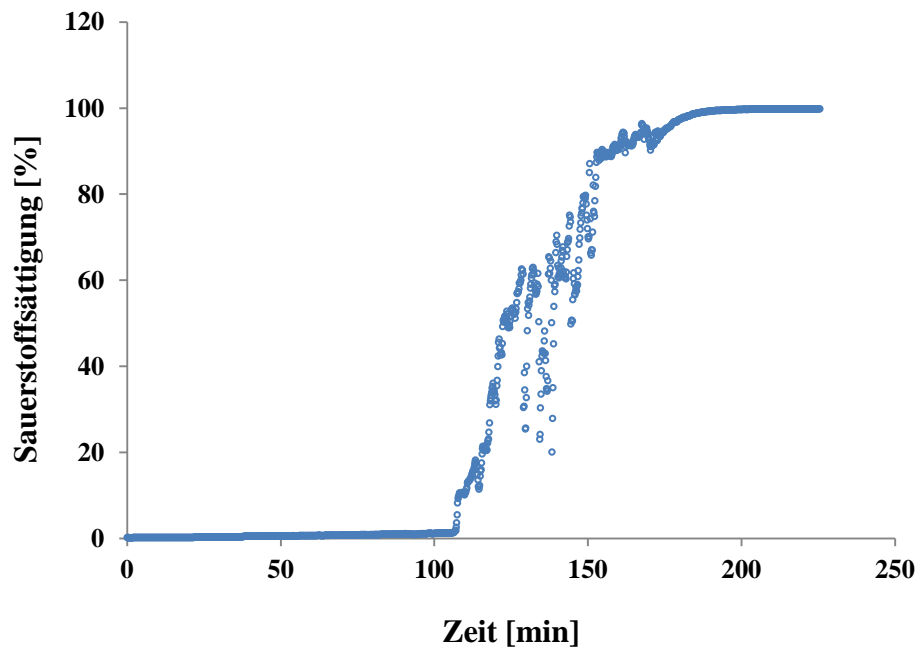


Abbildung 3.13: Sauerstoffsättigung in Abhängigkeit von der Zeit.

In der Abbildung 3.13 ist der Verlauf der Sauerstoffsättigung in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Wie in der Abbildung zu sehen ist, lag die Sauerstoffsättigung bis 100 min nahe Null, da die Oxidationsreaktion von Sulfit zu Sulfat den eingetragenen Sauerstoff sofort verbraucht. Nach 200 min erreichte die Sauerstoffsättigung 100 %. Das liefert den Nachweis dafür, dass die Oxidationsreaktion vollständig stattgefunden hat und die gesamte Sulfitmenge verbraucht war.

3.1.6. Fazit

Für die Durchführung der Mikroalgenkultivierungen wurde ein Photobioreaktorsystem entwickelt. Zunächst wurden für die Reaktorcharakterisierung Durchmischungsmessungen durchgeführt. Bei dem Reaktorsystem mit einem Glasreaktormodul und Ausgleichsgefäß wurde nach 140 s bei einer Durchflussrate von $880 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ eine homogene Durchmischung erreicht. Für die homogene Durchmischung mit zwei Glasreaktormodulen inkl. Ausgleichsgefäß wird, wie erwartet, mehr Zeit benötigt (160 s bei $880 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Eine Erhöhung der Durchflussrate hat keinen Einfluss auf die Zeit, bei der die homogene Durchmischung erreicht wird. Demzufolge wird als Richtwert für die Durchflussrate $880 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ genommen.

Bei den Durchmischungsmessungen wurde das Kulturmedium zirkulär, bei der Verweilzeitverteilung linear gepumpt.

Die Verweilzeit-Bestimmung ist ein wichtiger reaktortechnischer Parameter. Bei der Messung der Durchmischung zeigt die Durchflussrate mit $880 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ die schnellste Vermischung. Die anschließend erhöhten Pumpengeschwindigkeiten haben keinen Einfluss auf die Zeit, bei der die homogene Mischung erreicht wird. Als Salzlösung dient auch hier 1 mL 0,02 molare KNO_3 , wie erwartet erhöht sich die Verweilzeit mit steigendem Volumen.

Um den Einfluss der Leuchtstoffröhre zu bestimmen, wurden Temperaturprofile des Reaktorsystems aufgenommen. Da die Leuchtstoffröhre für eine gleichmäßige Beleuchtung im Inneren des Photobioreaktors platziert ist, war anzunehmen, dass durch die Leuchtstoffröhre die Temperatur des Mediums erhöht werde. Die gleichzeitigen Messungen im Medium, auf der Glasoberfläche des Photobioreaktors und der Raumtemperatur zeigten, dass die Temperatur im Reaktor durch die Leuchtstoffröhre um $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ erhöht wurde. Diese Temperaturerhöhung beträgt etwa $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ und kann für Mikroalgenkultivierungen einen limitierenden Faktor darstellen, weil die direkt an der Leuchtstoffröhre liegenden Zellen wegen der hohen Temperatur geschädigt werden können. Des Weiteren wird die Temperatur mit dem Thermostat des *Bio-stat B* (Steuereinheit) konstant gehalten.

Da die Lichtintensität einen entscheidenden Faktor bei der Mikroalgenkultivierungen darstellt, muss das hier verwendete Leuchtmittel genau zum Mikroalgenabsorptionsbereich passen. Aus diesem Grund wurden die Lichtintensitäten der Leuchtstoffröhre gemessen. Die Lichtintensität an der äußeren Reaktorglasswand beträgt etwa 60 % der Intensität in der Nähe der Leuchtstoffröhre, was für die Lichtversorgung der Mikroalgen ausreichend ist.

Die Sauerstoffverteilung im Photobioreaktor ist ebenfalls ein wichtiger Parameter bei der reaktortechnischen Charakterisierung. Bei dem Photobioreaktorsystem wurde ein $k_L a$ -Wert von

431 h⁻¹ gemessen. Dieser Wert stimmt mit dem in der Literatur angegebenen theoretischen Werten für Blasensäulen und Rührkesselreaktoren überein. Es liegt eine gute Sauerstoffverteilung im Photobioreaktorsystem vor, d.h. wenn die Zellen im Photobioreaktor mit Druckluft mit und ohne CO₂ begast werden, ist die Versorgung der Zellen mit CO₂ gewährleistet.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche zeigen, dass das entwickelte Photobioreaktorsystem ein gutes Modell für die Mikroalgenkultivierungen darstellt.

Als Zusammenfassung weist das gesamte Photobioreaktorsystem die folgenden Vorteile auf:

- schnelle Durchmischung
- enge Verweilzeitverteilung
- geringe Lichtabsorption durch das System
- ausreichende und gleichmäßige Lichtversorgung der kultivierenden Mikroalgen
- weite Oberflächen, da das Reaktormaterial aus Glas besteht
- autoklavierbares Reaktorsystem
- durch weitere Glasreaktormodule erweiterbares Reaktorsystem
- nicht genutzte Lichtenergie wird als thermische Energie von dem System aufgenommen und reduziert den Energie-Aufwand zur Reaktortemperierung
- guter Sauerstoffübergang
- leichte Reinigung

3.2. Kultivierung von *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Kultivierung von Mikroalgen wird vorwiegend im Schüttelkolben sowie in Photobioreaktoren im Labor-, Technikums- und Industriemaßstab durchgeführt. Während der Kultivierung müssen die eingestellten Bedingungen, wie Temperatur, pH-Wert, Begasungsrate und Beleuchtungsstärke überwacht und geregelt werden.

Die Kultivierungen können kontinuierlich, halbkontinuierlich (fed-batch-Kultivierung) und diskontinuierlich (batch-Kultivierung) durchgeführt werden. Bei dem kontinuierlichen Prozess wird das frische Medium zugeführt und das Kultivierungsmedium mit den Zellen abgeführt, so dass die Zelldichte im Reaktor konstant gehalten wird. Bei dem batch-Betrieb sind die nötigen Nährstoffe im frischen Medium enthalten und die Zellen wachsen solange, bis die Nährstoffe vollständig verbraucht sind. Bei der fed-batch-Kultivierung wird je nach Verbrauch neue Nährlösung dem Kulturmedium zugegeben.

In dieser Arbeit wurden die Mikroalgenzellen im Schüttelkolben und im batch-Photobioreaktorsystem kultiviert. Zunächst wurde die in der Forschung breit verwendete Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* als Modellorganismus kultiviert. *C. reinhardtii* ist der bekannteste und am weitesten erforschte Mikroalgenstamm unter allen Mikroalgen.

Um das Wachstum von *C. reinhardtii* bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen zu untersuchen, wurden zuerst Schüttelkolbenkultivierungen durchgeführt. Nach der Optimierung im Schüttelkolben wurden die Kultivierungsparameter auf den Photobioreaktormaßstab übertragen. Das Hauptziel der Untersuchungen lag darin, dass das in-Situ Mikroskop und das Durchflussmikroskop an die Prozessüberwachung angepasst werden. Für die Anpassung des Mikroskops werden verschiedene Versuche durchgeführt und die optimale Bedingung für die Kultivierung ausgewählt. Nachdem die Überwachungs- und Auswertungsparameter für den Stamm eingestellt wurden, kann dieses System auf weitere Mikroalgenstämme angewandt werden.

Die bei den Kultivierungen angewendeten Bestimmungsmethoden der einzelnen Prozessgrößen werden im Anhang beschrieben. Insgesamt wurden folgende Prozessgrößen gemessen: OD₅₅₀ (Messmethode siehe Anhang, Abschnitt 5.1.5.1), Glucose-Konzentration (Abschnitt 5.1.5.2), Chlorophyll-Konzentration (Abschnitt 5.1.5.3), Zellzahl (Abschnitt 5.1.5.4) und der pH-Wert (Abschnitt 5.1.5.5).

3.2.1. Kultivierungen im Schüttelkolben

Für die Kultivierungen und die Untersuchung des Kultivierungsverhaltens von *C. reinhardtii* wurden Schüttelkolben (500 mL) mit 2 Schikanen verwendet. Als Kulturmedium wurde das TAP-Medium (Zusammensetzung siehe Anhang, Abschnitt 5.1.2.1) verwendet, das in der Literatur empfohlen wird [73]. Vergleichskultivierungen mit anderen Nährstoffmedien bestätigten, dass *C. reinhardtii* in diesem Medium am Besten wächst. Die *C. reinhardtii* Kultivierungen im Schüttelkolben werden in den folgenden drei Unterkapiteln zusammengefasst.

3.2.1.1. Standard-Kultivierungen

Standard-Kultivierungen sind Kultivierungen von *C. reinhardtii* im TAP-Medium ohne jegliche Zusätze. Dabei wird der Schüttelkolben nicht begast und die Beleuchtungszeit beträgt 24 h täglich. Standard-Kultivierungen werden in dieser Dissertation als Referenz-Kultivierung bezeichnet. Zur Beleuchtung wird eine Lampe (Secret Jardin 72 W) verwendet. Die Kultivierungsbedingungen sind in der Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Kultivierungsbedingungen für *Chlamydomonas reinhardtii* im Schüttelkolben.

Kultivierungsbedingungen	Schüttelkolben (500 mL)
Temperatur	RT
Schüttelgeschwindigkeit	100min ⁻¹
pH	7
Medium	TAP-Medium
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h

Das Wachstum wurde mittels Bestimmung der Optischen Dichte 550 nm (OD₅₅₀) verfolgt. Die Messungen der OD wurden einmal täglich durchgeführt, weil die Kultivierungsdauer relativ lang ist und bei häufigerer Probenentnahme der Volumenverlust zu hoch wäre, was die Genauigkeit der Ergebnisse beeinträchtigen würde. Neben der OD₅₅₀ wurde auch die Chlorophyll-Konzentration Zellzahl und der pH-Wert überwacht. Bei dem Stamm wurde die Messung der Optischen Dichte bei 550 nm durchgeführt, da diese infolge des Vorhandenseins von Chlorophyll bei höheren Wellenlängen keine reproduzierbaren Ergebnisse liefern würden.

Das Absorptionsmaximum von Chlorophyll a und Chlorophyll b liegt nämlich im Bereich 600-650 nm.

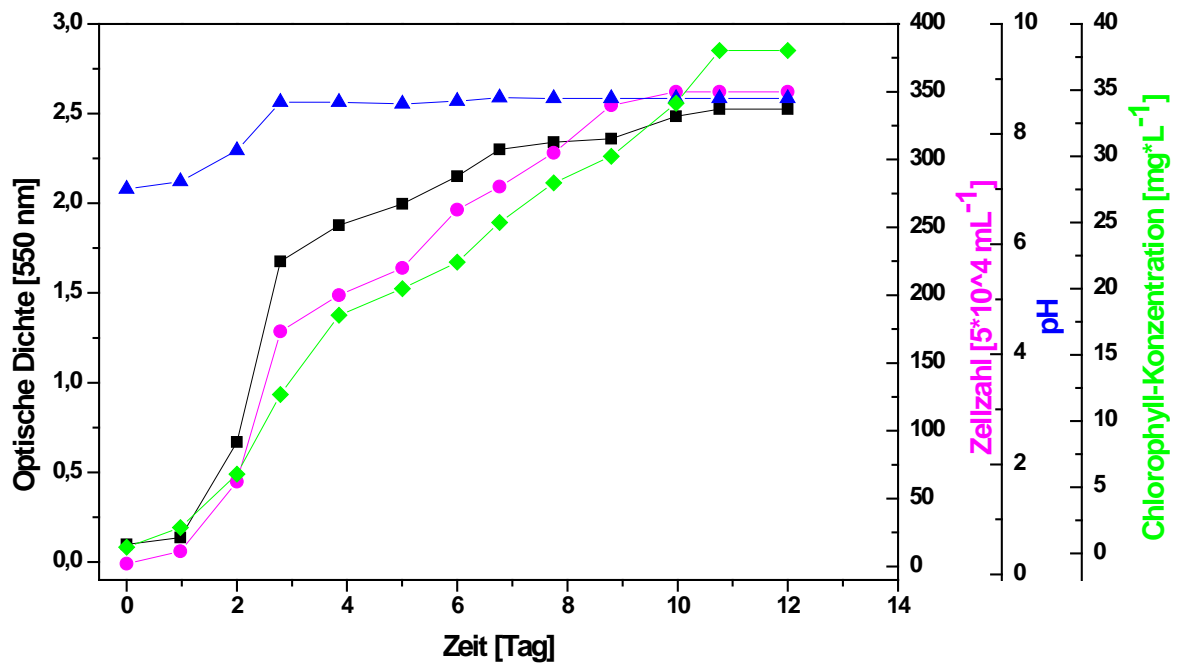


Abbildung 3.14: Der Verlauf der Optischen Dichte der *Chlamydomonas reinhardtii* Kultivierung mit Zellzahl, pH-Wert und Chlorophyll-Konzentration.

In Abbildung 3.14 ist der Kultivierungsverlauf der Schüttelkolbenkultur dargestellt mit Verlauf der Optischen Dichte, Zellzahl, Chlorophyll-Konzentration und pH-Wert. Die Abbildung zeigt, dass die Zellen zu Beginn der Kultivierung eine kurze Lag-Phase aufweisen. Die Zellen gehen nach der Adaptionszeit von 24 h in die exponentielle Wachstumsphase über. Die maximale Optische Dichte erreichte in der Kultivierung einen Wert von $OD_{550} = 2,4$ und die maximale Zellzahl betrug $1,75 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Nach 12-tägiger Kultivierung wurde eine Chlorophyll-Konzentration (Abschnitt 5.1.5.3 im Anhang) von $38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ erreicht. Die Chlorophyll-Konzentration erfasst die beiden Chlorophyllarten, Chlorophyll a und Chlorophyll b. Die Chlorophyllbestimmung ist im Anhang (Abschnitt 5.1.5.3) beschrieben.

Der Verlauf der mit der Neubauerkammer ermittelten Zellzahl, der Optischen Dichte und der Chlorophyll Konzentration korreliert gut miteinander. In Abbildung 3.15 ist die Korrelation zwischen der Zellzahl und der Optischen Dichte dargestellt.

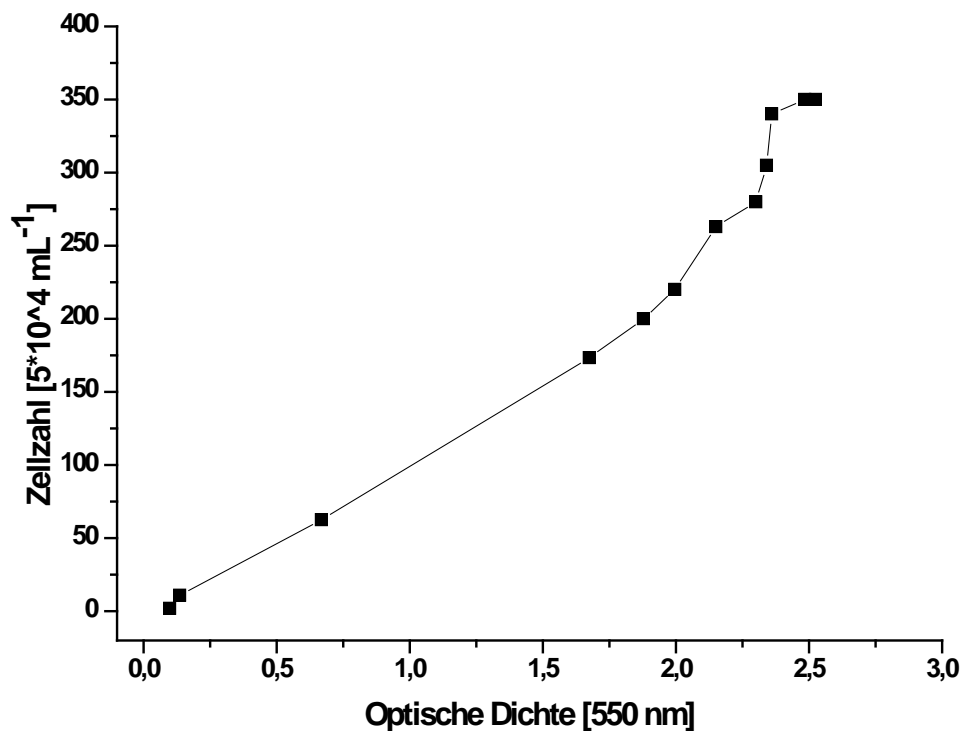


Abbildung 3.15: Vergleich der Ergebnisse der Optischen Dichte und der Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Kammer während der *C. reinhardtii* Schüttelkolben-Kultivierung.

Die Korrelation ist bis zum 6. Tag nahezu linear, ab dem Tag 7 weicht die Zellzahl in Richtung größerer Werte gegenüber der Linearbeziehung ab (siehe in Abbildung 3.15). Das kann durch das Entstehen der vielen kleinen Tochterzellen aus den Mutterzellen, die bei der gleichen Optischen Dichte eine höhere Zellzahl aufweisen, erklärt werden.

3.2.1.2. Kultivierungen mit Begasung

Nach den Standard-Kultivierungen wurden die Kultivierungen mit Begasung im Schüttelkolben durchgeführt. Das Ziel war es, die Produktion der Biomasse zu erhöhen und die Bedingungen für *C. reinhardtii* Kultivierungen zu optimieren. Die Begasung der Schüttelkolben wird über eine Kolbenkappe mit Druckluft und CO_2 durchgeführt (Abbildung 3.16). Die Silikonschläuche werden vor der Kultivierung genauso wie Schüttelkolben durch Autoklavieren sterilisiert. Bei der Probeentnahme wird der Begasungsschlauch mit einer Metallklemme ge-

geschlossen, damit die Schläuche steril bleiben. Die eingestellten Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Kultivierungsbedingungen für *Chlamydomonas reinhardtii* im Schüttelkolben mit Begasung.
Kultivierungsbedingungen Schüttelkolben (500 mL)

Temperatur	RT
Schüttelgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	7
Begasung	300 mL*min ⁻¹ und CO ₂ (2 % und 4 % (v/v))
Medium	TAP-Medium
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h

Die *C. reinhardtii* Kultivierung wurde in zwei Begasungsmodus durchgeführt. Im ersten Modus wurden die Schüttelkolben über die Kolbenkappe nur mit Druckluft (300 mL*min⁻¹) begast, im zweiten Modus wurde die Druckluft-CO₂ Mischung verwendet (Abbildung 3.16).



Abbildung 3.16: Das Kolbenkappen-Begasungssystem (mit oder ohne CO₂) während der Mikroalgenkultivierungen im Schüttelkolben.

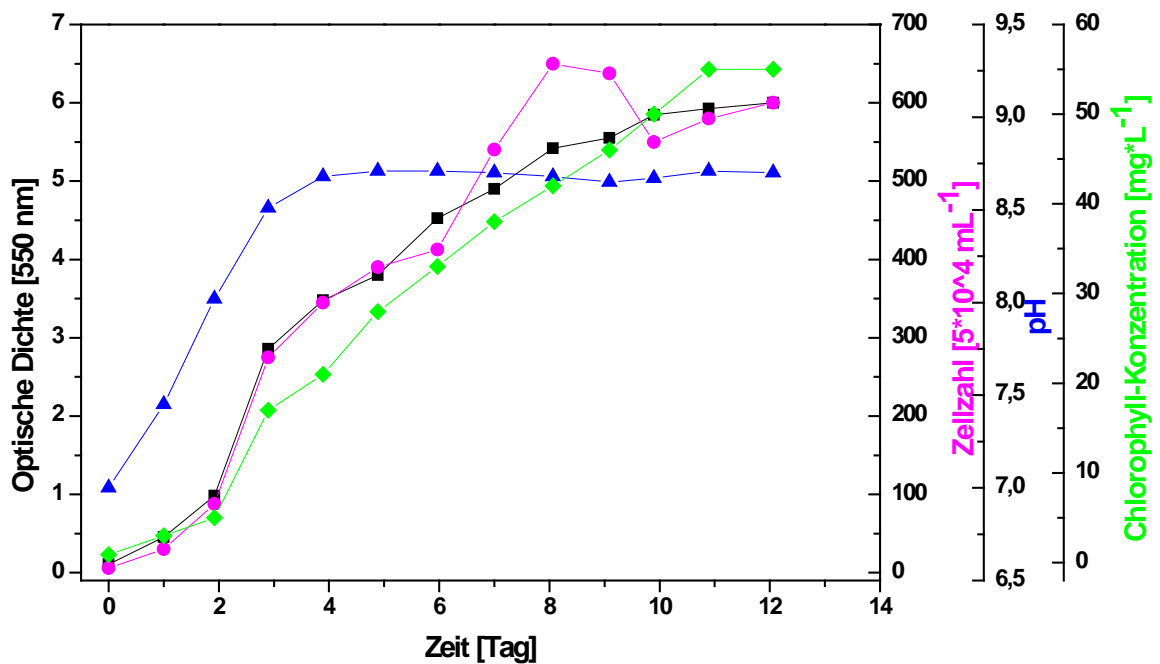


Abbildung 3.17: Der Verlauf der Optischen Dichte der *Chlamydomonas reinhardtii* Kultivierung (mit Druckluft-Begasung) mit Zellzahl, pH-Wert und Chlorophyll-Konzentration.

In Abbildung 3.17 ist der Wachstumsverlauf der *C. reinhardtii* Kultivierung im Schüttelkolben mit Druckluft-Begasung ($300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) dargestellt. Bei dieser Kultivierung beträgt die finale $\text{OD}_{550} = 6$, was 2,2-fach höher als bei der Standard-Kultivierung ist. Wie die Optische Dichte, verdoppelt sich auch die Zellzahl bei der Kultivierung mit der Druckluft-Begasung. Die Chlorophyll-Konzentration verdoppelt sich und erreicht einen Wert von $55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Werte der Optischen Dichte, die Zellzahl und die Chlorophyll-Konzentration weisen ähnliche Verläufe auf. Mit der Druckluft-Begasung ($300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) und 2 % (v/v) CO_2 -Anreicherung ($6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) wurde eine weitere Optimierung der *C. reinhardtii* Kultivierung durchgeführt, mit der das Wachstum von *C. reinhardtii* weiter gesteigert werden sollte (Abbildung 3.18).

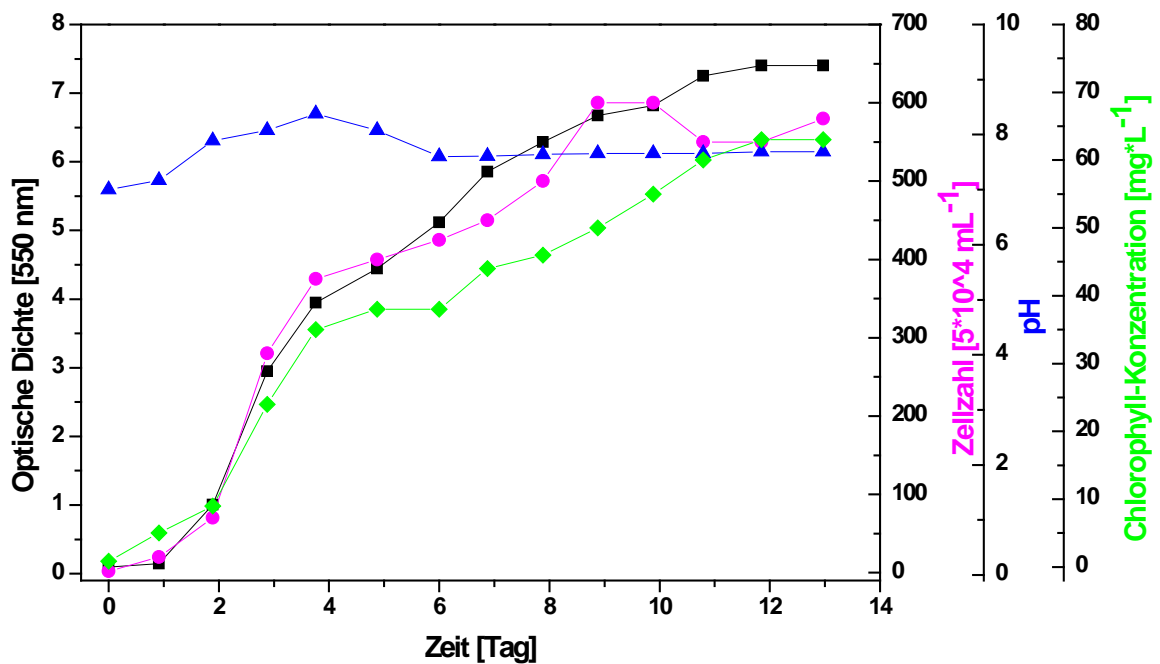


Abbildung 3.18: Der Verlauf der Optischen Dichte der *Chlamydomonas reinhardtii* Kultivierung (Druckluft-Begasung mit 2 % CO_2 (v/v)) mit Zellzahl, pH-Wert und Chlorophyll-Konzentration.

Hier wurde eine Optische Dichte von $\text{OD}_{550} = 7,5$ erreicht und eine Chlorophyll-Konzentration von $62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ erzielt. Die Zellzahl ändert sich im Vergleich zu einer Kultivierung mit Druckluftbegasung nicht. Vermutlich sind bei gleichbleibender Zellzahl die Tochterzellen weiter gewachsen, wodurch eine hohe Optische Dichte erreicht wurde.

Um den Einfluss von CO_2 auf das Wachstum von *C. reinhardtii* weiter zu verifizieren, wurden die Kultivierungen noch einmal mit erhöhtem (4 % (v/v)) CO_2 -Anteil in der Begasung durchgeführt (Abbildung 3.19).

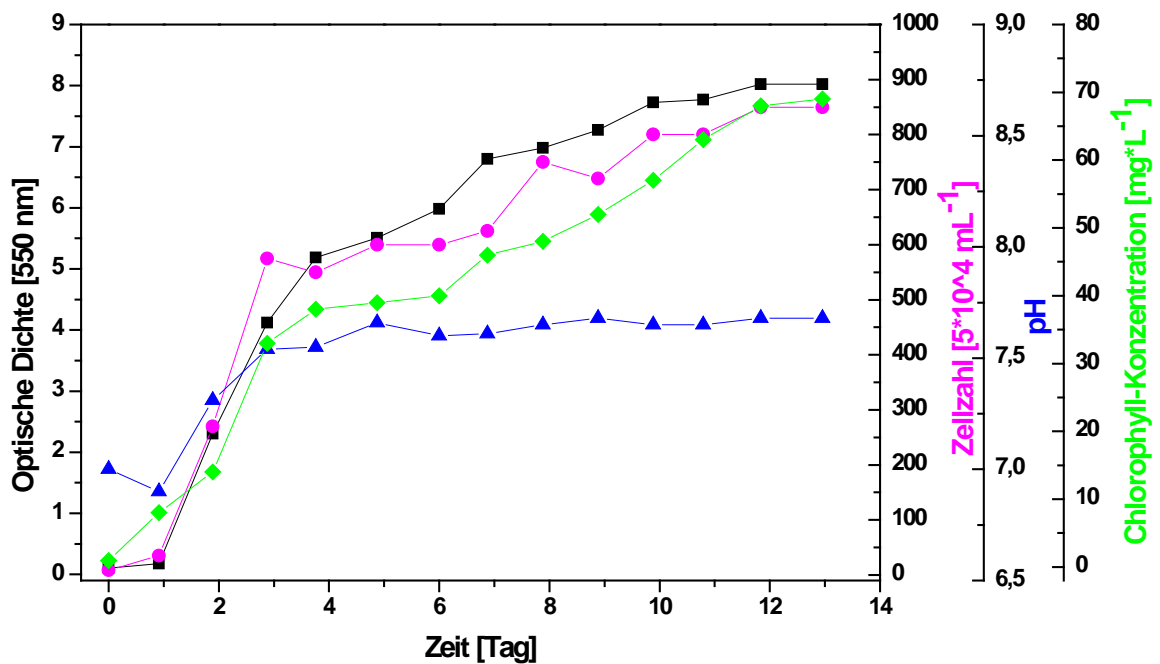


Abbildung 3.19: Der Verlauf der Optischen Dichte der *Chlamydomonas reinhardtii* Kultivierung (Druckluft-Begasung mit 4 % CO_2 (v/v)) mit Zellzahl, pH-Wert und Chlorophyll-Konzentration.

Die Begasungsrate im Schüttelkolben betrug $300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Bei dieser Kultivierung erreicht die Optische Dichte einen Wert von $\text{OD}_{550} = 8$, mit einer Zellzahl von $4,25 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Die Chlorophyll-Konzentration beträgt $72 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Bei dieser Kultivierung weisen die Optische Dichte, die Gesamt-Chlorophyll-Konzentration und die Zellzahl im Vergleich zu anderen Kultivierungen einen hohen Wert auf. Wie im theoretischen Teil beschrieben, wird CO_2 als Kohlenstoffquelle verwendet, was die Ausbeute verbessert, d.h. zu einer Erhöhung der Biomasse-Produktion führt.

3.2.1.3. Kultivierungen mit Glucose

C. reinhardtii kann auch heterotroph kultiviert werden, d.h. die Zellen wachsen beim Vorhandensein von Glucose als Kohlenstoffquelle auch in Dunkelheit. Bei den Experimenten, die in diesem Kapitel beschrieben sind, wurden dem Kulturmedium $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose (Messmethode: Abschnitt 5.1.5.2 im Anhang) zugemischt. Die Beleuchtungsdauer betrug 16 h täglich, wäh-

rend der restlichen Zeit wurde der Kolben nicht beleuchtet. Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Während der Kultivierung wurde die Glucose-Konzentration auch wie die anderen Kultivierungsparametern (OD₅₅₀, pH-Wert, Zellzahl und Glucose-Konzentration) gemessen.

Tabelle 3.3: Kultivierungsbedingungen für *Chlamydomonas reinhardtii* im Schüttelkolben mit Glucosezusatz.

Kultivierungsbedingungen	Schüttelkolben (500 mL)
Temperatur	RT
Schüttelgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	7
Medium	TAP-Medium mit 2 g*L ⁻¹ Glucose
Beleuchtungsdauer	16 h/8 h (Licht/Dunkel)

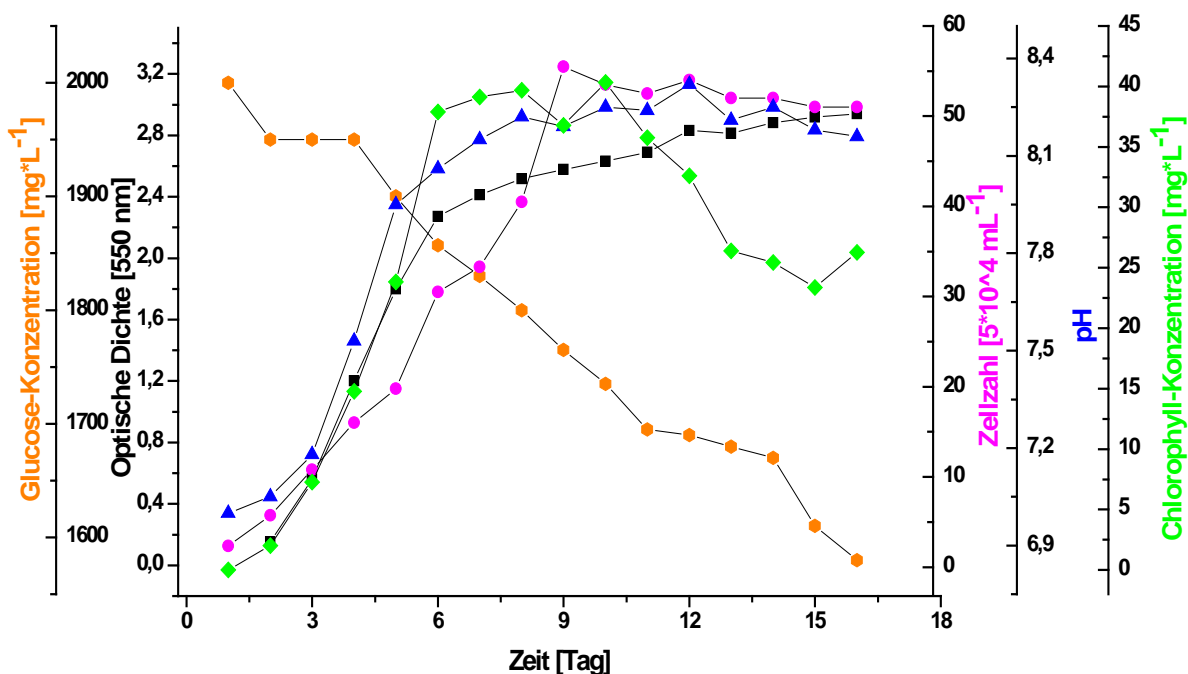


Abbildung 3.20: Der Verlauf der Optischen Dichte der *Chlamydomonas reinhardtii* Kultivierung in TAP- Medium (mit 2 g*L⁻¹ Glucose), mit Zellzahl, pH-Wert, Glucose-Konzentration und Chlorophyll-Konzentration.

Die Ergebnisse der Kultivierung von *C. reinhardtii* im TAP-Medium sind in Abbildung 3.20 dargestellt. Bei dieser Kultivierung wurde der Kolben nicht begast und es wurde mit einem Licht/Dunkel-Zyklus belichtet (16 h Licht, 8 h Dunkel). Als maximale Optische Dichte wurde ein Wert von $OD_{550} = 2,75$ erreicht, mit einer sehr hohen Zellzahl von $2,75 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Die Chlorophyll-Konzentration betrug $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Die beiden Werte liegen höher als es bei Referenzkultivierung (Abschnitt 3.2.1.1) der Fall ist, aber im Vergleich zu den Kultivierungen mit Begasung sind sie niedriger (Abschnitt 3.2.1.2). Der Verlauf der Glucose-Konzentration während der Kultivierung zeigt, dass nur ein geringer Teil an Glucose ($0,45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) verbraucht wurde. Die *C. reinhardtii* Zellen verbrauchten nicht die gesamte Glucose. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei *C. reinhardtii* Kultivierungen mit Glucose als Kohlenstoffquelle wesentlich geringere Ausbeuten erzielt werden als bei den Kultivierungen mit CO_2 -Begasung. Dies zeigt, dass der auf Glucose basierende Stoffwechsel nur eine Notlösung für die Mikroalgenkultivierungen darstellt, da ihr Metabolismus auf CO_2 -Fixierung optimiert ist.

3.2.1.4. Fazit

Für die *C. reinhardtii*-Kultivierungen und die Biomasse-Produktion wurden unterschiedliche Variationen der Kultivierungen im Schüttelkolben durchgeführt. Die Kultivierungen wurden für jede Kultivierungsart dreimal durchgeführt. Für jede Variation wurden nur Ergebnisse einer Beispielkultivierung dargestellt. Das Ziel war es, die Parameter zunächst im kleinen Maßstab zu bestimmen und anschließend den Prozess für den Photobioreaktor zu vergrößern. Die Kultivierungszeit betrug bei der Kultivierung ohne Begasung und ohne Kohlenstoffquelle im Medium 12 Tage mit einer maximalen $OD_{550} = 2,4$. Die Zellzahl lag nach 12 Tagen bei $1,75 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$.

Bei der 12-tägigen Kultivierung mit Druckluftbegasung wurde eine $OD_{550} = 6$ und eine Zellzahl von $3,5 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$ erreicht. Die Optische Dichte lag bei einer Kultivierung mit Begasung und 2 % (v/v) CO_2 nach 13 Tagen bei $OD_{550} = 7,5$, wohingegen die Zellzahl sich nicht geändert hat. Das kann daran liegen, dass die Zellen bei gleichbleibender Anzahl größer geworden sind. Aus diesem Grund steigt die Optische Dichte an, während die Zellzahl gleichbleibt. Die Optische Dichte erhöhte sich bei wachsender CO_2 -Konzentration und erreichte einen Wert von $OD_{550} = 8$, während die Zellzahl auf $4,25 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$ stieg. Bei der Kultivierung mit Glucose als Kohlenstoffquelle wurde für die Optische Dichte der Wert von $OD_{550} = 2,75$ und eine Zellzahl von $2,75 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$ erreicht. Der Vergleich der Kultivierungen zeigt, dass bei der Druckluftbegasung mit CO_2 sowohl eine höhere Optische Dichte als auch eine höhere Zellzahl erzielt wird. Dies lässt sich damit begründen, dass die *C. reinhardtii*-Zellen Photosynthese betreiben und für das Wachstum CO_2 benötigen. Die Kultivierung mit Glucose zeigte nur eine geringe Erhöhung der Optischen Dichte und der Zellzahl gegenüber der Standard-Kultivierung. Dies kann damit erklärt werden, dass die im Medium enthaltene Glucose nicht vollständig verbraucht wurde.

Abschließend konnte festgestellt werden, dass die Kultivierung mit CO_2 -Begasung viel bessere Ergebnisse liefert als die Kultivierung mit Glucose und unter Standard-Bedingungen (Abschnitt 3.2.1.1). Daher bietet sich die Kultivierung mit CO_2 -Begasung für die spätere Produktion an.

3.2.2. Kultivierungen im Photobioreaktor

Nachdem die *C. reinhardtii* Zellen im Schüttelkolben erfolgreich kultiviert wurden, sollte gezeigt werden, dass die *C. reinhardtii* Kultivierungen nicht nur im kleinen Volumen, sondern auch in größeren Kulturvolumina im Photobioreaktor durchgeführt werden können. Dieser Photobioreaktor verfügt über ein gesamtes Kulturvolumen von 4 L (inkl. Ausgleichsgefäß mit beiden Glasreaktormodulen). Das Ausgleichsgefäß besteht aus einem doppelwandigen Edelstahlbehälter und besitzt in der Mitte einen Rührer, der die Durchmischung des Reaktorinhaltes ermöglicht. Die Temperatur, der pH-Wert, wie auch die Menge und die Zusammensetzung der Begasung werden über ein Kontrollgerät gesteuert. Für die Temperatur- und pH-Wert-Regelung wurde das Steuergerät des Biostat® B mit Sensoren versehen und für die Regelung der Begasung ein Massendurchflussregler eingesetzt. Die während der Kultivierungen entstehende Schaumbildung wurde durch Zugabe von einem Antischaummittel verringert. Die Entnahme von Proben erfolgte über eine dafür angepasste Probenentnahmestelle mit Septensystem, welches eine sterile Probeentnahme ermöglichte.

Für die Untersuchungen wurde das in-Situ-Mikroskop Typ III XTF und Durchflussmikroskop mit integriertem 20-fach Objektiv in einen Photobioreaktormodul (jeweils 1,7 L) mit geschlossenem Ausgleichsgefäß (0,6 L) und mit Biostat® B Regeleinheit eingebaut. In dieser Arbeit ist der Stamm *C. reinhardtii* Modellorganismus. Deswegen wird die Adaption online mikroskopischer Verfahren an die Überwachung und Charakterisierung Mikroalgenkultivierungsprozesse erst bei dem Stamm erfolgen. Mit den online mikroskopischen Verfahren können die möglichen Zellinformationen ermittelt werden. Die Tabelle 3.4 gibt eine Übersicht über die gewählten Kultivierungsbedingungen.

Tabelle 3.4: Kultivierungsbedingungen für *C. reinhardtii* im Photobioreaktor inkl. Ausgleichsgefäß.

Kultivierungsbedingungen	Photobioreaktor (2,3 L)
Temperatur	RT
Rührgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	7
Medium	TAP-Medium
Begasung	1.500 mL*min ⁻¹ mit 4 % CO ₂ (v/v)
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h

Das Ziel der Untersuchungen im Photobioreaktor war die Anpassung des Durchflussmikroskops an die Mikroalgenkultivierungen. Mithilfe des Durchflussmikroskops können wichtige Kultivierungsparameter wie z.B. die Zellzahl automatisch bestimmt werden. Die Überwachung des Kultivierungsprozesses im Photobioreaktorsystem wurde mithilfe zwei unterschiedlicher Mikroskopsysteme realisiert. Bei einem der Systeme handelt es sich um ein in-situ Mikroskop (Abschnitt 2.3), bei dem anderen System um ein Durchflussmikroskop (Abschnitt 2.3). Bei Kultivierungen von *C. reinhardtii* und anderen Mikroalgen mit hoher Zelldichte ist die Überwachung mittels eines in-situ-Mikroskop (Abbildung 2.10) problematisch, weil die Zellen an der Messzonenoberfläche anhaften und somit die Zellzahlbestimmung und die Überwachung nicht mehr möglich sind. Das Anhaften kann durch das weitere Öffnen der Messzone beseitigt werden, was allerdings teilweise zu unscharfen Zellbildern führt, die nicht ausgewertet werden können.

Um solche Probleme zu umgehen, wird die Überwachung der Mikroalgenkultivierung immer mittels Durchflusszellen-Mikroskop durchgeführt. Bei dem System kann die Durchflussrate mit einer peristaltischen Pumpe eingestellt werden. Je nach Zelldichte wird die Durchflussrate der Pumpe geändert, damit auswertbare Bilder, die eine erfolgreiche Überwachung der Kultivierung ermöglichen, aufgenommen werden.

Während der Photobioreaktorkultivierung erfolgte eine tägliche Probeentnahme zur Bestimmung der Optischen Dichte, der Zellzahl, der Glucose Konzentration und des pH-Wertes. Zeitgleich wurden auch die online-Messungen zur Bestimmung der Zellzahl durchgeführt.

Mit dem in-situ Mikroskop wurde jede Stunde ein Zyklus mit jeweils 50 Bildern aufgenommen. Die Aufnahmeparameter können beliebig eingestellt werden und der Abstand der Bildaufnahme während eines Zyklus beträgt 1 s. Die aufgenommenen Bilder können während der Kultivierung oder danach ausgewertet werden.

3.2.2.1. Überwachung der Kultivierungen mit Hilfe des Durchflussmikroskops

Die Photobioreaktormodule wurde gemeinsam mit dem Ausgleichsgefäß, die mit Silikonschläuchen miteinander verbunden sind, im Autoklaven sterilisiert. Bevor das Photobioreaktorsystem autoklaviert wurde, wurden die Temperaturfühler und die pH-Sonde kalibriert. Das TAP-Medium wurde über einen Sterilfilter in das Reaktorsystem eingefüllt. Anschließend wurde das Kulturmedium (insgesamt 2,3 L inkl. Ausgleichsgefäß) mit 45 mL Inoculum der Dauerkultur über ein auf dem Ausgleichsgefäß montiertes Septum angeimpft. Der Reaktor

wurde mit $1,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ Druckluft inkl. 4 % CO_2 (v/v) begast. Der Temperaturfühler, die pH-Sonde, der Rührer, die Animpfungs-, Begasung- und Druckausgleichanschlüsse sind auf dem Ausgleichsgefäß platziert. Die Probeentnahme erfolgte unter sterilen Bedingungen über das Ausgleichgefäß. Während der Kultivierung wurden die Temperatur und der pH-Wert mit der Biostat[®] B Steuereinheit überwacht. Die Temperatur wurde konstant bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ gehalten.

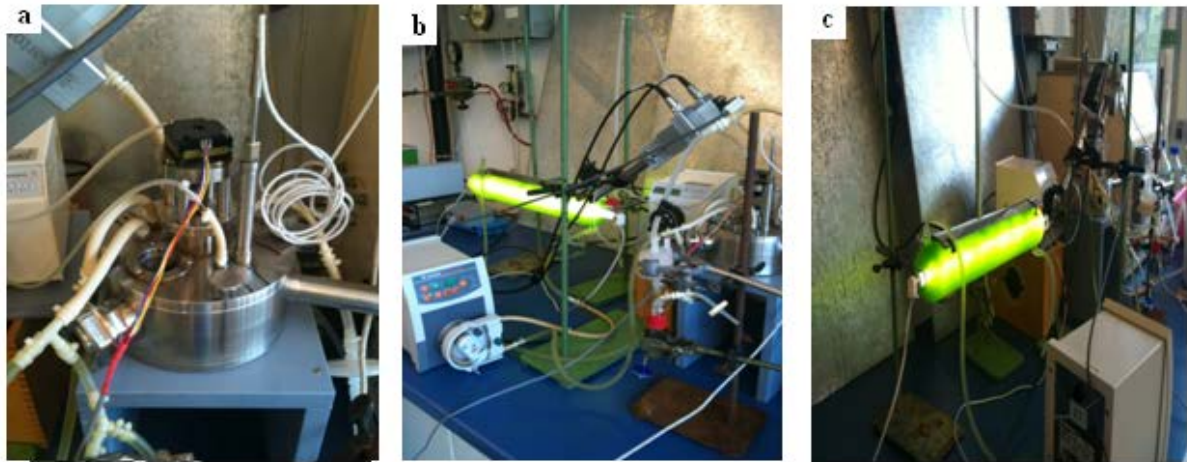


Abbildung 3.21: Bilder des Ausgleichsgefäßes (a), des Durchflussmikroskops (b) und des Photobioreaktors (c) während der *C. reinhardtii* Kultivierung.

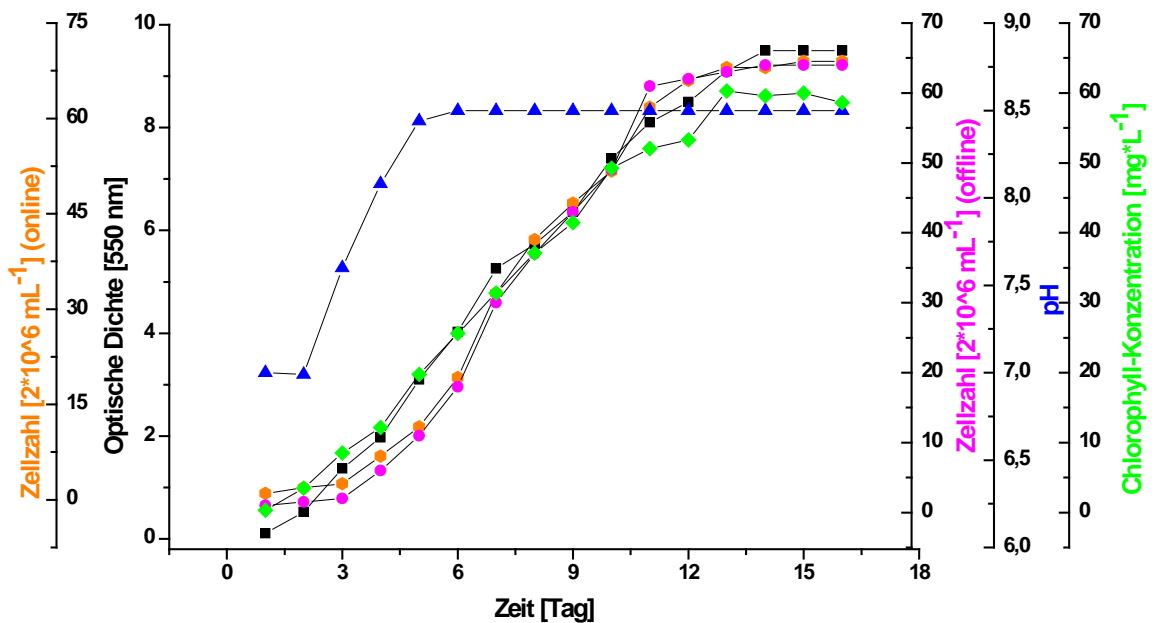


Abbildung 3.22: Der Verlauf der Optischen Dichte der *Chlamydomonas reinhardtii* Kultivierung (Begasung mit 4 % (v/v) CO_2) mit offline/online Zellzahl, pH-Wert und Chlorophyll-Konzentration.

Die Ergebnisse der Reaktorkultivierung von *C. reinhardtii* sind in Abbildung 3.22 zu sehen. Die Verläufe der Wachstumsparameter sind ähnlich. Nach 16 Tagen erreichte die Optische Dichte einen Wert von $\text{OD}_{550} = 10$ und die offline gemessene Zellzahl betrug $1,2 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$. Die online bestimmte Zellzahl liegt mit $1,5 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ geringfügig höher als die offline gemessenen Werte. Während der Kultivierung stieg der offline bestimmte pH-Wert von pH 7 auf pH 8,5, welcher nach 5 Kultivierungstagen erreicht wurde. Anschließend zeigte der pH-Wert einen konstanten Verlauf, was vermutlich daran liegt, dass die weitere Steigung des pH-Werts durch CO_2 -Begasung kompensiert wurde.

Während der Kultivierung wurde der Glasreaktor täglich mehrmals manuell gedreht, insbesondere vor einer Probeentnahme, da die Zellen im Glasreaktor im unteren Teil des Reaktors sedimentieren.

Bei der Photobioreaktorkultivierung zeigen die Ergebnisse eine Erhöhung der Optischen Dichte um 25 % und eine Verdreifachung der Zellzahl im Vergleich zu Schüttelkolbenkultivierung mit 4 % CO_2 -Begasung. Die Kultivierungsdauer beträgt bei den Schüttelkolben- und Photobioreaktorkultivierungen jeweils 18 Tage. Die Ergebnisse zeigen, dass der Photobiore-

aktor für *C. reinhardtii* gute Wachstumsbedingungen bietet. In dem System erfolgen effektive und erfolgreiche Kultivierungen. Außerdem waren die Überwachung und Auswertung der Bilder mit dem Durchflussmikroskop und Auswertungsalgorithmen gut möglich. Die in dem Abschnitt 3.1.6 erläuterten Vorteile (gute Durchmischung, geringe Lichtabsorption des Glases, bessere Begasung und gute Beleuchtung) spielten hauptsächlich bei der Erhöhung der Zellkonzentration eine (bedeutende) Rolle.

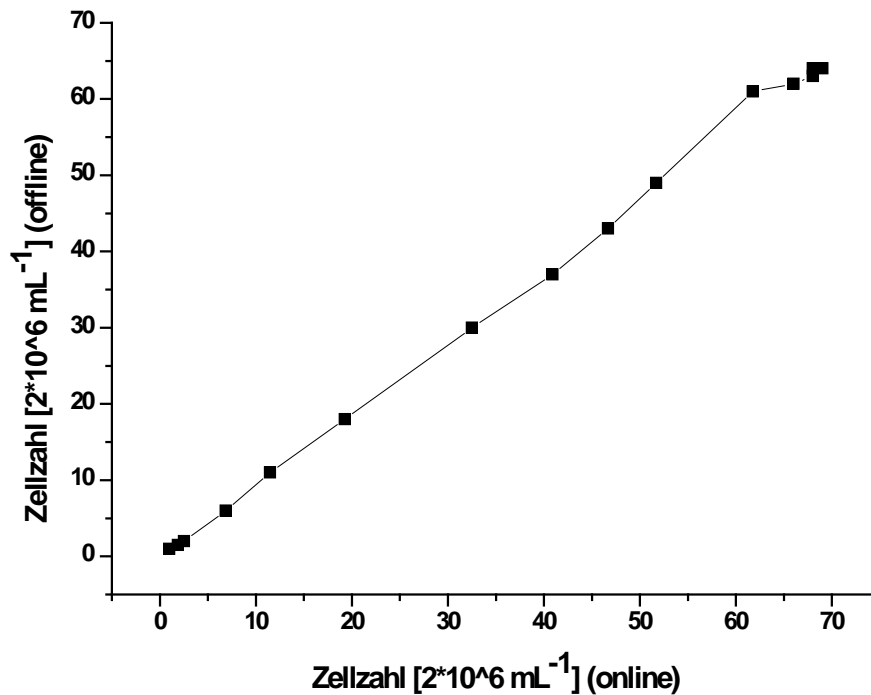


Abbildung 3.23: Die Korrelation zwischen der online bestimmten Zellzahl (Mittelwert) und der offline mit Neubauer-Kammer gezählten Zellzahl.

Der Verlauf der Korrelation zwischen online per Durchflussmikroskop bestimmter Zellzahl, und der offline mit der Neubauer-Zellkammer gezählten Zellzahl, ist in Abbildung 3.23 dargestellt. Die *C. reinhardtii* Zellen sind hinsichtlich ihrer Zellmorphologie einfach auszuwerten, zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den offline bestimmten Werten und können daher im Photobioreaktor mit dem Durchflussmikroskop effektiv kultiviert und gut überwacht werden. Die online ermittelten Ergebnisse weisen für diese Kultivierung 95 % Genauigkeit auf. Die hohe Genauigkeit wird unter anderem mit einem Zusatzalgorithmus im Auswerteprogramm in-situ-Analysis (Abschnitt 5.1.6.2 im Anhang) erreicht, wobei die festhaftenden Zellen bei den darauffolgenden Bildern nicht mitgezählt werden; dies erhöht die Genauigkeit der Messung.

3.3. Kultivierungen von *Chlorella vulgaris*

Nach den erfolgreichen *C. reinhardtii* Kultivierungen wurde mit *Chlorella vulgaris* Zellen weiter gearbeitet. Die *C. vulgaris* Zellen stellen in dieser Arbeit das zweite Mikroalgen-Modell dar. Ursache hierfür ist nicht zuletzt die Bedeutung dieser Zellen für die Industrie und die sehr ähnliche Morphologie zu den *C. reinhardtii* Zellen. Die Form der Mikroalge *C. vulgaris* ist für die Adaption des Durchflussmikroskops besonders geeignet. Ein weiterer Grund, warum als zweites Mikroalgen-Modell *C. vulgaris* gewählt wurde, sind die vergleichbaren Kultivierungsbedingungen der beiden Stämme. Die Photobioreaktorkultivierung wird nur mit dem Durchflussmikroskop überwacht, weil, wie bereits in dem Abschnitt 3.2.2 erklärt wurde, die Überwachung des Kultivierungsprozesses bei hoher Zellkonzentration problematisch ist. Als einziger Unterschied zwischen den beiden Stämmen ist die Zellgröße zu erwähnen, da die *C. vulgaris* (2-10 μm) Zellen kleiner als die *C. reinhardtii* (4-20 μm) Zellen sind.

Die bei den Kultivierungen angewendeten Bestimmungsmethoden der einzelnen Prozessgrößen werden im Anhang beschrieben. Insgesamt wurden folgende Prozessgrößen gemessen: OD₅₅₀ (Messmethode siehe Anhang, Abschnitt 5.1.5.1), Glucose-Konzentration (Abschnitt 5.1.5.2), Chlorophyll-Konzentration (Abschnitt 5.1.5.3), Zellzahl (Abschnitt 5.1.5.4) und der pH-Wert (Abschnitt 5.1.5.5). Die Zusammensetzung des bei den Kultivierungen verwendeten TAP-Mediums ist im Anhang, Abschnitt 5.1.2.1, angegeben.

3.3.1. Kultivierungen im Schüttelkolben

3.3.1.1. Standard-Kultivierungen

Bei den Standard-Kultivierungen wurden die *C. vulgaris* Zellen unter den in Tabelle 3.5 aufgeführten Bedingungen ohne Begasung und Medienzusatz kultiviert.

Tabelle 3.5: Kultivierungsbedingungen für *Chlorella vulgaris* im Schüttelkolben.

Kultivierungsbedingungen	Schüttelkolben (500 mL)
Temperatur	RT
Schüttelgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	7
Medium	TAP-Medium
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h

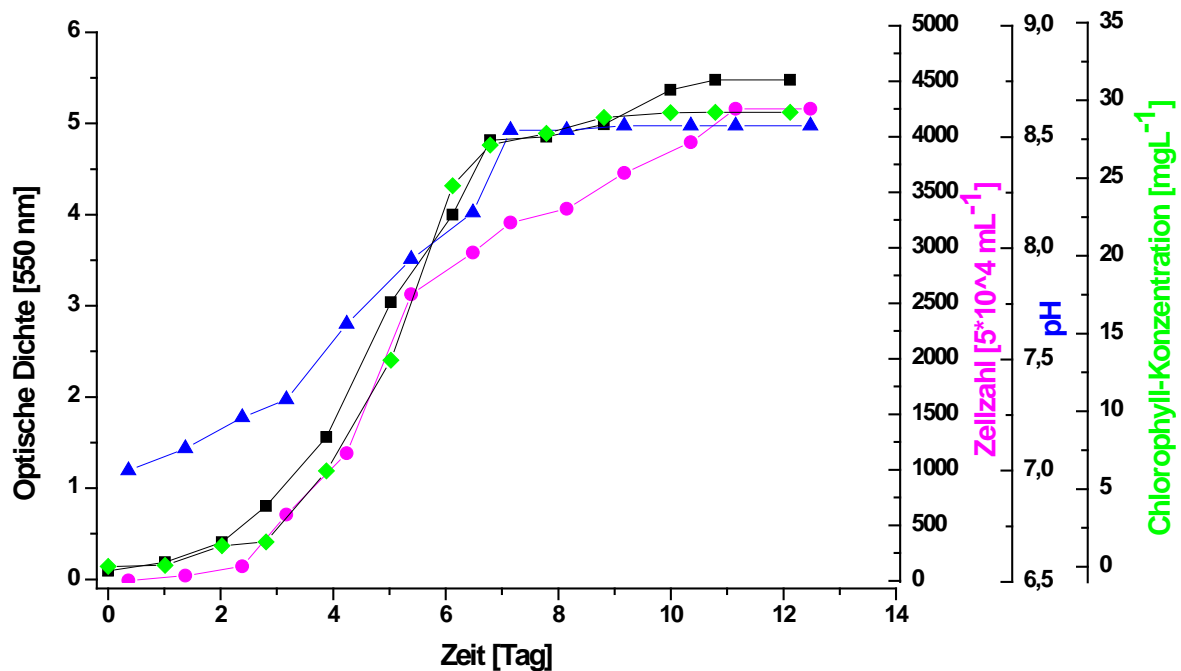


Abbildung 3.24: Verlauf der Optischen Dichte der *Chlorella vulgaris* Kultivierung mit Zellzahl, Chlorophyll-Konzentration und pH-Wert.

Wie aus der Abbildung 3.24 ersichtlich ist, wurde bei dieser Kultivierung eine $OD_{550} = 5,5$ und eine maximale Zellzahl von $2,2 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ erreicht. Der pH-Wert hatte zu Beginn der Kultivierung den Wert von pH 7. Während der Kultivierung stieg der pH-Wert langsam an und erreichte am Ende der Kultivierung pH 8,5. Die Optische Dichte und die Chlorophyll-Konzentration zeigten einen gut korrelierten Verlauf. Bei dieser Kultivierung wurde eine Chlorophyll-Konzentration von $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ erreicht. Die gemessenen Werte für die Chlorophyll-Konzentration (Messmethode: Abschnitt 5.1.5.3 im Anhang) liegen bei den *Chlorella vulgaris* Kultivierungen unter den tatsächlichen intrazellulären Werten, da Chlorophyll von den *C. vulgaris* Zellen in Aceton nicht vollständig löslich ist.

3.3.1.2. Kultivierungen mit Begasung

Um die Biomasse-Produktion zu erhöhen wurden, wie bei den *C. reinhardtii* Kultivierungen, die Schüttelkolben mit Druckluft und CO₂ begast und das Wachstum der Zellen überwacht. Die Kultivierungen von *C. vulgaris* wurden mit Begasung (Druckluft und CO₂-Begasung) durchgeführt. Zunächst wurde der Kolben nur mit Druckluft begast, anschließend wurde CO₂ beigemischt. In Tabelle 3.6 sind die Kultivierungsparameter zusammengefasst.

Tabelle 3.6: Kultivierungsbedingungen für *Chlorella vulgaris* im Schüttelkolben mit Begasung.

Kultivierungsbedingungen Schüttelkolben (500 mL)	
Temperatur	RT
Schüttelgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	7
Begasung	300 mL min ⁻¹ und CO ₂ (2 % und 4 % (v/v))
Medium	TAP-Medium
Beleuchtungsdauer	24 h

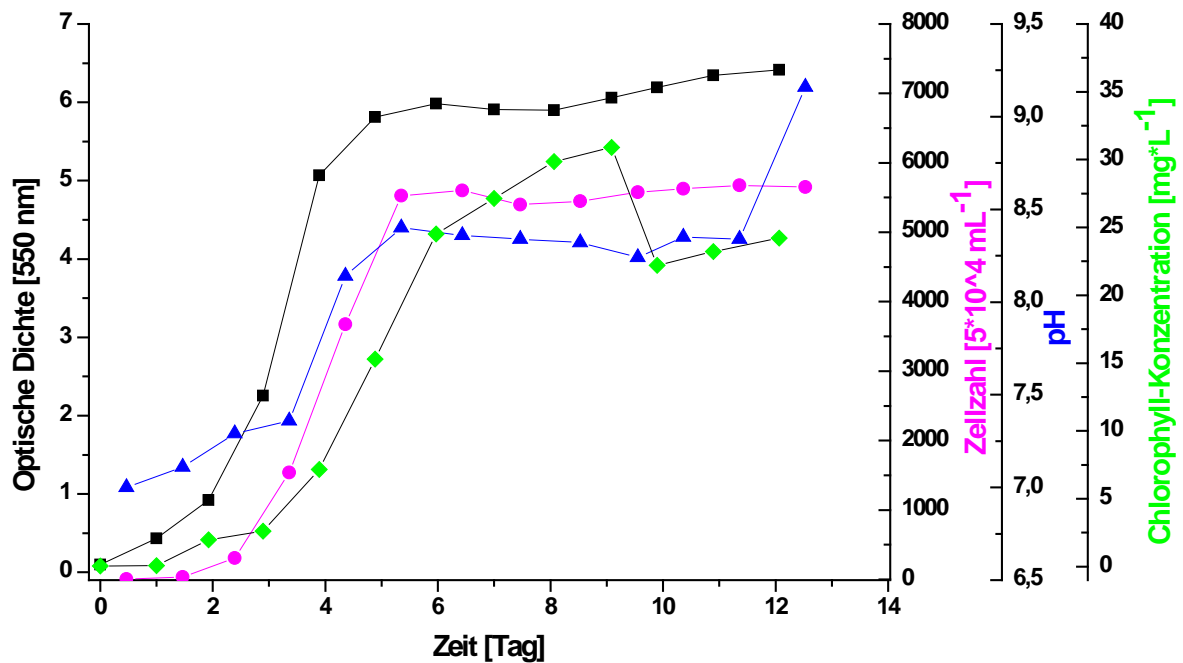


Abbildung 3.25: Verlauf der Optischen Dichte der *Chlorella vulgaris* Kultivierung unter Druckluft-Begasung mit Zellzahl, Chlorophyll-Konzentration und pH-Wert.

Die bei der *C. vulgaris* Kultivierung mit Druckluft-Begasung erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.25 dargestellt. Die maximale erzielte Optische Dichte betrug $OD_{550} = 6,5$ und die Zellzahl $2,75 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$. Die Optische Dichte erhöht sich im Vergleich zur Standard-Kultivierung um 20 % von $OD_{550} = 5,5$ auf $OD_{550} = 6,5$. Die Änderung der Zellzahl ist noch erheblicher und beträgt fast 80 %. In der Luft befindet sich nur etwa 0,05 % CO_2 (v/v). Da eine so geringe Menge an CO_2 schon einen großen Einfluss auf das Wachstum von *C. vulgaris* einnimmt, sind die Ergebnisse der Kultivierung mit hoher CO_2 -Konzentration noch interessanter. Der Einfluss der CO_2 -Begasung auf die Chlorophyll-Konzentration ist nicht so hoch wie der auf die Optische Dichte und die Zellzahl. Die maximale Chlorophyll-Konzentration beträgt $33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, was lediglich um etwa 15 % höher ist als in der Standard-Kultivierung (vgl. Abbildung 3.24). Dies könnte ebenfalls an der Schwerlöslichkeit des Chlorophylls der *C. vulgaris* Zellen in Aceton liegen, da nach der Messungsdurchführung (Abschnitt 5.1.5.3 im Anhang) das Pellet immer noch grün gefärbt war.

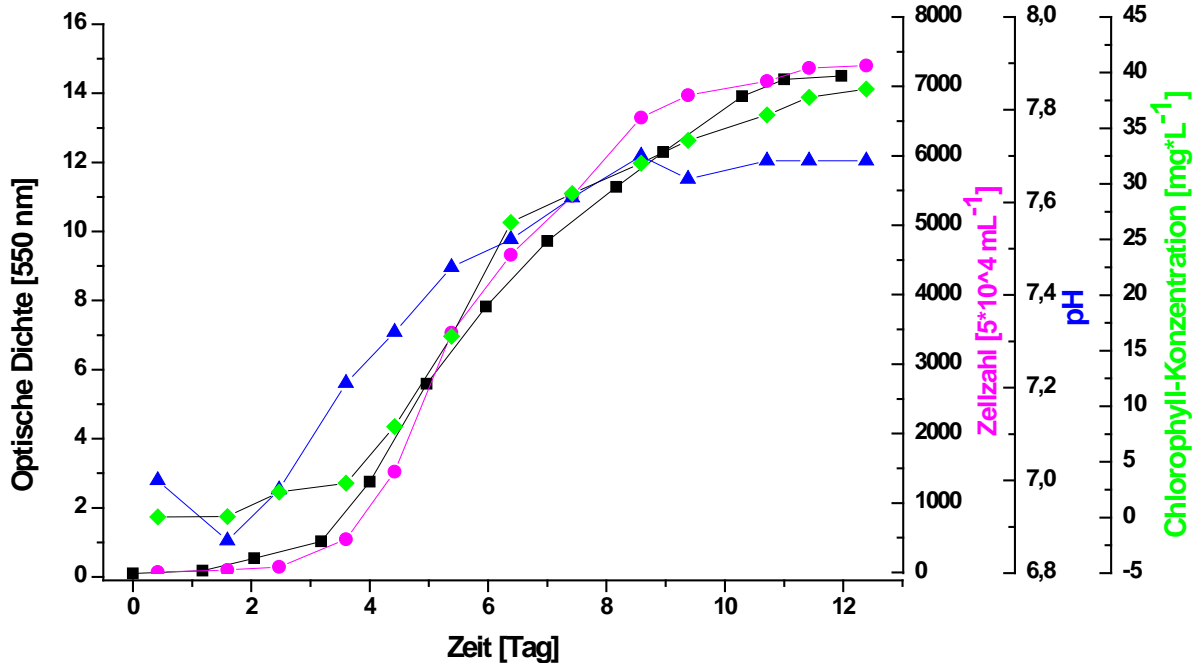


Abbildung 3.26: Verlauf der Optischen Dichte der *Chlorella vulgaris* Kultivierung unter Druckluft-Begasung mit 2 % (v/v) CO_2 mit Zellzahl, Chlorophyll-Konzentration und pH-Wert.

Abbildung 3.26 zeigt die Ergebnisse der *C. vulgaris* Kultivierung mit 2 % CO_2 -Begasung. Bei der Kultivierung ist deutlich zu sehen, dass sich die Optische Dichte und die Zellzahl im Vergleich zu anderen Kultivierungen stark erhöht haben. Die Optische Dichte beträgt in diesem Versuch $\text{OD}_{550} = 15$ und die Zellzahl $4 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$. Dieses Ergebnis belegt, dass die Erhöhung der CO_2 -Konzentration zur Erhöhung der Optischen Dichte und der Zellzahl führt. Die Chlorophyll-Konzentration (Abschnitt 5.1.5.3 im Anhang) liegt mit einem Wert von $38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ebenfalls höher. Je dichter die Zellkultur ist, desto mehr Chlorophyll ist in der Zellsuspension enthalten, aber die Chlorophyllkonzentration in der Biomasse sinkt von 12.7 über 11.4 auf $9.5 \text{ mg} / 10^8$ Zellen mit steigender Zellzahl.

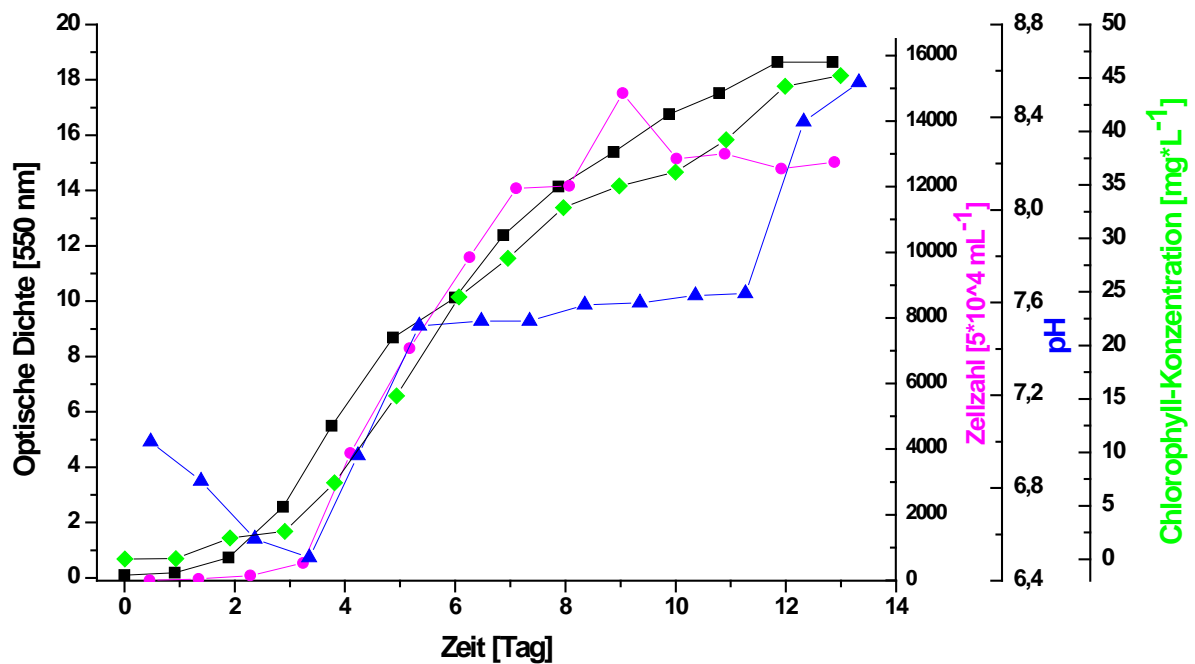


Abbildung 3.27: Verlauf der Optischen Dichte der *Chlorella vulgaris* Kultivierung unter Druckluft-Begasung mit 4 % (v/v) CO_2 mit Zellzahl, Chlorophyll-Konzentration und pH-Wert.

Die *C. vulgaris* Kultivierung mit gesteigerter CO_2 -Begasung von 4 %, dargestellt in Abbildung 3.27, führte zu einer Optischen Dichte von $\text{OD}_{550} = 19$ und einer Zellzahl von $8 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$. Im Vergleich zur Kultivierung mit 2 % (v/v) CO_2 -Begasung erhöhte sich die Optische Dichte um 20 % und die Zellzahl um 30 %. Die höhere Zellzahl kann dadurch erklärt werden, dass aus einer *C. vulgaris* Mutterzelle in einer Teilung bis zu 16 Tochterzellen entstehen können [20]. Bei der langsam steigenden Optischen Dichte erhöht sich die Zellzahl stärker. Die maximale Chlorophyll-Konzentration dieser Kultivierung beträgt $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, was den Maximalwert aller Kultivierungen darstellt.

3.3.1.3. Kultivierungen mit Glucose

Die Mikroalgen können beim Vorhandensein von Glucose auch in Dunkelheit kultiviert werden. Bei solchen Kultivierungen dient die Glucose als Kohlenstoffquelle. Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 3.7 dargestellt. Bei der Kultivierungsart wird neben anderen

Messungen wie Optische Dichte, pH-Wert, Chlorophyll-Konzentration und Zellzahl auch die Glucose-Konzentration (Messmethode: Abschnitt 5.1.5.2 im Anhang) auch gemessen.

Tabelle 3.7: Kultivierungsbedingungen für *Chlorella vulgaris* im Schüttelkolben mit Glucosezusatz.

Kultivierungsbedingungen Schüttelkolben (500 mL)	
Temperatur	RT
Schüttelgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	7
Medium	TAP-Medium mit Glucose (2 und 4 g/L)
Beleuchtungsdauer	16 h/8 h (Hell/Dunkel)

Für die Kultivierungen wurden die Kolben nicht begast und in einem Hell/Dunkel-Zyklus belichtet, 16 h Beleuchtung und 8 h Dunkelheit. Die Phasenlängen im Hell/Dunkel-Zyklus wurden nach Literaturangaben eingestellt.

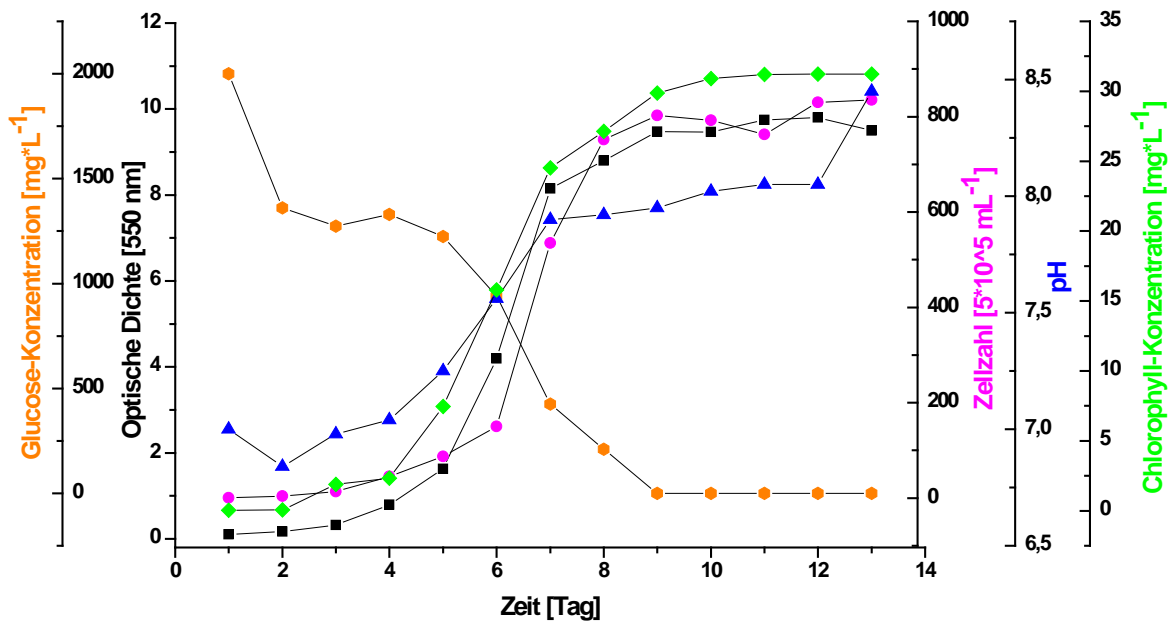


Abbildung 3.28: Verlauf der Optischen Dichte der *Chlorella vulgaris* Kultivierung (mit 2 g·L⁻¹ Glucose) mit Zellzahl, Chlorophyll-Konzentration, Glucose-Konzentration und pH-Wert.

Die Ergebnisse der Kultivierung von *C. vulgaris* sind in Abbildung 3.28 dargestellt. Sie zeigt für die Optische Dichte eine Erhöhung von 30 % im Vergleich zu Standard-Kultivierungen und die Zellzahl verdoppelt sich. Bei den Mikroalgen findet der Vermehrungsprozess durch Zellteilung statt, wobei bei *C. vulgaris* in einer Teilung bis zu 16 Tochterzellen aus einer Mutterzelle entstehen können [20]. Die Zellzahl nimmt zu und die Zellgröße zeigt starke Änderungen je nach Anzahl der entstandenen Zellen bei der Zellteilung. Wenn bei einer Teilung 4 Zellen entstanden sind, sind die Zellen entsprechend größer als wenn bei der Teilung 8 oder 16 Zellen entstanden sind. Die starke Erhöhung der Zellzahl kann folglich mit der hohen Anzahl an Tochterzellen erklärt werden. Die zugeführte Glucose ($2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Anfangskonzentration dieser Kultivierung) war nach 8 Tagen vollständig verbraucht. Das Zellwachstum zeigt ab dem dritten Tag eine starke exponentielle Phase, was auch der hohe Verbrauch der Glucose belegt. Um weitere Einflüsse der Glucose zu bestimmen, wurde die Glucose-Anfangskonzentration im folgenden Experiment auf $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glucose erhöht.

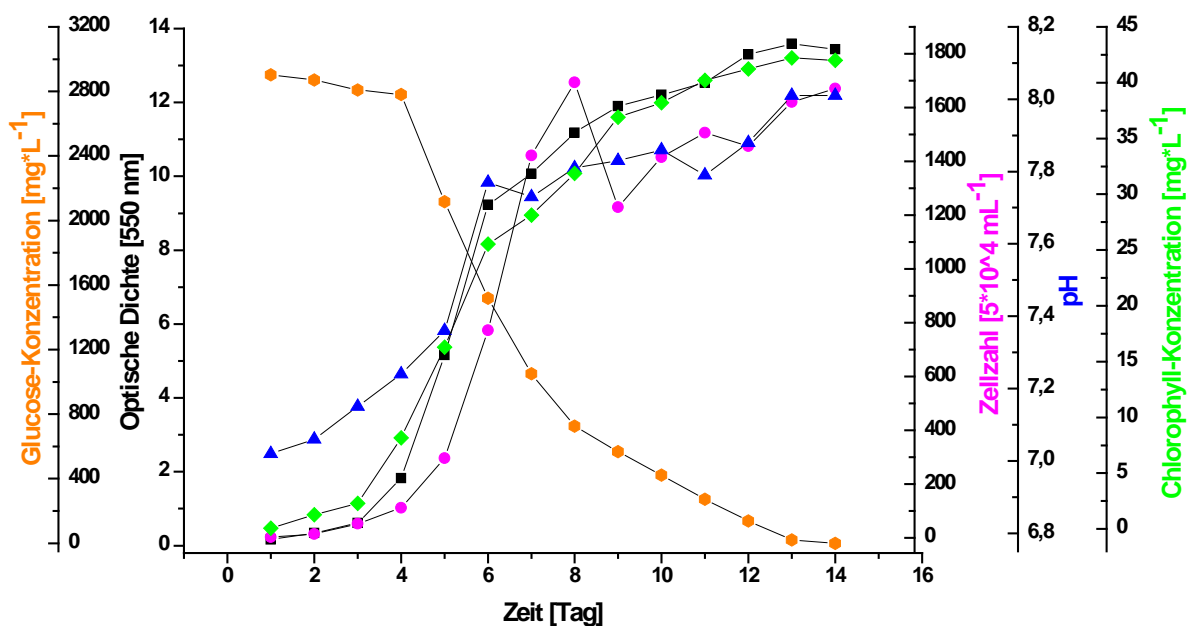


Abbildung 3.29: Verlauf der Optischen Dichte der *Chlorella vulgaris* Kultivierung mit $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glucose mit Zellzahl, Chlorophyll-Konzentration, Glucose-Konzentration und pH-Wert.

In Abbildung 3.29 werden die Ergebnisse der *C. vulgaris* Kultivierung mit $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glucose-Anfangskonzentration gezeigt. Nach 14-tägiger Kultivierung wurde eine Optische Dichte von $\text{OD}_{550} = 13,5$ erzielt. Die Zellzahl am Ende der Kultivierung erreichte den höchsten Wert bei den bisherigen *C. vulgaris* Kultivierungen und beträgt $9 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$. Diese Werte belegen, dass Glucose einen starken Einfluss auf das Wachstum von *C. vulgaris* Zellen ausübt. Bei dieser Kultivierung ist der Verlauf vom pH-Wert ziemlich flach. Der pH-Wert erhöht sich nach 14 Tagen von pH 7 auf pH 8. Die maximale Chlorophyll-Konzentration beträgt $43 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. In der Abbildung ist auch der Verlauf der Glucose-Konzentration dargestellt. Nach 13 Tagen wird die Glucose ($4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Anfangskonzentration) vollständig verbraucht. Die Optische Dichte zeigt nach 5 Tagen einen starken Anstieg, nachdem die Glucose-Konzentration schnell absinkt.

3.3.1.4. Fazit

Für die Kultivierungsprozessoptimierung des *C. vulgaris* wurden mehrere Kultivierungen mit unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Das Ziel der Optimierung war es, eine möglichst hohe Biomasse- und Zellkonzentration zu erreichen. Die Kultivierungen wurden hierbei zunächst im kleinen Maßstab im Schüttelkolben durchgeführt. Alle Kultivierungsexperimente wurden 3 Mal wiederholt. Dabei sollen die Ergebnisse lediglich in Form einer repräsentativen Kultivierung in dieser Arbeit präsentiert werden.

Die Optische Dichte betrug bei der Standard-Kultivierung nach 12 Tagen $OD_{550} = 5,5$ und die Zellzahl erreichte ein Maximum von $2,25 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$. Sowohl Optische Dichte als auch die Zellzahl haben sich bei den Kultivierungen mit Begasung und mit Zusatz von Glucose erhöht. Bei der Kultivierung mit Druckluftbegasung wurde eine $OD_{550} = 6,5$ und eine Zellzahl von $3,75 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ erreicht.

Nach 12 Tagen Kultivierung mit 2 % (v/v) CO_2 -Begasung stieg die Optische Dichte auf den Wert $OD_{550} = 15$ und die Zellzahl auf $6 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$. Im Vergleich zu Kultivierungen mit Druckluftbegasung verdoppelten sich die beiden Werte entsprechend. Der pH-Wert wies sowohl bei Standard-Kultivierung als auch bei der Kultivierung mit Druckluftbegasung einen erwarteten Verlauf mit einem Schlusswert von pH 8,5-9 auf. Die Kultivierung mit CO_2 -Begasung zeigte eine langsame Zunahme des pH-Wertes und erreichte als Höchstwert pH 8, was an dem durch die CO_2 -Begasung im Medium gebildeten H_2CO_3 liegt. Bei der Kultivierung mit 4 % (v/v) CO_2 -Begasung erhöhten sich die Endwerte der Optischen Dichte und der Zellzahl noch weiter. Die Optische Dichte lag nach 13-tägiger Kultivierung bei $OD_{550} = 18$ und die Zellzahl bei $8 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$.

Bei den Kultivierungen mit Glucose als Kohlenstoffquelle wurden die Kolben nicht durchgehend beleuchtet, sondern mit einem Licht/Dunkel-Zyklus in dem Verhältnis von 16 h hell/8 h dunkel. Die Kultivierungsergebnisse mit Glucose zeigen auch höhere Werte der Optischen Dichte und der Zellzahl im Vergleich zu Referenzkultivierungen.

Es kann folgende Schlussfolgerung gezogen werden: Bei den Kultivierungen von *C. vulgaris* kann als Kohlenstoffquelle sowohl Glucose als auch CO_2 verwendet werden. Die Kultivierungen unter CO_2 -Begasung oder mit Zugabe von Glucose zum Medium weisen ein besseres Wachstum als die Standard-Kultivierungen auf. Die Kultivierungen mit 4 % (v/v) CO_2 -Begasung weisen 300 % Erhöhung der gemessenen Werte (Optische Dichte und Zellzahl) auf. Das liegt bei der Kultivierung mit dem Zusatz von Glucose bei 200 % im Vergleich zu den Standard-Kultivierungen.

Bei diesem Stamm wurde auch die höchste Optische Dichte und Zellzahl mit der 4 % CO₂-Begasung erreicht. Der Grund liegt darin, dass die *C. vulgaris* Zellen auch beim Vorhandensein von CO₂ besser wachsen und die Zellen produktiver sind, da die Zellen CO₂ fixieren. Als Kohlenstoffquelle ist auch in diesem Abschnitt Glucose verwendet worden. Aber die 4 % CO₂-Begasung liefert eine um 30 % größere OD₅₅₀ und Zellzahl. Als C-Quelle konnte trotzdem Glucose verwendet werden, weil die Zellkonzentration höher als die der Standard-Kultivierung ist.

Bei der Kultivierungen korreliert die Optische Dichte mit Zellzahl, wobei eine Genauigkeit von 93 % vorlag. Die Zellkonzentration und die Wachstumskurve konnten bei diesem Stamm auch genauso gut wie bei *C. reinhardtii* mit der Zellzahl und/oder der Optischen Dichte definiert werden.

3.3.2. Kultivierungen im Photobioreaktor

Im Anschluss an die Vorversuche im Schüttelkolben wurden die *Chlorella vulgaris* Zellen im entwickelten Photobioreaktorsystem kultiviert. Das Mikroskopsystem und die in-situ Hardware wurden bereits an die *C. reinhardtii* Kultivierungen angepasst. Bei *C. vulgaris* wurde auch das Durchflussmikroskop ISM III XTF zur Kulturüberwachung verwendet, wie dies bei der Beschreibung der *C. reinhardtii* Kultivierungen (vgl. Kap. 3.2.2) zuvor erläutert wurde. Es ist anzumerken, dass Kultivierungen mit hoher Zelldichte schlecht mit dem in-situ Mikroskop zu beobachten sind. Bei hoher Zelldichte wird die Messzone komplett mit den Zellen bedeckt, dadurch die Auswertung der Zellen nicht mehr möglich ist. Dieses Problem kann durch den Einsatz von Durchflussmikroskop gelöst werden, weil bei hoher Zelldichte die Pumpengeschwindigkeit der Pumpe, welcher die Probe zur Messzone des Durchflussmikroskops pumpt, erhöht wird, so dass sich die Zellen von den Silikonschläuchen und der Messzone lösen.

3.3.2.1. Überwachung der Kultivierungen mit dem Durchflussmikroskop

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war die Anpassung des Durchflussmikroskops an die Mikroalgenkultivierungen. Die *C. vulgaris* Zellen (2-10 μm) sind kleiner als die *C. reinhardtii* Zellen (4-20 μm), weshalb in diesen Kultivierungen ein Objektiv mit 20-facher Vergrößerung verwendet wurde. Während der Überwachung des Kultivierungsprozesses von *C. vulgaris* kann die Messzonenhöhe noch klein gehalten werden, da die Zellgröße geringer ist als es bei *C. reinhardtii* der Fall ist. Bei steigender Zelldichte muss die Messzone angepasst werden, sonst verstopfen die Zellen die Messzone und verhindern auf diese Weise die Prozessüberwachung.

Die *C. vulgaris* Kultivierungen wurden im Photobioreaktor mit verschiedenen Prozessbedingungen durchgeführt. Nachfolgend wird nur das Ergebnis der Kultivierung mit der Druckluftbegasung mit 4 % (v/v) CO_2 dargestellt. Die Begasung im Photobioreaktor erfolgt über das Ausgleichsgefäß (Abbildung 3.2 und Abbildung 3.21) und die Begasungsrate beträgt $1.500 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Für die Kultivierungen wurde ein Glasreaktor mit einem Ausgleichsgefäß, in dem die verschiedenen Messsensoren inkl. Durchflussmikroskop über einen Bypass angeschlossen sind, verwendet. Das Gesamtvolumen des verwendeten Systems beträgt 2,3 L. Die Kultivierungsbedingungen sind in der folgenden Tabelle 3.8 zusammengefasst.

Tabelle 3.8: Kultivierungsbedingungen für *Chlorella vulgaris* im Photobioreaktor inkl. Ausgleichsgefäß.

Kultivierungsbedingungen	Photobioreaktor (2,3 L)
Temperatur	RT
Rührgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	7
Medium	TAP-Medium
Begasung	1.500 mL*min ⁻¹ mit 4 % CO ₂ (v/v)
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h

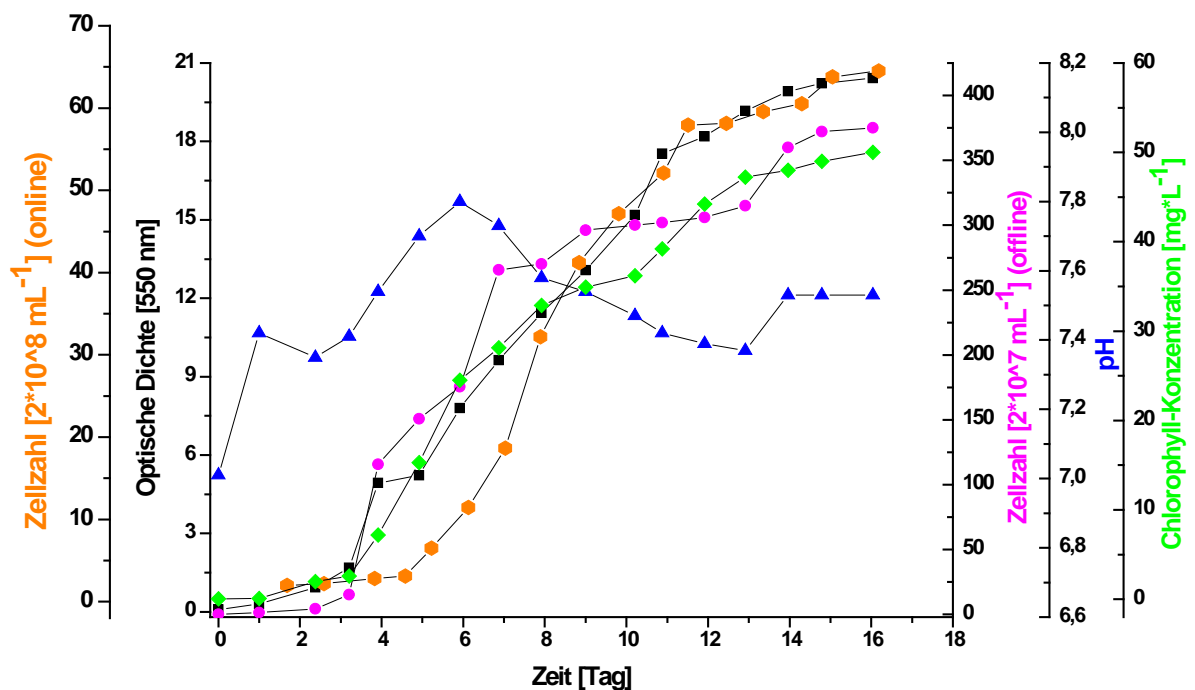
**Abbildung 3.30:** Verlauf der Optischen Dichte während der *Chlorella vulgaris* Kultivierung im Photobioreaktor inkl. Durchflussmikroskop-Überwachung mit Zellzahl, Chlorophyll-Konzentration und pH-Wert.

Abbildung 3.30 zeigt den Verlauf der Kultivierung von *C. vulgaris* im Photobioreaktor unter Verwendung des Durchflussmikroskops. Dargestellt sind die offline ermittelte Optische Dichte bei 550 nm, die online erfassten Zellzahlen, die offline gemessenen Zellzahlen, die berechnete Chlorophyll-Konzentration und der pH-Wert. In den ersten 4 Tagen liegt der Verlauf der Zellzahl sowohl für die online als auch für die offline Messungen in der lag-Phase, nach

5 Tagen geht es in die exponentielle Wachstumsphase über. Die Abweichungen der online Zellzahlen gegenüber der Optischen Dichte oder der offline Zellzahlen kann dadurch erklärt werden, dass bei der hohen Zelldichte die Zellcluster bzw. nebeneinander liegenden Zellen fälschlicherweise automatisch als eine Zelle ausgewertet wurden.

Die Photoreaktorkultivierung des Stammes *C. vulgaris* war erfolgreich. In dem Photobioreaktor wurden bessere Wachstumswerte erreicht als im Schüttelkolben. Bei Kultivierung mit 4 % (v/v) CO₂-Begasung hatte die Optische Dichte einen Wert von OD₅₅₀ = 20 und die Zellzahl betrug 13*10⁹ mL⁻¹. Im Vergleich zu Schüttelkolbenkultivierung erhöht sich die Optische Dichte um 10 %. Die besseren Kultivierungsbedingungen ermöglichten die höheren Zellkonzentrationen im Photobioreaktor.

Das Kultivierungsprozess von *C. vulgaris* konnte genauso gut überwacht und ausgewertet werden wie es bei dem Stamm *C. reinhardtii* der Fall war. Die rundlich-ovale Zellmorphologie (siehe Abb. 5.3 im Anhang für *C. vulgaris*) ermöglichte eine leichte Aufnahme und effektive Auswertung der Bilder. Die Optische Dichte und die Zellzahl korrelieren miteinander sehr gut, sodass aus beiden Messungen eine Genauigkeit von 95 % resultiert. Mit der Optimierung der Auswertungsalgorithmen kann das noch weiter verbessert werden, da gelegentlich die benachbarten Zellen als eine einzige Zelle erkannt werden und folglich auch nur als eine einzige Zelle gezählt werden. Die hohe Messgenauigkeit lässt sich damit begründen, dass die rundlich-ovalen Zellen durch die Aufnahme der Software in-situ Analysis gut erkannt werden und die auf der Messzone anhaftenden Zellen nicht mitgezählt wurden. Im Photobioreaktorsystem konnte nach *C. reinhardtii* der Stamm *C. vulgaris* auch leicht und mit sehr guter Genauigkeit kultiviert und ausgewertet werden.

3.4. Kultivierung von *Haematococcus pluvialis*

Die *Haematococcus pluvialis* Zellen weisen eine runde Morphologie mit einer Zellgröße zwischen 20-80 μm auf. Dieser Stamm ist aufgrund der Astaxanthin Produktion kommerziell relevant und nimmt in der industriellen Produktion von Astaxanthin eine bedeutende Rolle ein. Das durch *H. pluvialis* Kultivierung produzierte Astaxanthin ist angesichts ihrer antioxidativen Wirkung und ihrer tiefroten Farbe in der Lebensmittelindustrie sehr wichtig. Die *H. pluvialis* Zellen brauchen eine intensive Beleuchtung und zeigen während ihres Wachstums drei unterschiedliche Farben. In der ersten Woche sind die Zellen grün gefärbt, in der zweiten Woche wechselt die Farbe von grün bis gelblich-orange und ab der dritten Woche weisen die Zellen eine intensive rote Rostfarbe auf. Die rote Farbe dient gleichzeitig als Nachweis dafür, dass die Zellen Astaxanthin produziert haben [74, 75].

Für die Astaxanthin Produktion müssen die Zellen stark beleuchtet werden [76, 77]. Wenn die Farbe der Kultur von grün auf orange wechselt, wird die Beleuchtung intensiviert, was die Astaxanthin Produktion antreibt und die Ausbeute an Astaxanthin steigt. Da die Optimierung der Astaxanthin Produktion nicht zu den Zielen dieser Arbeit gehörte, wurde die Konzentration von Astaxanthin nicht analytisch bestimmt, und als Indikator der Astaxanthin Produktion wurde die rote Färbung von *H. pluvialis* angenommen [74, 75].

Die Kultivierungen wurden zuerst im Schüttelkolben und anschließend in einem intern beleuchteten Photobioreaktor durchgeführt.

Die bei den Kultivierungen angewendeten Bestimmungsmethoden der einzelnen Prozessgrößen werden im Anhang beschrieben. Insgesamt wurden folgende Prozessgrößen gemessen: OD_{750} (Messmethode siehe Anhang, Abschnitt 5.1.5.1), Glucose-Konzentration (Abschnitt 5.1.5.2), Chlorophyll-Konzentration (Abschnitt 5.1.5.3), Zellzahl (Abschnitt 5.1.5.4) und der pH-Wert (Abschnitt 5.1.5.5). Die Konzentration von Astaxanthin wurde nicht gemessen, daher wird auch keine Methode zur Bestimmung von Astaxanthin im Anhang angeführt. Für die Kultivierungen wurde das MiEB_{12} Medium (Zusammensetzung siehe Anhang, Abschnitt 5.1.2.3) verwendet. Die Vorversuche zeigten, dass dieses Medium für das Wachstum von *H. pluvialis* Zellen optimal geeignet ist.

3.4.1. Kultivierungen im Schüttelkolben

Die *H. pluvialis* Kultivierungen wurden zuerst im Schüttelkolben durchgeführt. Hierbei wurden die Kultivierungsbedingungen optimiert, so dass unter diesen dann die Kultivierungen im

Photobioreaktor fortgesetzt werden konnten. Die Kultivierungen von *H. pluvialis* konnten unter den bisher verwendeten Kulturbedingungen der anderen Stämme nicht durchgeführt werden. So war die Standard-Kultivierung der *H. pluvialis* Zellen ohne Begasung mit CO₂-Anreicherung nicht möglich. Die Zellen wuchsen kaum und der pH-Wert stieg sehr stark an. Auch in Kultivierungen mit Glucose-Zugabe zeigten die *H. pluvialis* Zellen nur geringes Wachstum. Der Grund war hier offensichtlich der Anstieg des pH-Wertes. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit nur die Ergebnisse der Kultivierungen unter Begasung mit 4 % (v/v) CO₂ aufgeführt. Die Daten der Kultivierungen mit keinem oder geringem Wachstum werden nicht erläutert.

Bei Kultivierungen mit 4 % (v/v) CO₂-Begasung konnte der pH-Wert unter Kontrolle gehalten werden. Die durch CO₂-Begasung entstehende Carbonsäure lässt den pH-Wert nicht schnell ansteigen, was ein Wachstum der Zellen ermöglicht. Die in der Kultivierung verwendeten Bedingungen sind in Tabelle 3.9 dargestellt.

Für die Kultivierungen wurden 500 mL Schüttelkolben mit 2 Schikanen verwendet. Die verwendeten Schüttelkolben wurden gleichmäßig beleuchtet und mit 300 mL*min⁻¹ Druckluft, angereichert mit 4 % (v/v) CO₂, begast.

Tabelle 3.9: Kultivierungsbedingungen für *Haematococcus pluvialis* im Schüttelkolben.

Kultivierungsbedingungen	Schüttelkolben (500 mL)
Temperatur	25 °C
Schüttelgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	8,5
Begasung	300 mL min ⁻¹ mit 4 % (v/v) CO ₂
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h
Medium	MiEB ₁₂

Für die Beurteilung des Zellwachstums diente die Messung der Optischen Dichte bei 750 nm als Standard-Analytik. Die Zellzahl wurde offline mit einer Zählkammer und online mit einem Durchflussmikroskop ermittelt. Wie bei anderen Kultivierungen wurden auch hier der pH-Wert und die Chlorophyll-Konzentration bestimmt. Der Grund der Messung bei 750 nm

ist, dass die Wellenlänge nicht im Absorptionbereich von Chlorophyll a und b sein darf. Bei 550 nm ergab die Messung der Optischen Dichte keine reproduzierbaren Ergebnisse.

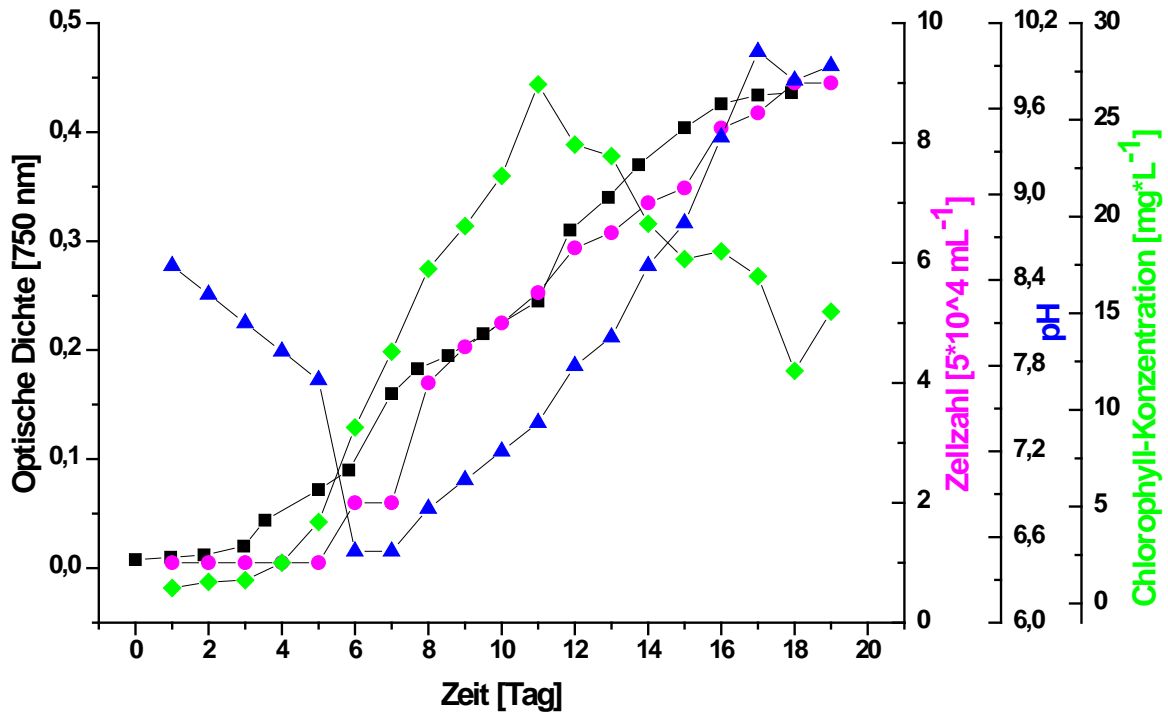


Abbildung 3.31: Verlauf der Optischen Dichte, der Zellzahl, des pH-Wertes und der Chlorophyll-Konzentration während der Kultivierung von *Haematococcus pluvialis* unter Begasung mit 4 % (v/v) CO_2 .

Wie in Abbildung 3.31 zu sehen ist, erreichten die Zellen nach 18 Tagen Kultivierung eine $\text{OD}_{750} = 0,45$ und die maximale Zellzahl betrug $4,5 \cdot 10^5 \text{ mL}^{-1}$. Die Optische Dichte und die Zellzahl weisen somit einen niedrigen Wert auf. Der Grund hierfür ist, dass die Zellen am Boden des Schüttelkolbens sedimentierten und an den Schüttelkolbenwänden stark anhafteten, so dass keine repräsentativen Proben aus der Kultur entnommen werden konnten (die tatsächliche OD_{750} sollte daher höher sein). Die maximale Chlorophyll-Konzentration (Abschnitt 5.1.5.3 im Anhang) betrug $28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Dieser Wert wurde nach 9 Tagen Kultivierung erreicht. Anschließend sank die Chlorophyll-Konzentration wieder, was an der Farbe der Kulturbrühe zu beobachten war. Wie in Abschnitt 2.1.4 erwähnt, produzieren die *H. pluvialis* Zellen Astaxanthin. Wenn die Zellen die Astaxanthin produzierende Phase erreichen, wechselt die Farbe der Kultur von grün auf orange und anschließend auf rot. In diesem Stadium

bauen die Zellen vermutlich Chlorophyll ab, so dass der rote Farbstoff Astaxanthin produziert wird. Das ist auch in der Abbildung 3.31 zu sehen. Bis zum 10. Kultivierungstag stieg die Chlorophyll-Konzentration an. Anschließend bauten die Zellen aufgrund der Astaxanthin-Produktion nochmals das Chlorophyll ab.

3.4.1.1. Fazit

In Abbildung 3.32 ist die Änderung der Morphologie der *H. pluvialis* Zellen während der Schüttelkolbenkultivierung zu erkennen. Die Transformation der begeißelten grünen Zellen zu den roten Aplanosporen konnte mit dem Durchflussmikroskop sowie Lichtmikroskop gut beobachtet werden. Die Aggregation trat in diesem begeißelten Stadium nicht auf. Beim Übergang in das Palmella-Stadium gingen die Geißeln verloren und es bildeten sich langsam Zellaggregate. Die Carotenoide reichern sich erst im Inneren der Chloroplaste an, was mit ihrer strukturellen Veränderung einherging. Danach ist die Distribution von Astaxanthin im Inneren der Zellen homogen (Abbildung 3.32 i).

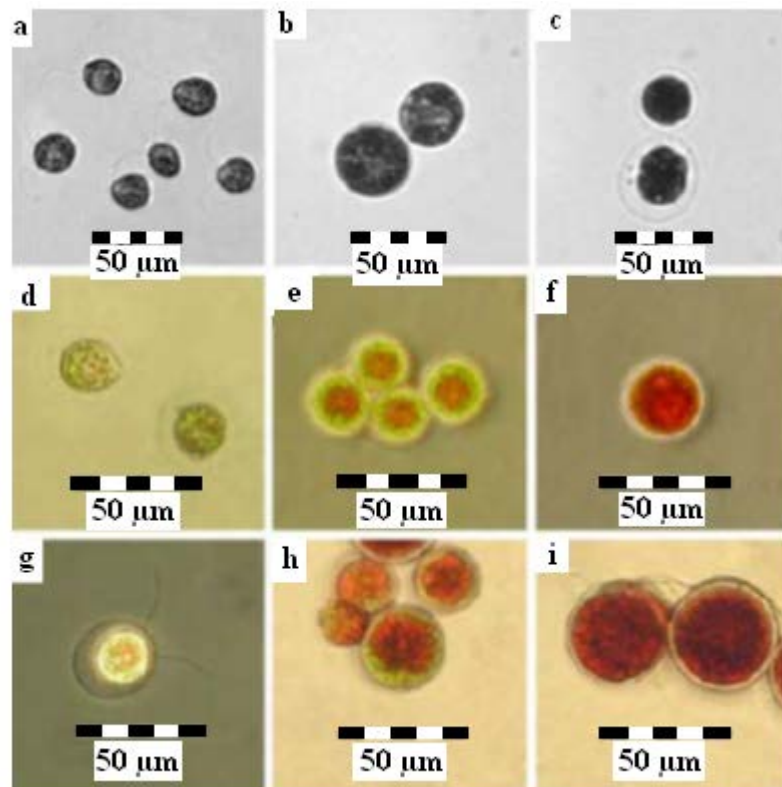


Abbildung 3.32: a) bis i) morphologische Transformation von *H. pluvialis* Zellen (eigene lichtmikroskopische Aufnahme).

Das Hauptproblem der Kultivierung von *H. pluvialis* stellte das Zellwachstum an den Schüttelkolbenwänden dar. Aus diesem Grund liegt die Zellkonzentration im Kulturmedium immer niedriger als ihr Gesamtwert im Schüttelkolben. Die Zellen brauchen während der Astaxa-

nthin-Produktionsphase eine hohe Beleuchtungsintensität, weshalb die *H. pluvialis* Zellen intensiver beleuchtet wurden als die anderen Mikroalgenstämme.

Bei der Kultivierung zeigt die Optische Dichte 90 % Korrelation mit der Zellzahl. *H. pluvialis* Kultivierung konnte im Schüttelkolben unter Laborbedingungen gut und effektiv durchgeführt werden. Aber das hauptsächliche Problem ist, dass sich die Zellen an den festen Oberflächen anlagern. Während der Kultivierung, wie es in der Abbildung 3.32 dargestellt ist, konnte die Farbänderung der Zellen gut beobachtet werden. Die rote Farbe ist schließlich auch ein Beweis für die Astaxanthin-Produktion.

3.4.2. Kultivierungen im Photobioreaktor

Der Kultivierung von *H. pluvialis* im Schüttelkolben folgte die Kultivierung im Photobioreaktor mit Ausgleichsgefäß und Durchflussmikroskop. Der Photobioreaktor bietet bei der Kultivierung Vorteile gegenüber dem Schüttelkolben, weil die Begasung und die Überwachung des pH-Wertes sicherer und einfacher, die Beleuchtung intensiver und gleichmäßig erfolgt. Im Reaktor wurde auch das MiEB₁₂ Medium (Zusammensetzung: Abschnitt 5.1.2.3 im Anhang) als Kulturmedium verwendet. Bei den Kultivierungen von *H. pluvialis* wachsen die Zellen an den Glasoberflächen besonders in der Nähe der Lichtquelle. Die Kultivierung von *H. pluvialis* wurde so geführt, dass zunächst möglichst viel Biomasse unter Standard-Beleuchtung produziert wurde. In der Astaxanthin-Produktionsphase wurde anschließend die Beleuchtungsintensität erhöht. Dazu diente eine zweite Leuchtstoffröhre, die außerhalb des Photobioreaktors platziert war. Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 3.10 dargestellt.

Tabelle 3.10: Kultivierungsbedingungen für *Haematococcus pluvialis* im Photobioreaktor.

Kultivierungsbedingungen	Photobioreaktor (2,3 L)
Temperatur	25 °C
Rührergeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	8,5
Begasung	1.500 mL min ⁻¹ mit 4 % (v/v) CO ₂
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h
Medium	MiEB ₁₂

Die *H. pluvialis* Zellen wurden im Photobioreaktorsystem mit Durchflussmikroskop erfolgreich kultiviert. Die Zellen zeigten auch in diesem System ein gutes Wachstum, obwohl die Zellen stark an der Glasoberfläche anhafteten. Das führte dazu, dass die mit Standard-Analytik gemessenen Konzentrationswerte unter den tatsächlichen im System erreichten Werten lagen. Die mikroskopischen Aufnahmen und die Auswertung der Zellparameter mit dem Durchflussmikroskop waren ohne weiteres möglich. Das Modellorganismus *C. reinhardtii* hat genauso wie *H. pluvialis* eine sphärische Morphologie, weshalb der bestehende Auswertungsalgorithmus direkt für *H. pluvialis* verwendet werden konnte. Der wesentliche Unterschied

zwischen beiden Zelltypen ist die Zellgröße. Die *H. pluvialis* Zellen sind 20-80 μm groß. Bei der Aufnahme der Bilder wurde ein Objektiv mit 10-facher Vergrößerung verwendet.

Die Farbänderung der *H. pluvialis* Zellen während der Kultivierung ist in Abbildung 3.33 gut zu erkennen.

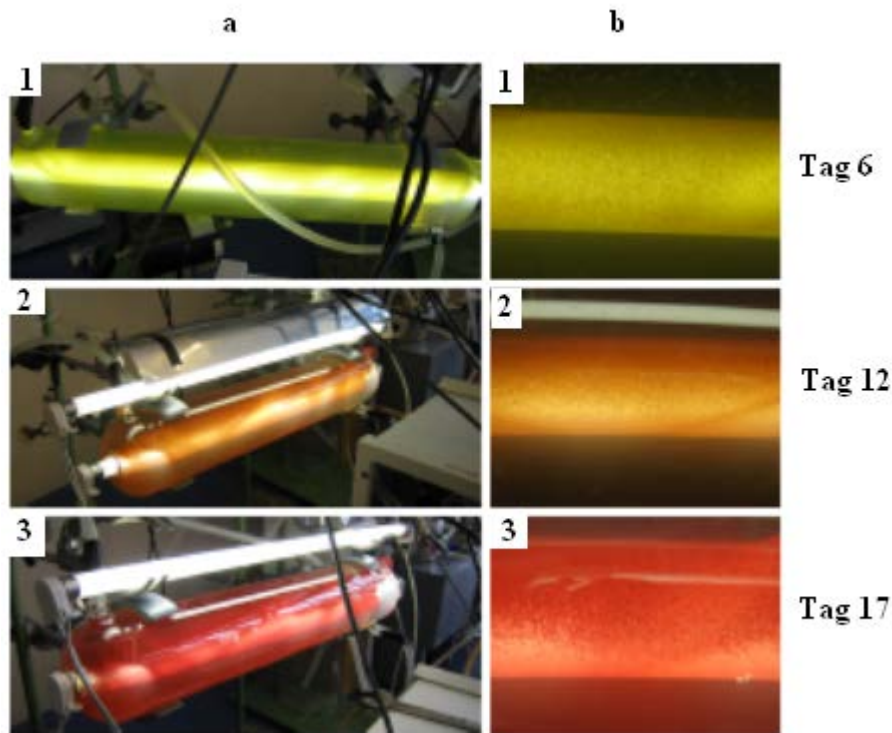


Abbildung 3.33: Die Änderung der Farbe während der Kultivierung von *Haematococcus pluvialis*, **a1-3:** Gesamtes PBR zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten, **b1-3:** Nahaufnahme/ Ausschnittvergrößerung Bereich innere Beleuchtungseinheit.

Wie in Abbildung 3.33 zu sehen ist, setzen sich die Zellen nach einigen Tagen auf dem inneren Tubus ab, weil hier die Lichtintensität am höchsten war. Obwohl der Glasphotobioreaktor silanisiert war, hat das bei der Kultivierung dieses Stammes keinen großen Beitrag geleistet, da die Zellen dennoch an den Glaswänden anhafteten. Aufgrund des Anhaftens der Zellen an der Oberfläche des Reaktors konnte die gewünschte Zelldichte im System nicht erreicht und folglich das genauere Wachstumsverhalten nicht sicher festgestellt werden. Wegen der Sedimentation und des Anhaftens der Zellen an Reaktorwänden enthält das Kulturmedium nur wenig freischwebende Zellen.

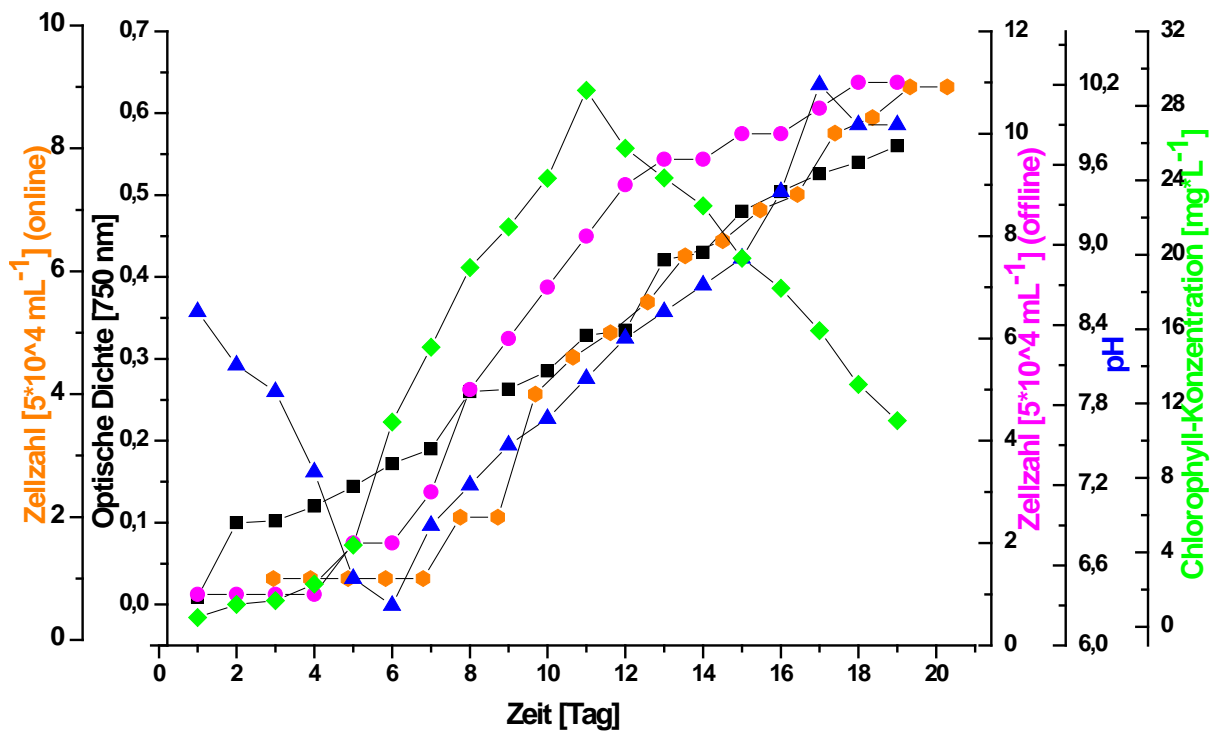


Abbildung 3.34: Verlauf der Optischen Dichte, des pH-Wertes, der Chlorophyll-Konzentration und der Zellzahl (online und offline) während der Kultivierung von *Haematococcus pluvialis* unter Begasung mit 4 % (v/v) CO₂.

Abbildung 3.34 zeigt die Ergebnisse der Kultivierung von *H. pluvialis*. Bei der Photobioreaktorkultivierung wurde neben der offline Zellzahl auch die online Zellzahl bestimmt. Nach 19-tägiger Kultivierung erreichte die Optische Dichte einen Wert von $OD_{750} = 0,55$, die maximale offline bestimmte Zellzahl beträgt $5,5 \cdot 10^5 \text{ mL}^{-1}$ und die online bestimmte Zellzahl betrug $4,5 \cdot 10^4 \text{ mL}^{-1}$. Die Chlorophyll-Konzentration erreichte an Tag 11 einen maximalen Wert von $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ und sank dann wieder fast linear ab, was auf die Bildung des roten Farbstoffes Astaxanthin zurückzuführen ist. Der pH-Wert sank in den ersten 6 Tagen von pH 8,2 bis auf pH 6,2 und stieg anschließend fast linear bis zum Endwert pH 9,9 an Tag 19. Dieser Verlauf könnte damit erklärt werden, dass die *H. pluvialis* Zellen schon von Anfang an mit $60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 4 % (v/v) CO₂ begast wurden. Wegen der geringen Zelldichte wurde CO₂ durch die Zellen nicht vollständig verbraucht. Der pH-Wert steigt mit dem Zellwachstum, da das ins System eingeführte CO₂ von den vervielfachten Zellen sofort verbraucht wird und nicht mehr den pH-Wert herabsenkt. Die CO₂-Begasung wird hier folglich auch dazu verwendet, um den pH-Wert zu regeln. Die Begasung könnte auch anders gestaltet werden. So wäre es möglich,

am Anfang der Kultivierung nur eine geringe CO₂-Begasung bzw. niedrige CO₂-Konzentration in der Begasungsluft zu wählen, weil die Zellen nur geringe Mengen an CO₂ brauchen. Falls die Zellen weiter wachsen und der pH-Wert ansteigt, könnte die CO₂-Konzentration erhöht werden.

Obwohl der Kultivierungsprozess nicht optimal lief, kann abschließend festgehalten werden, dass der Auswertungsalgorithmus für die Bestimmung der Zellzahl gut anwendbar war. Trotz geringer Zellkonzentrationen im Photobioreaktor waren die Überwachung und die Auswertung der Zellzahl möglich. Die online und offline ermittelten Zellzahlen sind gut korrelierbar und zeigen 90 % Genauigkeit. Die intensive Beleuchtung und die bessere Versorgung der Zellen mit CO₂ ermöglicht eine höhere Zellkonzentration im Photobioreaktorsystem. Wie bisherige Mikroalgenstämme konnte *H. pluvialis* auch im Photobioreaktorsystem effektiv kultiviert und mithilfe in-situ Analysis gut ausgewertet werden.

Durch die Beseitigung der Probleme wie die der Sedimentation und das Anhaften der Zellen an die Wände ist die Kultivierung von *H. pluvialis* im Großmaßstab möglich. Dieser Kultivierungsprozess kann auch mit einem Durchflussmikroskop gut überwacht und ausgewertet werden.

3.5. Kultivierung von *Nannochloropsis oculata*

Nannochloropsis oculata Zellen sind mit einer Größe von 1-2 μm relativ klein, rund und besitzen keine ausgeprägten Morphologie Merkmale. Das wirtschaftliche Interesse an *N. oculata* Kultivierungen liegt in den von ihnen produzierten ungesättigten Fettsäuren (PUFA). Die industriell relevante Eigenschaft und die andere Morphologie der Zellen machen diesen Mikroalgenstamm interessant. Aus diesem Grund wird dieser Stamm in dieser Arbeit kultiviert, um die Anwendbarkeit des Durchflussmikroskops breit zu halten. Dieser Mikroalgenstamm wird in salzigem Medium kultiviert, wobei zum Zellwachstum ein alkalischer pH-Bereich benötigt wird. Die Zellen wurden auch hier zunächst im Schüttelkolben kultiviert, anschließend wurden die Kultivierungen in den Photobioreaktor mit Durchflussmikroskop übertragen und online überwacht. Für die Optimierung der Kultivierungsbedingungen und des Wachstums wurden die Kultivierungen mit unterschiedlichen Variationen durchgeführt.

Die bei den Kultivierungen angewendeten Bestimmungsmethoden der einzelnen Prozessgrößen werden im Anhang beschrieben. Insgesamt wurden folgende Prozessgrößen gemessen: OD_{600} (Messmethode siehe Anhang, Abschnitt 5.1.5.1), Glucose-Konzentration (Abschnitt 5.1.5.2), Zellzahl (Abschnitt 5.1.5.4) und der pH-Wert (Abschnitt 5.1.5.5). Für die Kultivierungen wurde das Medium F/2 (Zusammensetzung siehe Anhang, Abschnitt 5.1.2.4) verwendet.

3.5.1. Kultivierungen im Schüttelkolben

Schüttelkolbenkultivierungen stellen einen sehr wichtigen Teil der Prozessoptimierung dar, weil die Durchführung der Kultivierung sich einfach gestalten lässt und die Materialkosten gering sind. Um die Wachstumsbedingung von *N. oculata* genau zu bestimmen, wurden Standard-Kultivierungen, Kultivierungen mit Begasung und mit Glucose-Zugabe durchgeführt. Die Kultivierungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und die Schüttelgeschwindigkeit betrug 100 rpm. Der Anfangs-pH-Wert des Mediums war pH 8,5. Für die Beleuchtung der Schüttelkolben wurden bei verschiedenen Kultivierungsarten immer die gleichen Lichtquellen verwendet. Die Schüttelkolbenkultivierungen wurden in drei Varianten durchgeführt.

3.5.1.1. Standard-Kultivierungen

Standard-Kultivierungen bedeuten, dass die Kultivierung von *N. oculata* im Schüttelkolben mit F/2 Medium (Zusammensetzung: Abschnitt 5.1.2.4 im Anhang) ohne Zusatz und ohne Begasung durchgeführt werden. Bei der Kultivierung betrug die Temperatur 18-25 °C und die Schüttelkolben wurden mit einer Lichtquelle 24 h am Tag beleuchtet. In der Tabelle 3.11 befinden sich die Kultivierungsparameter der Standard-Kultivierungen.

Tabelle 3.11: Kultivierungsbedingungen für die *Nannochloropsis oculata* im Schüttelkolben.

Kultivierungsbedingungen	Schüttelkolben (500 mL)
Temperatur	25 °C
Schüttelgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	8,5
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h
Medium	F/2-Medium

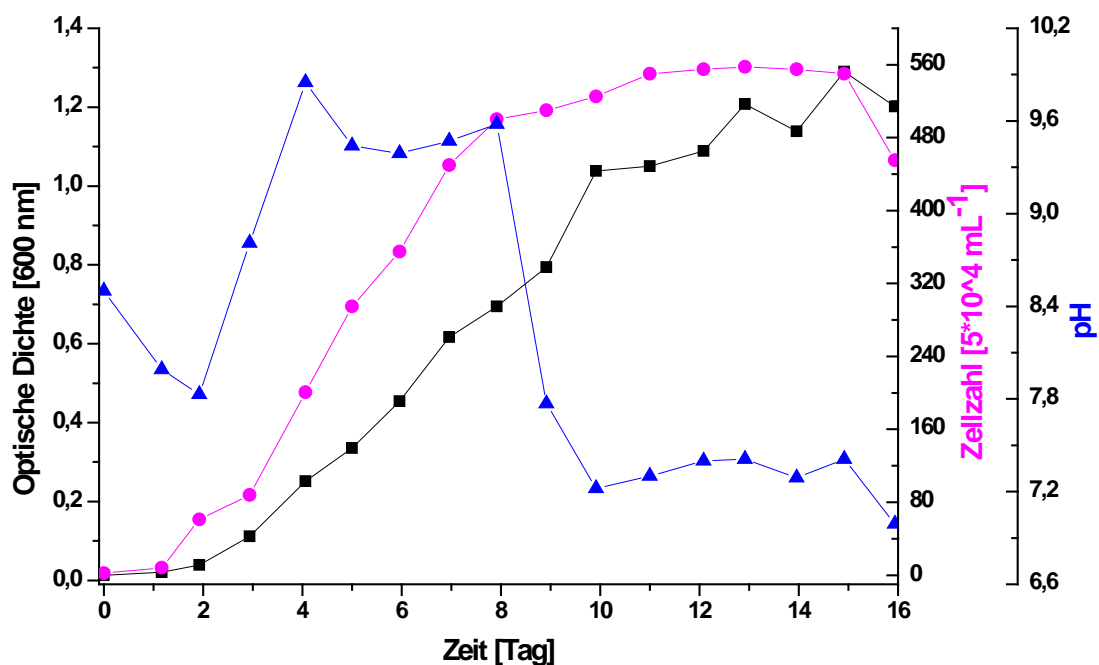


Abbildung 3.35: Verlauf der Optischen Dichte von *Nannochloropsis oculata* Kultivierung mit Zellzahl und pH-Wert.

Die *N. oculata* Kultivierungen wurden zuerst unter Standard-Bedingungen (nur F/2 Medium, ohne Begasung) durchgeführt. Die Optische Dichte wurde bei diesem Stamm bei 600 nm gemessen. In der Abbildung 3.35 werden die Ergebnisse der Standard-Kultivierung präsentiert. Die Optische Dichte erreichte einen Wert von $OD_{600} = 1,2$ und die Zellzahl betrug nach 12 Tagen Kultivierung $2,8 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Der Anfangs-pH-Wert liegt bei pH 8,5 und sank am Ende der Kultivierung auf pH 7,8. Der pH-Wert zeigte während der Kultivierung einen wechselnden Verlauf: Nach dem Kultivierungsstart fiel der Wert anfänglich leicht ab, anschließend stieg er wieder an, und nach einem konstantem Wert (4 h) fiel er erneut ab. Die Ergebnisse der Standard-Kultivierung wurden als Referenzwert für weitere Kultivierungen verwendet.

3.5.1.2. Kultivierungen mit Begasung

Die Kultivierungen mit Begasung wurden in drei verschiedenen Varianten durchgeführt. Als Erstes wurden die Schüttelkolben mit Druckluft begast, im darauffolgenden Experiment wurden jeweils 2 % (v/v) oder 4 % (v/v) CO_2 der Druckluft beigemischt. Der Einfluss von CO_2 auf das Wachstum von *N. oculata* wurde damit bestimmt und experimentell nachgewiesen. Die Parameter wichen lediglich bei der Begasung von den Standard-Kultivierungsbedingungen ab, die anderen Parameter wurden nicht geändert. Die Kultivierungsbedingungen werden in der Tabelle 3.12 dargestellt. Mit diesen Versuchen sollte das Wachstum von *N. oculata* verbessert werden.

Tabelle 3.12: Kultivierungsbedingungen für die *Nannochloropsis oculata* im Schüttelkolben.

Kultivierungsbedingungen Schüttelkolben (500 mL)	
Temperatur	30 °C
Schüttelgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	8,5
Begasung	300 mL min ⁻¹ mit CO_2 (2 und 4 % (v/v))
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h
Medium	F/2-Medium

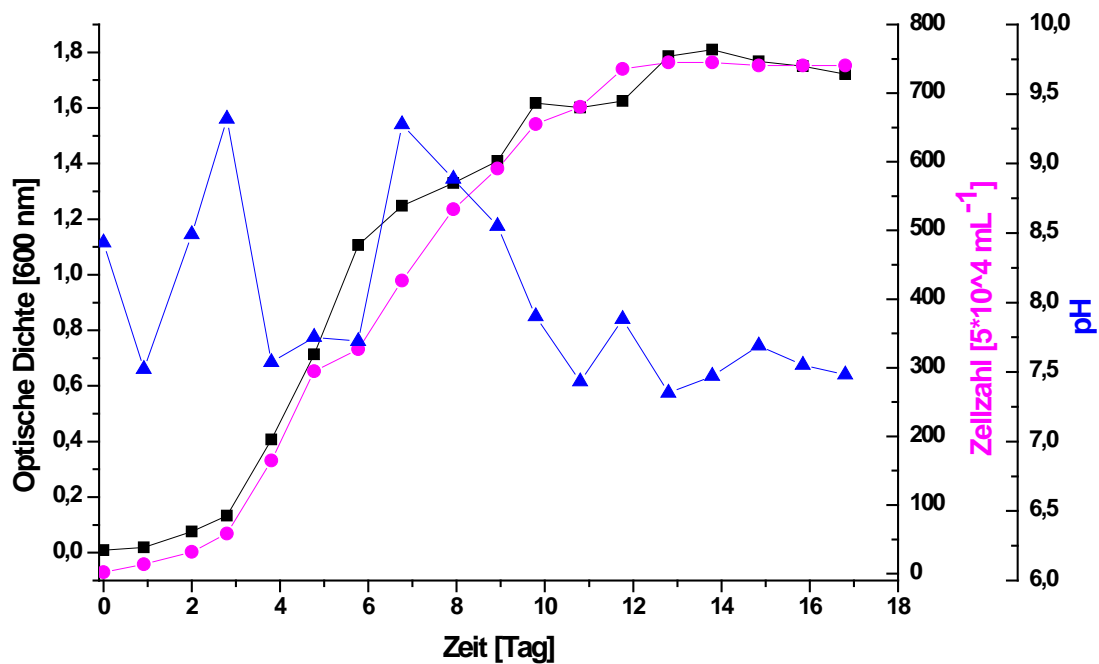


Abbildung 3.36: Verlauf der Optischen Dichte von *Nannochloropsis oculata* Kultivierung (Druckluft- Begasung) mit Zellzahl und pH-Wert.

In der Abbildung 3.36 werden die Ergebnisse der Kultivierung von *N. oculata* mit Druckluft-Begasung dargestellt. Bei dieser Kultivierung wurde eine maximale $OD_{600} = 1,8$ erreicht. Das bedeutet eine Erhöhung der OD_{600} um 50 % im Vergleich zur Kultivierung unter Standard-Bedingungen. Die Zellzahl hat sich von $2,8 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$ auf $3,75 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$, d.h. um 40 % erhöht, was das Erreichen einer höheren Zelldichte durch die Begasung bzw. durch den in der Begasungsluft enthaltenen CO_2 belegt. Der pH-Wert zeigte erneut einen wechselnden Verlauf, der dem Verlauf der Standard-Kultivierung ähnelt.

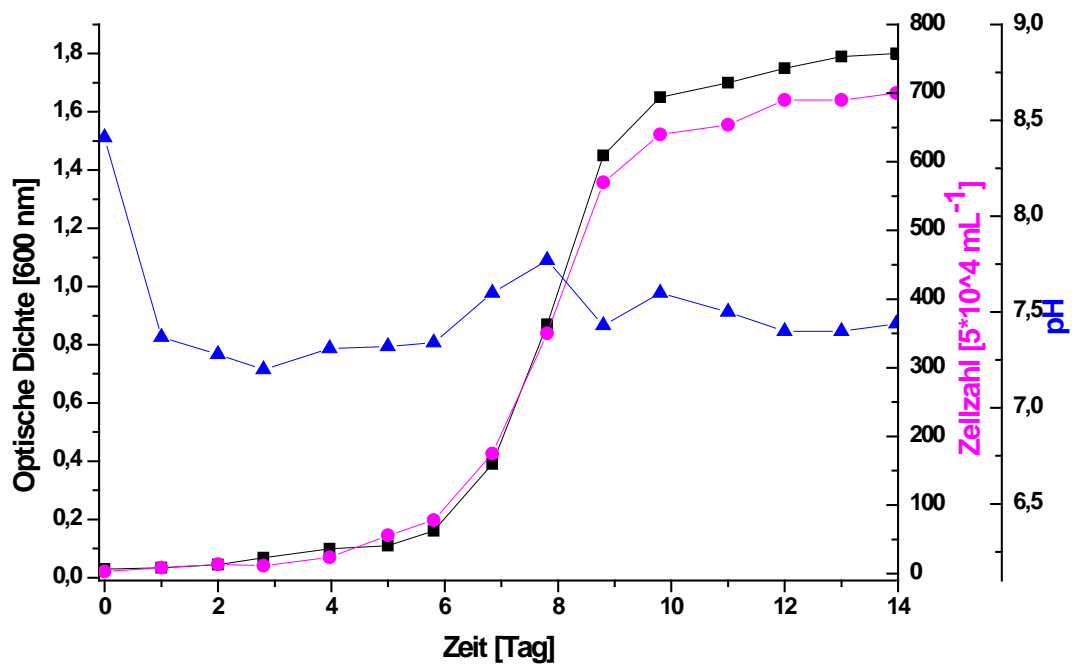


Abbildung 3.37: Verlauf der Optischen Dichte von *Nannochloropsis oculata* Kultivierung (Druckluft-Begasung mit 2 % CO₂ (v/v)) mit Zellzahl und pH-Wert.

In der Abbildung 3.37 werden die Ergebnisse der Kultivierung von *N. oculata* mit Begasung mit 2 % CO₂ präsentiert. Die Kultivierung der *N. oculata* dauerte 14 Tage, mit einer Optischen Dichte von OD₆₀₀ = 1,8 am Ende der Kultivierung. Die maximale Zellzahl betrug $3,5 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Der pH-Wert fiel am Anfang der Kultivierung um etwa 1 Einheit, anschließend schwankte der pH-Wert zwischen pH 7,4 und pH 7,6. Der Verlauf der Optischen Dichte und der Zellzahl ähnelten denen der Kultivierung mit Druckluft-Begasung, obwohl man hier eine höhere Optische Dichte und höhere Zellzahl erwartet hätte. Das liegt wahrscheinlich daran, dass die *N. oculata* Zellen bei einer Kultivierung mit CO₂ Begasung kein besseres Wachstum aufweisen. Bei dieser Kultivierung liegt eine wesentlich ausgeprägtere Lag- und exponentielle Phase vor. Außerdem wurde die stationäre Phase früher erreicht als dies bei den anderen Kultivierungen (Standard-Kultivierung und Kultivierung mit Druckluft Begasung) der Fall war. Am Ende der Kultivierung sind die Optische Dichte und die Zellzahl der Kultivierungen vergleichbar. Die Wachstumsgeschwindigkeit und die Zelldichte hängen bei diesen Kultivierungen eventuell von den vorhandenen Stickstoffmengen ab.

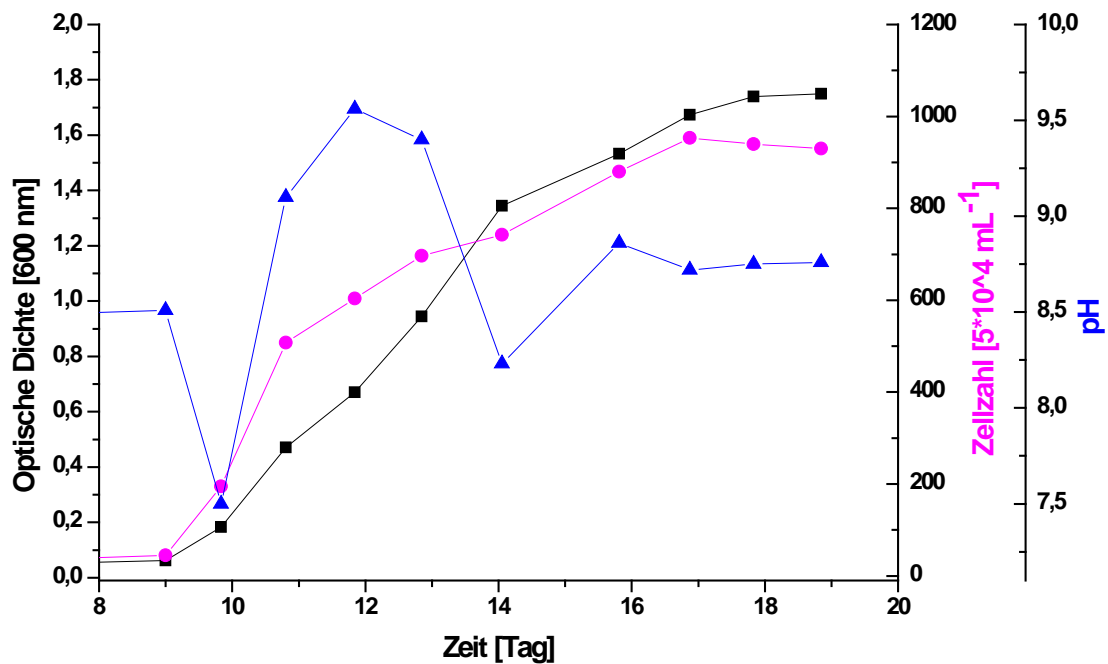


Abbildung 3.38: Verlauf der Optischen Dichte von *Nannochloropsis oculata* Kultivierung (Druckluft-Begasung mit 4 % CO_2 (v/v)) mit Zellzahl und pH-Wert.

Abschließend wurde die Kultivierung durchgeführt, bei der mit 4 % (v/v) CO_2 -Konzentration in der Druckluft begast wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.38 dargestellt. Die Kultivierung dauerte 19 Tage, die Zellen zeigten aber in den ersten acht Tagen kein Wachstum. Die ersten acht Tage werden also in der Abbildung nicht dargestellt. Am Ende der Kultivierung erreichte die Optische Dichte einen Wert von $\text{OD}_{600} = 1,8$. Die Zellzahl betrug $4,5 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Sie war im Vergleich zu anderen Kultivierungen höher und der Verlauf der Optischen Dichte war allen Kultivierungen mit Begasung ähnlich.

3.5.1.3. Kultivierungen mit Glucose

In diesem Kapitel werden Kultivierungsergebnisse dargestellt, die im Medium F/2 mit Glucosezusatz durchgeführt wurden. Bei der Kultivierung dient Glucose als Kohlenstoffquelle. Bei diesen Kultivierungen wurden die Schüttelkolben nicht 24 h am Tag beleuchtet, sondern im Hell/Dunkel-Zyklus in Verhältnis 16/8 h. Die Schüttelkolben wurden des weiteren nicht

begast. Die anderen Kultivierungsparameter waren mit denen der autotrophen Kultivierungen identisch. Die Kultivierungsbedingungen werden in der Tabelle 3.13 zusammengefasst.

Tabelle 3.13: Kultivierungsbedingungen für die *Nannochloropsis oculata* im Schüttelkolben.

Kultivierungsbedingungen Schüttelkolben (500 mL)

Temperatur	Raumtemperatur
Schüttelgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	8,5
Beleuchtungsdauer	16 h/8 h (Licht/Dunkel-Zyklus)
Medium	F/2-Medium mit Glucose (2 g*L ⁻¹ und 4 g*L ⁻¹)

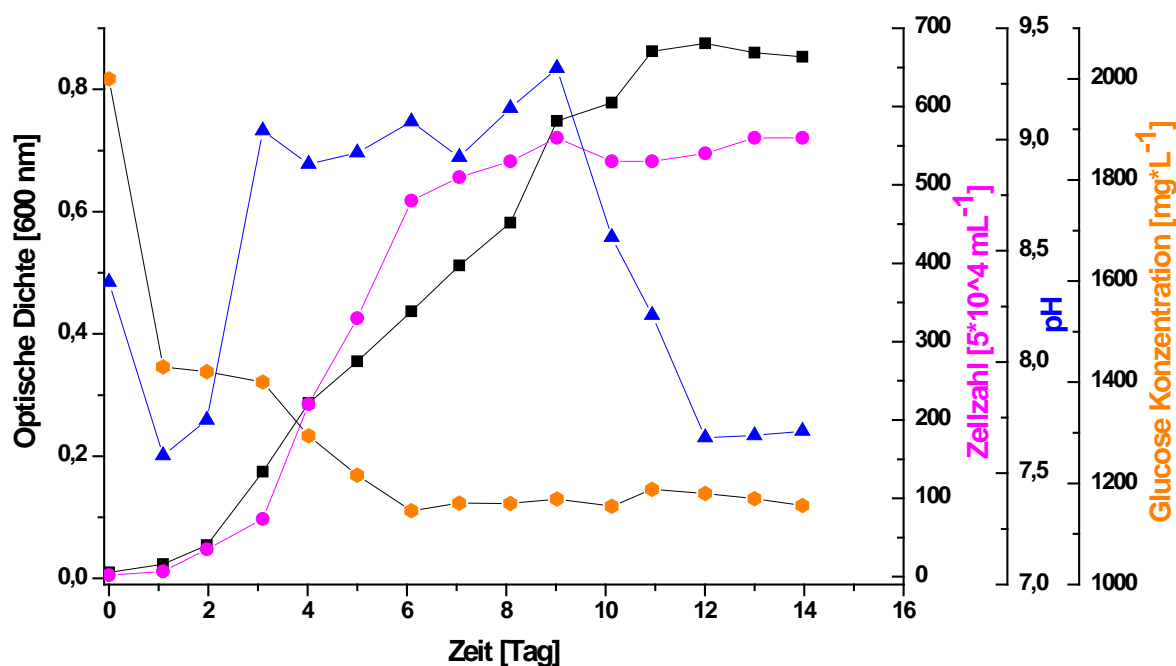


Abbildung 3.39: Verlauf der Optischen Dichte von *Nannochloropsis oculata* Kultivierung (mit 2 g*L⁻¹ Glucose) mit Zellzahl, Glucose-Konzentration und pH-Wert.

Die Abbildung 3.39 zeigt die Ergebnisse der Kultivierung mit 2 g*L⁻¹ Glucose im F/2 Medium. Bei der Kultivierung erreichte die Optische Dichte nach 14 Tagen ihren maximalen Wert

von $OD_{600} = 0,9$. Die Zellzahl betrug $2,8 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Der pH-Wert am Anfang der Kultivierung lag bei pH 8,5, und ist gegen Kultivierungsende auf pH 7,8 abgefallen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann festgehalten werden, dass die *N. oculata* Zellen im Medium mit Glucose kein besseres Wachstum zeigten als unter Standard-Kultivierungsbedingung, was aber nicht den Erwartungen entspricht. Der Grund kann mit der Abbildung 3.39 veranschaulicht werden. Der Graphik ist genau zu entnehmen, dass die Glucose nicht vollständig verbraucht wurde. Die Zellen konnten nur einen Teil der Glucose aufnehmen, der Rest der Glucose ist somit im Kulturmedium verblieben. Kultivierungen mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose wurden 3 Mal wiederholt, mit dem gleichen Ergebnis. Dennoch wurde die Kultivierung auch mit $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose-Konzentration durchgeführt.

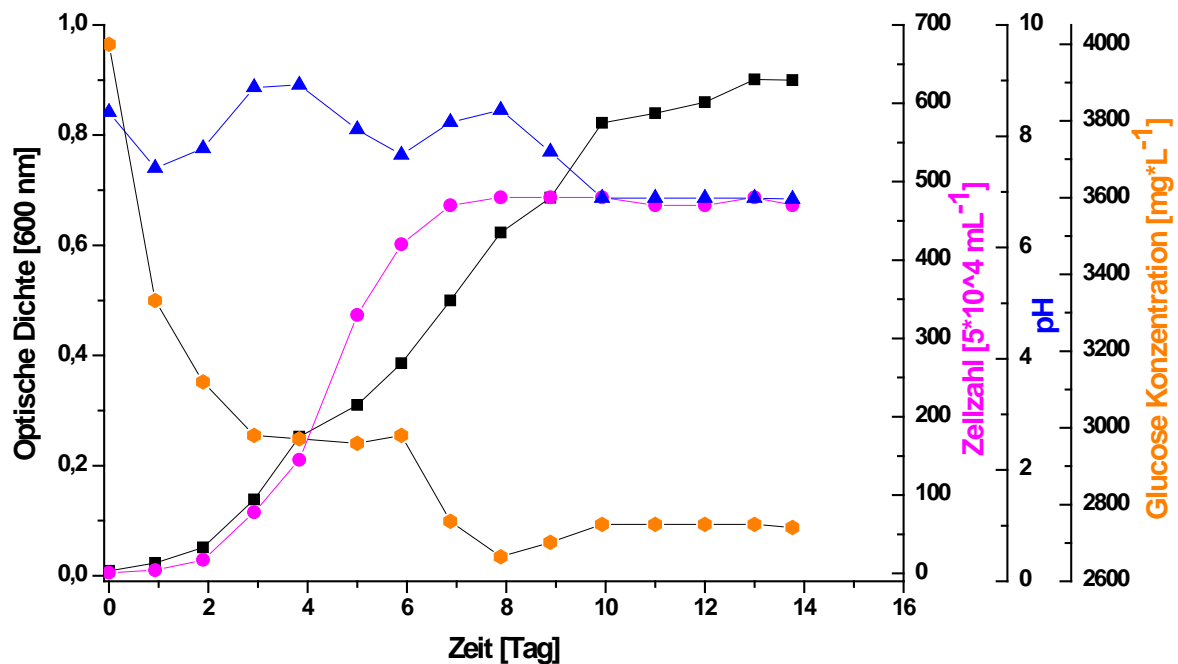


Abbildung 3.40: Verlauf der Optischen Dichte von *Nannochloropsis oculata* Kultivierung (mit $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose) mit Zellzahl, Glucose-Konzentration und pH-Wert.

In der Abbildung 3.40 sind die Ergebnisse der Kultivierung mit $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose-Konzentration dargestellt. Die Kultivierung mit $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose zeigte ein ähnliches Wachstumsverhalten entsprechend der Kultivierung mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose. Die Optische Dichte erreichte bei dieser Kultivierung $OD_{600} = 0,9$, die Zellzahl erreichte $2,5 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Der pH-Wert

hat hier nochmals einen ähnlichen Verlauf gezeigt. Obwohl eine doppelte Glucose-Konzentration im Medium vorlag, sank die Zellzahl am Ende der Kultivierung sogar im Vergleich zu $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glucose. In der oben gezeigten Abbildung 3.40 ist der Verlauf der Glucose-Konzentration gegen die Zeit dargestellt. Das Medium enthält bei dieser Kultivierung $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glucose, die während der Kultivierung erneut nicht vollständig verbraucht wurde. Am Ende der Kultivierung enthielt das Medium noch $2,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glucose.

3.5.1.4. Fazit

In diesem Kapitel wurden die Schüttelkolben-Kultivierungen von *N. oculata* und die dabei erhaltenen Ergebnisse präsentiert. Bei den Kultivierungen gab es keine Schwierigkeiten. Die Kultivierung wurde zuerst in Schüttelkolben und mit dem Medium F/2 ohne Zusatzstoffe durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Kultivierung wurden als Referenz verwendet. Bei den Kultivierungen mit geänderten Kultivierungsbedingungen zeigten manche Ergebnisse einige Verbesserungen im Vergleich zur Referenzkultivierung. Insbesondere bei den Kultivierungen einschließlich der Begasung mit und ohne CO₂-Zusatz stiegen die Optische Dichte und die Zellzahl um etwa 50 % an. Wenn die Schüttelkolben aber mit CO₂ (als C-Quelle) begast wurden, änderten sich die Werte nur geringfügig. Es wurde erwartet, dass bei steigender CO₂ Konzentration auch die Zellkonzentration sprunghaft ansteigt, wie bei den anderen kultivierten Mikroalgenstämmen (z.B. *C. reinhardtii*, *C. vulgaris* usw.). Die Anwesenheit einer C-Quelle führte nicht zwangsläufig zu einer Verbesserung, daher kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen nicht in hohem Maße Photosynthese betreiben. Die Zellen wurden auch in F/2 Medium mit unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen kultiviert. Die Ergebnisse zeigten ein noch schlechteres Wachstumsverhalten als bei der Standard-Kultivierung. Die Mikroalge *N. oculata* konnte auch bei Vorhandensein von Glucose nicht kultiviert werden. Wie bei den Kultivierungen mit Glucose zu sehen war, wurde die Glucose während der Kultivierung nicht vollständig verbraucht. Es liegt nahe, dass die Glucose auf die *N. oculata* Zellen einen wachstumshemmenden Einfluss ausübt. Im gesamten Abschnitt zeigten die Zellen nicht so gute Optische Dichte-Zellzahl-Korrelation wie bei anderen Mikroalgenstämmen (*C. reinhardtii*, *C. vulgaris* und *H. pluvialis*). Bei der Druckluft-Begasung und mit 2 % (v/v) CO₂ Begasung ist die Korrelation zwischen der Optischen Dichte und Zellzahl 91 %. Bei den anderen Kultivierungen sind die Optische Dichte und Zellzahl nicht so gut korrelierbar. Das liegt vermutlich daran, dass die Zellen nicht so hohe Verdopplungszeiten und Verdopplungsraten aufweisen. Bei schnell wachsenden Zellen bleibt die Zellzahl niedrig, obwohl hier eine größere Optische Dichte gemessen wurde.

3.5.2. Kultivierungen im Photobioreaktor

Als nächster Schritt wurden die Kultivierungen von *N. oculata* im Photobioreaktorsystem durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen wurden bei der Übertragung vom Schüttelkolben zum Photobioreaktor nur bezüglich der Begasungsrate geändert (Erhöhung von $300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ auf $1.500 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), es wurde weiterhin das F/2 Medium verwendet.

In der Photobioreaktorkultivierungen von *N. oculata* wurde ein Photobioreaktor mit Ausgleichsgefäß und Durchflussmikroskop verwendet. Das gesamte Volumen des Systems betrug 2,3 L. Der Photobioreaktor und das Ausgleichsgefäß sind mit Silikonschläuchen miteinander verbunden und die Kulturbrühe wird mit Hilfe einer Peristaltikpumpe zirkulär gepumpt. Für das Durchflussmikroskop wurde eine zweite, kleinere Peristaltikpumpe verwendet. Die Temperatur im Reaktor wurde mit einem Temperaturfühler im Ausgleichsgefäß, das an die Biostat B Steuereinheit angeschlossen wurde, überwacht. Die Begasung betrug $1.500 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ mit 4 % (v/v) CO_2 . Die Rührgeschwindigkeit im Ausgleichsgefäß war 100 rpm. Der Photobioreaktor wurde mit der Lichteinheit Osram W 640 beleuchtet. Für die Überwachung des Kultivierungsprozesses wurde ein Objektiv mit 20-facher Vergrößerung verwendet. Das Objektiv muss besonders sorgfältig eingestellt werden, da die *N. oculata* Zellen mit 1-2 μm sehr klein sind und bei einer nicht genauen Einstellung die Bildschärfe für eine Auswertung nicht ausreichend ist. Die Aufnahme wurde mit einem anderen Objektiv, das eine noch höhere Vergrößerung bietet, nicht durchgeführt. Die feine Einstellung der Parameter war nicht möglich. Die in der Kultivierung eingestellten Bedingungen sind in der Tabelle 3.14 zusammengefasst.

Tabelle 3.14: Kultivierungsbedingungen für die *Nannochloropsis oculata* im Photobioreaktor.

Kultivierungsbedingungen	Schüttelkolben (2,3 L)
Temperatur	25 °C
Rührgeschwindigkeit	100 min^{-1}
pH	8,5
Begasung	$1.500 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ mit 4 % CO_2 (v/v)
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h
Medium	F/2-Medium

Im entwickelten System war die Kultivierung von *N. oculata* möglich und die Zellen sind im Photobioreaktor gut gewachsen. Aufgrund der nicht vorhandenen Auswertungsalgorithmen konnten die Bilder nicht ausgewertet werden.

3.6. Kultivierung von *Phaeodactylum tricornutum*

Die Kultivierung von *Phaeodactylum tricornutum* stellt die vorletzte Kultivierung, die in dieser Arbeit dargestellt wird, dar. Die Zellen von *P. tricornutum* sind relativ klein, denn die Zellgröße liegt zwischen 1-2 μm . Anders als die *N. oculata* Zellen besitzen *P. tricornutum* Zellen an beiden Seiten Flagellen. Die Kultivierungsbedingungen stimmen nahezu mit denen der *N. oculata* überein. Das wirtschaftliche Interesse an *P. tricornutum* liegt in der Ölproduktion, die für alternative Kraftstoffproduktion geeignet ist. Daher besteht Interesse, diese Art des Mikroalgenstamms zu kultivieren.

Die bei den Kultivierungen angewendeten Bestimmungsmethoden der einzelnen Prozessgrößen werden im Anhang beschrieben. Insgesamt wurden folgende Prozessgrößen gemessen: OD_{600} (Messmethode siehe Anhang, Abschnitt 5.1.5.1), Glucose-Konzentration (Abschnitt 5.1.5.2), Zellzahl (Abschnitt 5.1.5.4) und der pH-Wert (Abschnitt 5.1.5.5). Für die Kultivierungen wurde das Medium F/2 (Zusammensetzung siehe Anhang, Abschnitt 5.1.2.4) verwendet.

3.6.1. Kultivierungen im Schüttelkolben

Wie bei den übrigen Stämmen, wurde *P. tricornutum* zuerst im 500 mL Schüttelkolben mit 2 Schikanen kultiviert. Die Kultivierung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und die Schüttelgeschwindigkeit des Inkubators betrug 100 rpm. Als Kultivierungsmedium diente das F/2 Medium mit einem anfänglichen pH-Wert von pH 8,5.

Um die optimalen Kultivierungsparameter von *P. tricornutum* zu bestimmen, wurden die Schüttelkolben-Kultivierungen mit verschiedenen Parametern durchgeführt. In den genannten Kultivierungsgruppen wurden die einzelnen Kultivierungen auch mit verschiedenen Parametern durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Kultivierungen werden im Folgenden erläutert.

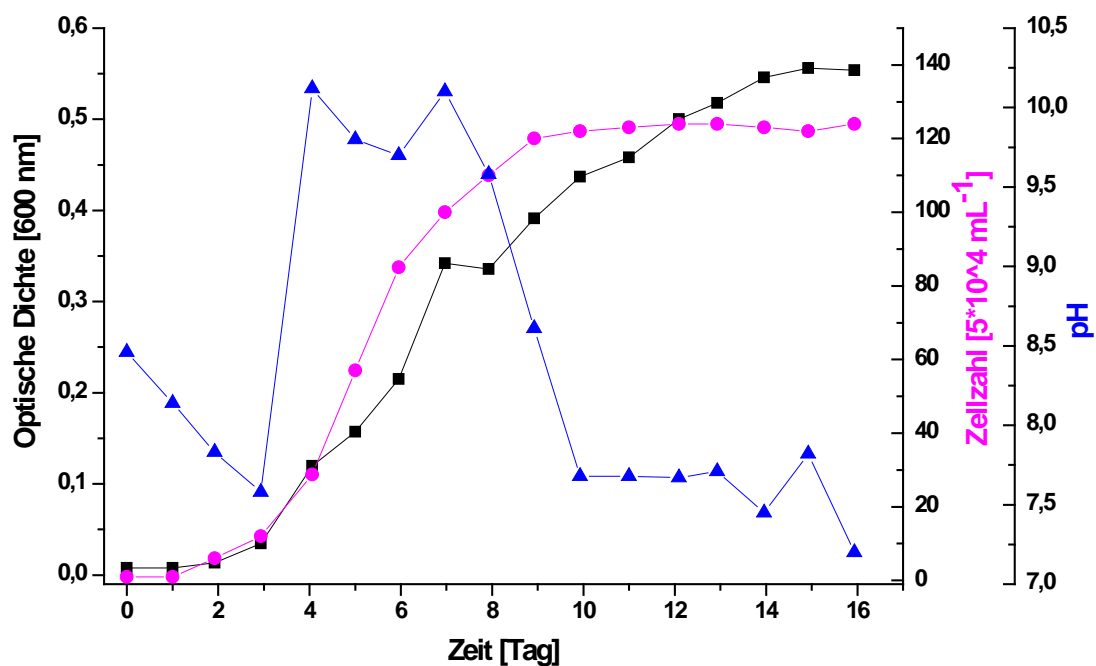
3.6.1.1. Standard-Kultivierungen

Unter Standard-Kultivierungen werden Kultivierungen im F/2 Medium ohne Glucose und ohne Begasung verstanden. Das Kultivierungsgefäß war ein 500 mL Schüttelkolben mit zwei Schikanen. Die in der Kultivierung verwendeten Bedingungen werden in der folgenden Tabelle 3.15 dargestellt.

Tabelle 3.15: Kultivierungsbedingungen für die *Phaeodactylum tricornutum* im Schüttelkolben.

Kultivierungsbedingungen	Schüttelkolben (500 mL)
Temperatur	RT
Schüttelgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	8,5
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h
Medium	F/2-Medium

Die Kultivierung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, die Schüttelgeschwindigkeit betrug 100 rpm. Die gleich befüllten Schüttelkolben werden auf dem Schüttler platziert und gleichmäßig beleuchtet.

**Abbildung 3.41:** Verlauf der Optischen Dichte von *Phaeodactylum tricornutum* Kultivierung mit Zellzahl und pH-Wert.

Die Abbildung 3.41 zeigt die Ergebnisse der Standard-Kultivierung. Nach 16-tägiger Kultivierungsdauer erreichte die Optische Dichte einen Wert von $OD_{600} = 0,58$ und die maximale

Zellzahl betrug $6,5 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$. Die Optische Dichte und die Zellzahl zeigten ab dem Tag 4 ein schnelles Wachstum. Der pH-Wert hatte am Anfang der Kultivierung einen Wert von pH 8,5 und am Ende der Kultivierung pH 7. Der pH-Wert zeigte keinen regelmäßigen Verlauf an, sondern schwankte während der gesamten Kultivierungsdauer.

3.6.1.2. Kultivierungen mit Begasung

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Kultivierungen mit Begasung mit und ohne CO_2 zusammengefasst. Die Kultivierungsbedingungen unterscheiden sich von denen der Standard-Kultivierung nur dadurch, dass die Begasung der Schüttelkolben anders erfolgt. Die Begasung erfolgte nämlich auf drei verschiedene Arten: Eine Druckluft-Begasung, Begasung mit 2 % (v/v) CO_2 in der Druckluft und Begasung mit 4 % (v/v) CO_2 in der Druckluft. Damit wurde untersucht, wie die Zufuhr von Kohlenstoff in der Form von CO_2 das Wachstum der Zellen beeinflusst. Die verwendeten Kultivierungsbedingungen werden in der Tabelle 3.16 dargestellt.

Tabelle 3.16: Kultivierungsbedingungen für *Phaeodactylum tricornutum* im Schüttelkolben

Kultivierungsbedingungen	Schüttelkolben (500 mL)
Temperatur	RT
Schüttelgeschwindigkeit	100 min^{-1}
pH	8,5
Begasung	300 mL min^{-1} mit und ohne CO_2
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h
Medium	F/2-Medium

In diesem Kapitel wurde die erste Kultivierung mit Druckluftbegasung gestartet. Die Ergebnisse der Kultivierung werden in der nächsten Abbildung 3.42 dargestellt.

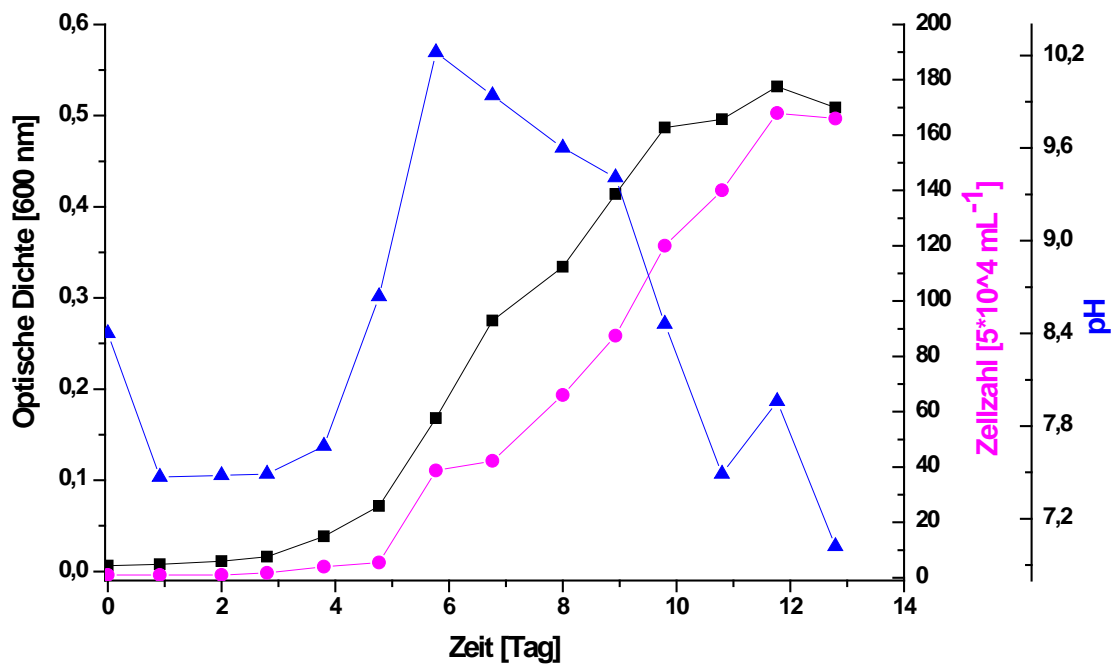


Abbildung 3.42: Verlauf der Optischen Dichte von *Phaeodactylum tricornutum* Kultivierung (Druckluft- Begasung) mit Zellzahl und pH-Wert.

Nach 13-tägiger Kultivierung mit Druckluftbegasung wurde eine $OD_{600} = 0,52$ erreicht. Die Zellzahl erreichte $8,5 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ und zeigte im Vergleich zu der Standard-Kultivierung eine 20 % Erhöhung, bei gleichbleibender Zellzahl. Der Verlauf des pH-Wert ähnelte dem Verlauf der Standard-Kultivierung.

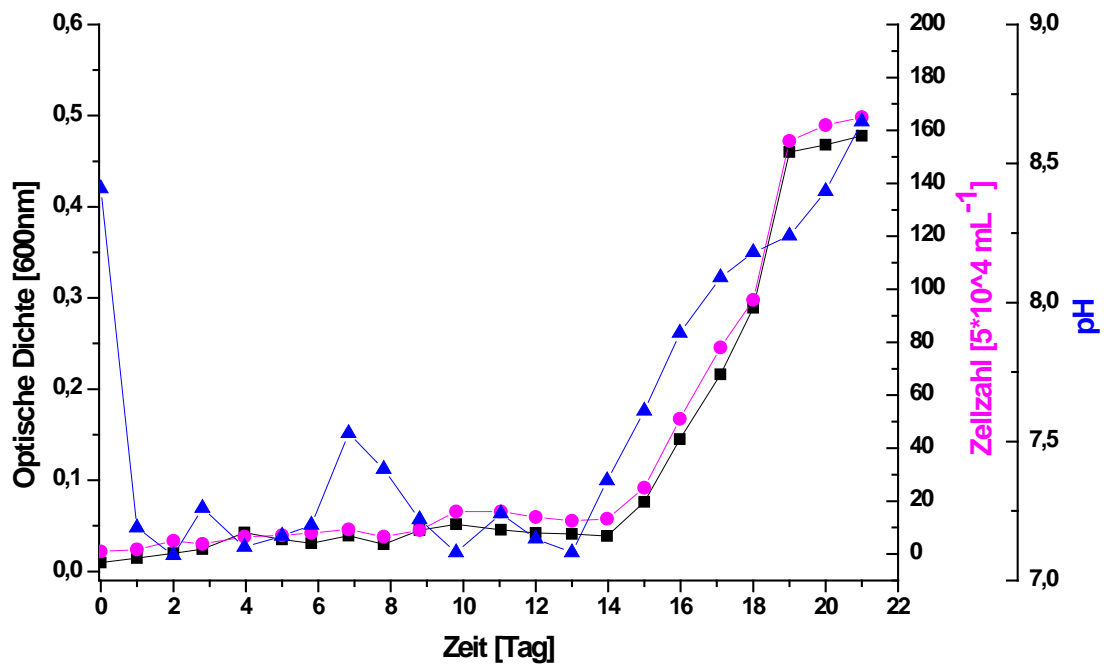


Abbildung 3.43: Verlauf der Optischen Dichte von *Phaeodactylum tricornutum* Kultivierung (Druckluft- Begasung mit 2 % (v/v) CO₂) mit Zellzahl und pH-Wert.

Die Abbildung 3.43 enthält die Ergebnisse der Kultivierung, die mit 300 mL*min⁻¹ von 2 % (v/v) CO₂ begast wurde. Bei dieser Kultivierung wurde nach 21-tägiger Kultivierung eine OD₆₀₀ = 0,5 erreicht. Die Zellzahl erreichte 8,5*10⁶ mL⁻¹ und zeigte im Vergleich zu der Standard-Kultivierung eine 20 % Erhöhung, bei gleichbleibender Zellzahl. Der pH-Wert sank in den ersten zwei Tagen, ab dem dritten Tag stieg er langsam bis auf pH 9 an.

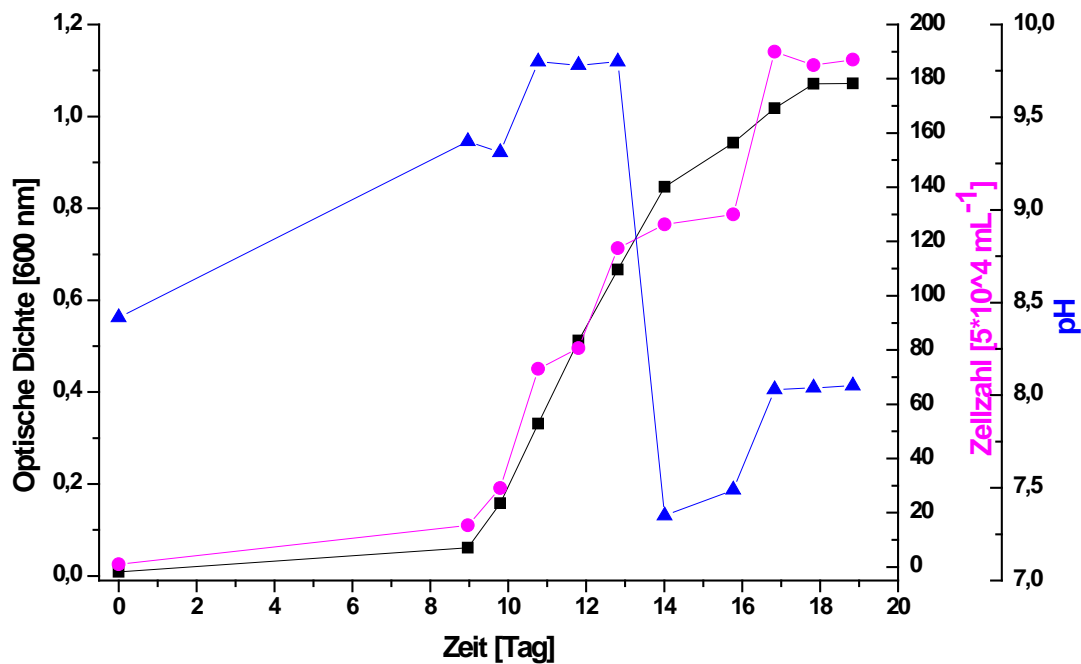


Abbildung 3.44: Verlauf der Optischen Dichte von *Phaeodactylum tricornutum* Kultivierung (Druckluft- Begasung mit 4 % (v/v) CO_2) mit Zellzahl und pH-Wert.

Die Ergebnisse der Kultivierung werden in der Abbildung 3.44 dargestellt. Die Zellen zeigten erst nach 9 Tagen ein Wachstum. Die maximale Optische Dichte betrug nach 19 Tagen $\text{OD}_{600} = 1,1$ und die maximale Zellzahl war $1 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$. So lange die Zellen kein Wachstum zeigten, wurden keine Messungen durchgeführt. Der pH-Wert stieg von pH 8,5 auf pH 10 bis zum Tag 13 der Kultivierung, dann sank er plötzlich auf pH 7,5 und anschließend stieg er langsam wieder an.

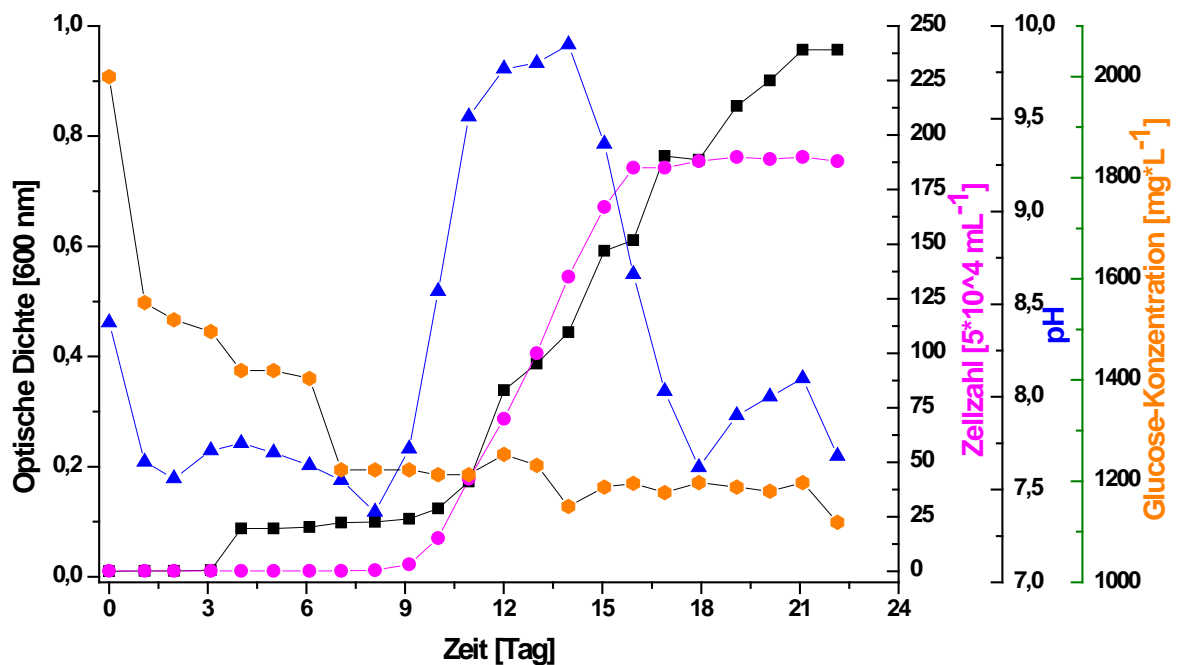
3.6.1.3. Kultivierungen mit Glucose

Die *P. tricornutum* Zellen wurden auch mit Glucosezusatz kultiviert. Die Kultivierungen wurden im F/2 Medium mit unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen durchgeführt. Bei diesen Kultivierungen wurden die Schüttelkolben nicht dauerhaft beleuchtet, sondern in einem Hell/Dunkel-Zyklus, 16 h hell und 8 h dunkel. Die Schüttelkolben wurden nicht begast. Die Kultivierungsbedingungen werden in der Tabelle 3.17 dargestellt.

Tabelle 3.17: Kultivierungsbedingungen für die *Phaeodactylum tricornutum* im Schüttelkolben.

Kultivierungsbedingungen Schüttelkolben (500 mL)	
Temperatur	RT
Schüttelgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	8,5
Beleuchtungsdauer	16 h/8 h (Licht/Dunkel-Zyklus)
Medium	F/2-Medium mit Glucose (2 g*L ⁻¹ und 4 g*L ⁻¹)

Die Kultivierungen wurden mit zwei verschiedenen Glucose-Konzentrationen (2 g*L⁻¹ und 4 g*L⁻¹) zu Beginn der Kultivierung durchgeführt. Hierbei wurde untersucht, welchen Einfluss der Glucosezusatz auf das Wachstum ausübt. Außer der verschiedenen Anfangskonzentration von Glucose im Medium waren alle anderen Kultivierungsparameter mit denen der Standard-Kultivierung identisch.

**Abbildung 3.45:** Verlauf der Optischen Dichte von *Phaeodactylum tricornutum* Kultivierung (mit 2 g*L⁻¹ Glucose) mit Zellzahl, Glucose-Konzentration und pH-Wert.

Nach 22-tägiger Kultivierung betrug die $OD_{600} = 1$ und die Zellzahl erreichte $9,5 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$. Die Zellzahl zeigte erst nach 9 Tagen einen starken Wachstumssprung, und zeitgleich stieg auch der pH-Wert an. Der pH-Wert schwankte während der Kultivierung deutlich und am Ende der Kultivierung hatte er einen Wert von pH 7,5. In der Abbildung 3.45 ist der Verlauf der Glucose-Konzentration dargestellt. Die Anfangskonzentration der Glucose betrug $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Nach 22 Tagen war im Medium noch $1,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose vorhanden. Die Kultivierung wurde beendet, nachdem eine konstante Optische Dichte und Zellzahl erreicht wurde. Bis zum 8. Kultivierungstag fällt die Glucose-Konzentration sehr stark ab, dennoch konnte in diesem Zeitraum kein starkes Zellwachstum beobachtet werden.

Die Glucose wurde bei dieser Kultivierung nicht vollständig verbraucht. Trotzdem wurde die Kultivierung mit einer Glucose-Konzentration von $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ durchgeführt. Die Kultivierung mit dieser Glucose-Konzentration war nicht erfolgreich, da trotz 3-maliger Versuche die Zellen keinerlei Wachstum zeigten.

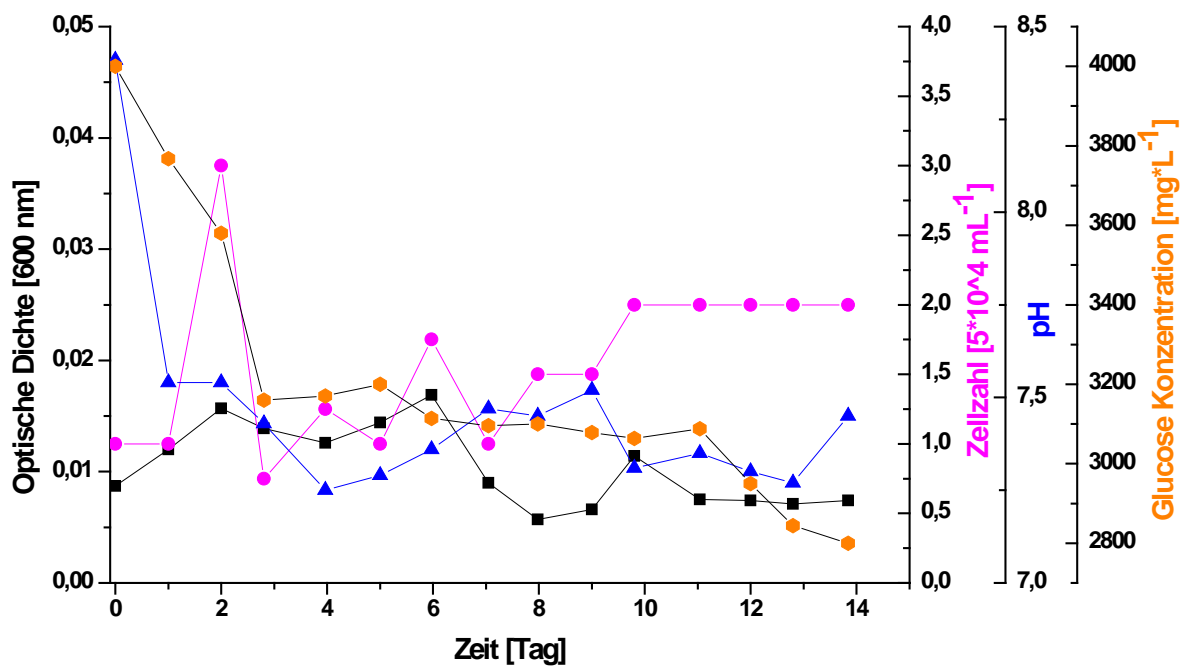


Abbildung 3.46: Verlauf der Optischen Dichte von *Phaeodactylum tricornerum* Kultivierung (mit $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose) mit Zellzahl, Glucose-Konzentration und pH-Wert.

In der Abbildung 3.46 sind die Kultivierungsergebnisse des Stammes *P. tricornutum* dargestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass die *P. tricornutum* Zellen bei hoher Glucose-Konzentration nicht gewachsen sind. Möglicherweise übt eine hohe Glucose-Konzentration Stress auf die Zellen aus.

3.6.1.4. Fazit

In diesem Kapitel wurden die *P. tricornutum* Zellen im Schüttelkolben unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen kultiviert mit dem Ziel, die optimalen Wachstumsbedingungen zu bestimmen. Die Kultivierungen wurden mit der Standard-Kultivierung gestartet, wobei eine Optische Dichte von $OD_{600} = 0,58$ und die maximale Zellzahl $6,5 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ erreicht wurde. Anschließend wurden weitere Kultivierungen mit unterschiedlichen Begasungsvarianten und Glucose-Konzentrationen durchgeführt. Bei der Druckluftbegasung hatte die Optische Dichte einen niedrigeren Wert im Vergleich zur Standard-Kultivierung, jedoch stieg die Zellzahl auf $8,5 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ an. Dies wurde ebenfalls bei der Druckluftbegasung mit 2 % (v/v) CO_2 beobachtet, die Optische Dichte war niedriger und die Zellzahl im Vergleich zu der Standard-Kultivierung. Die Druckluftbegasung mit 4 % (v/v) CO_2 zeigte sowohl die höchste Optische Dichte als auch die höchste Zellzahl. Die Zellzahl betrug $1 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$ und die Optische Dichte war $OD_{600} = 1,1$. Die Kultivierung mit Glucose zeigte genauso gute Ergebnisse wie bei der Druckluftbegasung mit 4 % (v/v) CO_2 . Die maximale Zellzahl betrug $9,5 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ und die Optische Dichte war $OD_{600} = 1$.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass für ein besseres Wachstum und eine hohe Zellkonzentration *P. tricornutum* mit CO_2 begast werden sollte. Die Kultivierung mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose-Konzentration zeigte nahezu die gleichen Ergebnisse.

3.6.2. Kultivierungen im Photobioreaktor

Die Kultivierung von *P. tricornutum* wurde auch im Photobioreaktorsystem durchgeführt. Zur Prozessüberwachung wurde das Durchflussmikroskop eingesetzt. Das gesamte Volumen des Photobioreaktorsystems betrug 2,3 L. Das System wurde mit einem Gemisch aus 1.500 mL*min⁻¹ Druckluft und 4 % (v/v) CO₂ begast. Die Rührgeschwindigkeit im Ausgleichgefäß betrug 100 rpm. Die Kultivierung fand bei Raumtemperatur statt. Die Kultivierungsparameter sind in der Tabelle 3.18 zusammengefasst.

Tabelle 3.18: Kultivierungsbedingungen für *Phaeodactylum tricornutum* im Photobioreaktor

Kultivierungsbedingungen	Photobioreaktor (2,3 L)
Temperatur	RT
Rührgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	8,5
Begasung	1.500 mL*min ⁻¹ mit 4 % CO ₂ (v/v)
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h
Medium	F/2-Medium

Die Kultivierung des Stammes *P. tricornutum* war in dem Photobioreaktorsystem erfolgreich. Trotz der guten Ergebnisse konnten die Photobioreaktor-Kultivierungen in dieser Arbeit nicht dargestellt werden, da die Auswertung der aufgenommenen Bilder mit dem vorhandenen Algorithmus nicht möglich war.

Die Aufnahme der Zellbilder zu diesem Mikroalgen-Stamm war auch teilweise problematisch, weil die Zellen recht klein sind und die Zellen Flagellen besitzen. Infolge der Zellgröße und der Zellmorphologie ist die Aufnahme der Bilder genauso schwer wie bei der Auswertung.

3.7. Kultivierung von *Spirulina platensis*

Die in den bisher durchgeführten Kultivierungen verwendeten Mikroalgenstämme weisen eine rundlich ovale Morphologie auf. Bei dem Stamm *Spirulina platensis* handelt es sich aber um eine spiralförmige Mikroalge, die aufgrund ihrer Morphologie sehr interessant ist. Außerdem ist die *S. platensis* wegen hoher Proteinkonzentration industriell relevant und das ist auch ein Grund, warum dieser Stamm in dieser Arbeit weiter erforscht wird. Diese Mikroalgenart dient als Modell zum Training und zur Adaption des Durchflussmikroskops. *Spirulina* stellt aufgrund der besonderen Morphologie eine Herausforderung für die Strukturerkennungsalgorithmen und für das Photobioreaktorsystem dar. Das soll die Grenzen des Systems aufzeigen. Bei dem *S. platensis* Stamm handelt es sich um ein Nahrungsmittel, das direkt als Tablette eingenommen werden kann.

Der optimale Temperaturbereich für die Kultivierung von *S. platensis* beträgt 28-35 °C. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Kultivierungstemperatur konstant bei 30 °C gehalten. Die Kultivierungen wurden erneut sowohl im Schüttelkolben als auch im Photobioreaktor durchgeführt.

Die bei den Kultivierungen angewendeten Bestimmungsmethoden der einzelnen Prozessgrößen werden im Anhang beschrieben. Insgesamt wurden folgende Prozessgrößen gemessen: OD₇₅₀ (Messmethode siehe Anhang, Abschnitt 5.1.5.1), Glucose-Konzentration (Abschnitt 5.1.5.2), Zellzahl (Abschnitt 5.1.5.4) und der pH-Wert (Abschnitt 5.1.5.5). Für die Kultivierungen wurde das Spirul-Medium (Zusammensetzung siehe Anhang, Abschnitt 5.1.2.2) verwendet.

3.7.1. Kultivierungen im Schüttelkolben

Für die Kultivierungen mit Begasung in der Variante mit dem Überkopfbegasungssystem wurden 500 mL-Schüttelkolben mit 2 Schikanen verwendet. Eine gleichmäßige Beleuchtung der Schüttelkolben ist für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sehr wichtig.

3.7.1.1. Standard-Kultivierungen

Um die Kultivierungsbedingungen besser vergleichen zu können, wurde *S. platensis* zuerst ohne Zusätze kultiviert. Die Schüttelkolben wurden nicht begast und die Beleuchtung erfolgte

dauerhaft über 24 h. Das Spirul-Medium hatte vor der Kultivierung einen pH-Wert von pH 9. Der Schüttelkolben wurde mit 2 mL Inokulum angeimpft. Wegen der Kultivierungsdauer wurde nur einmal täglich eine Probe entnommen und die Optische Dichte, der pH-Wert und die Zellzahl gemessen. In Tabelle 3.19 sind die Kultivierungsbedingungen zusammengefasst.

Tabelle 3.19: Kultivierungsbedingungen für *Spirulina platensis* im Schüttelkolben.

Kultivierungsbedingungen	Schüttelkolben (500 mL)
Temperatur	30 °C
Schüttelgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	9
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h
Medium	Spirul-Medium

Das Wachstum hängt bei diesem Stamm sehr stark von der Temperatur ab. Aus diesem Grund muss die Kultivierungstemperatur besonders sorgfältig geregelt werden (Abschnitt 2.1.6).

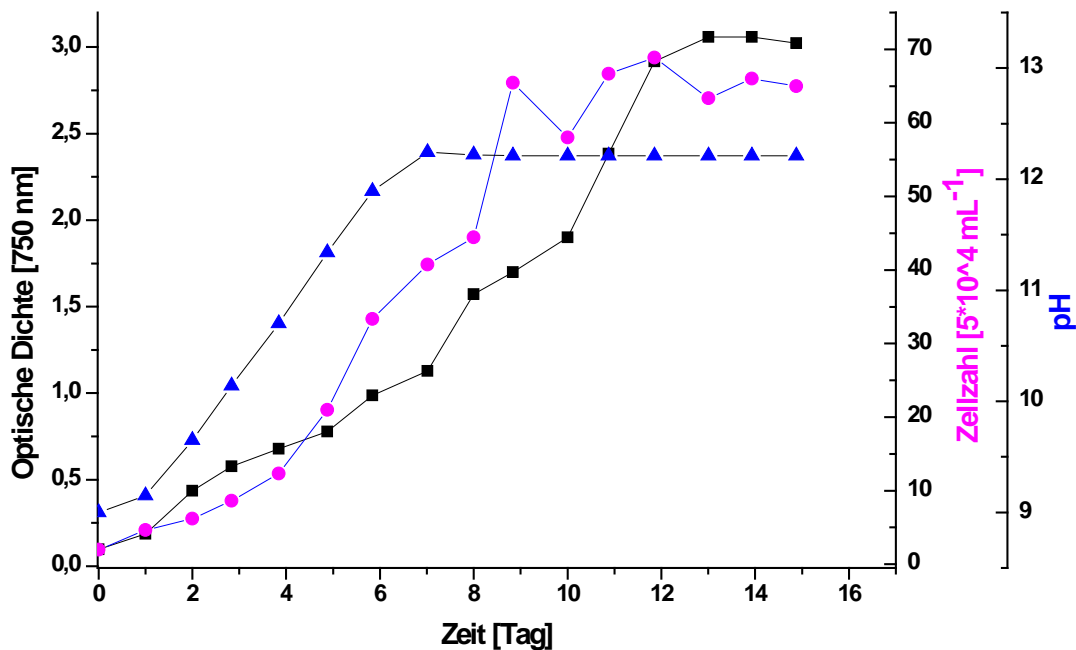


Abbildung 3.47: Der Verlauf der Optischen Dichte von *Spirulina platensis* während der Kultivierung mit Zellzahl und pH-Wert.

In der Abbildung 3.47 ist der Verlauf der Optischen Dichte, der Zellzahl und des pH-Wertes gegen die Zeit dargestellt. Die durchgeführten Kultivierungen zeigen, dass die Chlorophyll-Konzentrationsbestimmung bei diesem Stamm sehr schwierig wäre. Das Chlorophyll der *S. platensis* Zellen ist nicht quantitativ mit Aceton extrahierbar und daher entspricht die gemessene Chlorophyll-Konzentration nicht dem tatsächlichen Wert. Aus diesem Grund wurde auf die Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration verzichtet. Die Zellzahl kann zu Beginn der Kultivierung problemlos bestimmt werden. Bei hoher Zelldichte wurde die Zellzahlbestimmung aufgrund der Zellgröße von *S. platensis* allerdings erschwert. Bei der Kultivierung erreichte die Optische Dichte nach 15 Tagen einen Wert von $OD_{750} = 3$, die maximale Zellzahl betrug $32 \cdot 10^5 \text{ mL}^{-1}$. Zu Beginn der Kultivierung wurde der pH-Wert des frischen Spirul-Mediums zwar zunächst über das Carbonat-Puffersystem stabilisiert, während des Zellwachstums wurde der pH-Wert aber nicht mehr geregelt.

Während der *S. platensis* Kultivierung stieg der pH-Wert aufgrund des hohen Bedarfs an dem im Medium gelösten Kohlenstoffdioxid von anfänglich pH 9 auf pH 12 stark an. Im Medium liegt ein Bicarbonat-Carbonat-Puffersystem vor, welches durch CO_2 und die verwendeten Natriumcarbonatsalze gebildet wird. Die anderen Kulturmedien enthalten nicht Bicarbonat-

Carbonat-Puffersystem, sondern Phosphat Puffer. Aus diesem Grund gelten die folgenden Reaktionsgleichungen für *S. platensis*. Die folgenden Reaktionsgleichungen zeigen, wie das zum Wachstum benötigte Kohlenstoffdioxid zur Verfügung gestellt wird:



Das freigestellte Kohlenstoffdioxid wird von *Spirulina* aufgenommen und damit aus der Gleichgewichtsreaktion des Kulturmediums entfernt. Das Gleichgewicht verschiebt sich dadurch in Richtung der Hydroxidionen, was eine Erhöhung des pH-Wertes zur Folge hat [38].

Eine Erhöhung der Konzentrationen der Medienzusätze kann der pH-Wert-Erhöhung daher nicht entgegen wirken. Wurde bei dieser Kultivierung die Konzentration von Carbonaten um 10 % erhöht, so stieg der pH-Wert ebenfalls. Die Kultivierungen wurden daher mit den in Tabelle 5.6 (siehe Anhang) gegebenen Carbonat-Puffer-Konzentrationen durchgeführt.

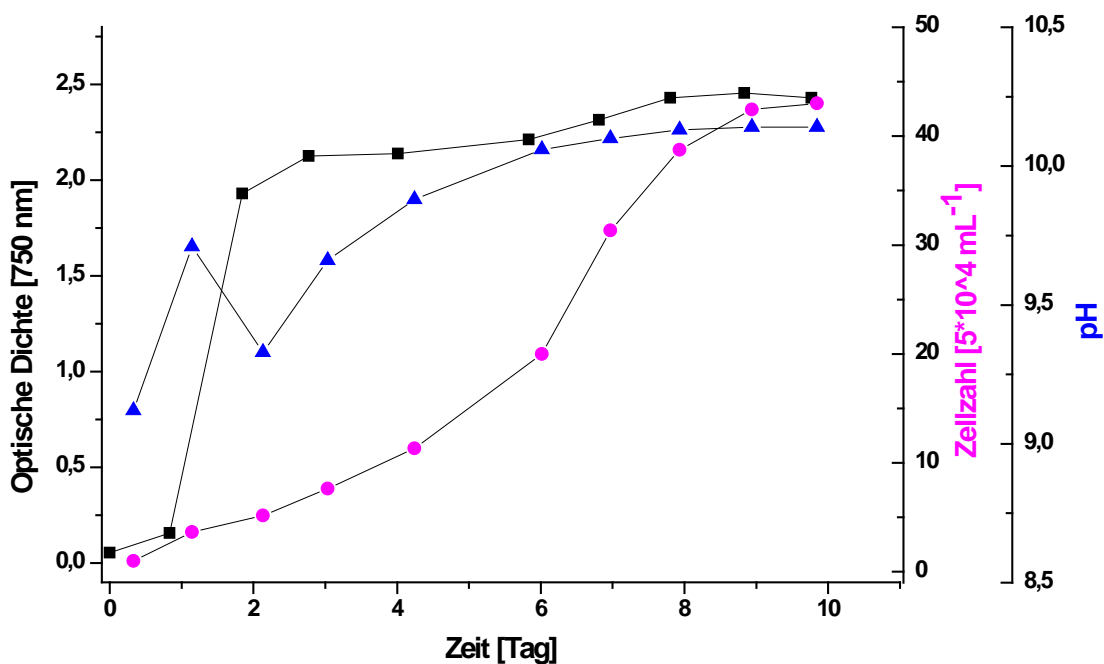
3.7.1.2. Kultivierungen mit Begasung

Bei diesen Kultivierungen erfolgte die Begasung des Schüttelkolbens über eine Kopfraumbelüftung. Druckluft wurde über einen Sterilfilter in die Gasphase der Kolben eingeleitet. Der Druckausgleich erfolgte über die Aluminium-Kappe des Schüttelkolbens. Die Kopfraumbelüftung bestand aus einem geraden Metallrohr, das über die Kappe abgedichtet, in den Schüttelkolben hineinragte, aber nicht in die Flüssigkeit eingetaucht war. Die Begasung der Zellen wurde in drei unterschiedlichen Betriebsmodifikationen durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 3.20 zusammengefasst.

Tabelle 3.20: Kultivierungsbedingungen für *Spirulina platensis* im Schüttelkolben mit Begasung.

Kultivierungsbedingungen Schüttelkolben (500 mL)	
Temperatur	30 °C
Schüttelgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	9
Begasung	300 mL min ⁻¹ mit CO ₂ (2 % und 4 % (v/v))
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h
Medium	Spirul-Medium

Wie bei den übrigen Stämmen wurden hier auch drei Kultivierungsvarianten durchgeführt. Zuerst wurden die Kultivierungen nur mit der Druckluft-Begasung durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abbildung 3.48 dargestellt.

**Abbildung 3.48:** Verlauf der Optischen Dichte während der Kultivierung von *Spirulina platensis* mit Druckluft-Begasung mit pH-Wert und Zellzahl.

Bei dieser 10-tägigen Kultivierung wurde nur mit Druckluft ohne CO₂-Anreicherung begast. Nach 10 Tagen erreichte die Optische Dichte einen Wert von OD₇₅₀ = 2,5. Der pH-Wert stieg von anfänglich pH 9 auf pH 10,7 an. Bei dieser Kultivierung war die Änderung des pH-Werts im Vergleich zu Kultivierungen unter Standard-Bedingungen geringer. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der geringe CO₂-Gehalt in der Luft den pH-Wert annähernd konstant hält. Obwohl das Kulturmedium mit Druckluft begast wurde, wurde bei diesem Experiment sowohl eine niedrigere Optische Dichte als auch eine geringere Zellzahl von 23*10⁵ mL⁻¹ als bei Kultivierungen ohne Begasung erhalten. Das könnte daran liegen, dass das Zellwachstum erst bei einem hohem pH-Wert einsetzt. Als Nächstes wurde die Kultivierung mit Begasung mit 2 % (v/v) CO₂-Konzentration durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.49 dargestellt.

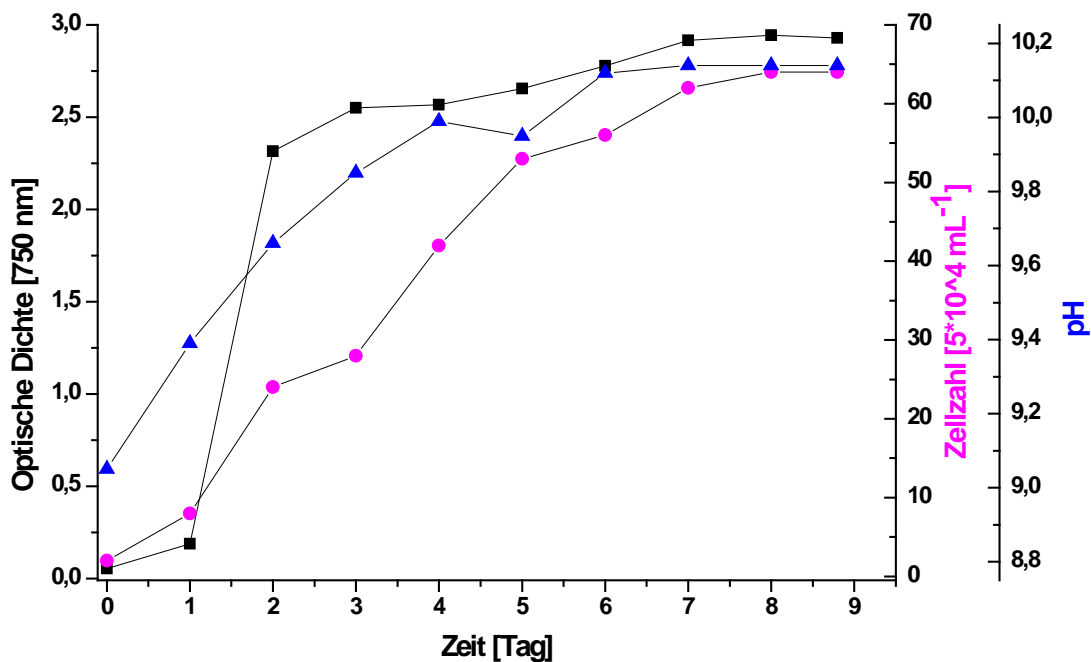


Abbildung 3.49: Verlauf der Optischen Dichte während der Kultivierung von *Spirulina platensis* mit Druckluft-Begasung mit 2 % (v/v) CO₂ mit pH-Wert und Zellzahl.

Bei der Kultivierung verläuft die Zellzahl linear und erreicht einen maximalen Wert von 33*10⁵ mL⁻¹. Die Optische Dichte liegt nach 10 Tagen bei OD₇₅₀ = 3, wobei sie sich von Tag 1 auf Tag 3 sprunghaft ändert und anschließend eine lineare Steigung aufweist. Der Verlauf

der Optischen Dichte korreliert nicht mit dem Verlauf der Zellzahl. Der pH-Wert stieg bei der Kultivierung relativ langsam an und lag am Ende der Kultivierung bei pH 10,2. Bei dem Experiment wurde der Anstieg des pH-Wertes möglicherweise durch die CO₂-Zufuhr begrenzt. Der pH-Wert wird zeitgleich mit der Optischen Dichte und der Zellzahl offline bestimmt. Mit Hilfe von CO₂ konnte der pH-Wert annähernd stabilisiert und damit ein Stressfaktor vermieden werden.

Bei den *S. platensis* Kultivierungen mit Begasung wurde festgestellt, dass die Begasung der Zellen mit Druckluft das Wachstum nicht beeinflusst. Die Ergebnisse zeigen, dass sich weder die Optische Dichte noch die Zellzahl am Ende der Kultivierungen mit Begasung von denen ohne Begasung unterscheiden. Aus diesem Grund wurden Kultivierungen mit hoher CO₂-Konzentration nicht durchgeführt.

3.7.1.3. Kultivierungen mit Glucose

S. platensis kann auch im glucosehaltigen Medium kultiviert werden. Der Stamm wurde bei unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen und unter einem Hell/Dunkel-Zyklus (16 h hell, 8 h dunkel) kultiviert. Die Bedingungen der Kultivierung sind in der Tabelle 3.21 zusammengestellt.

Tabelle 3.21: Kultivierungsbedingungen für *Spirulina platensis* im Schüttelkolben mit Glucose.

Kultivierungsbedingungen Schüttelkolben (500 mL)	
Temperatur	30 °C
Schüttelgeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	9
Beleuchtungsdauer	16h/8 h (Hell/Dunkel-Zyklus)
Medium	Spirul-Medium mit Glucose (2 g*L ⁻¹ und 4 g*L ⁻¹)

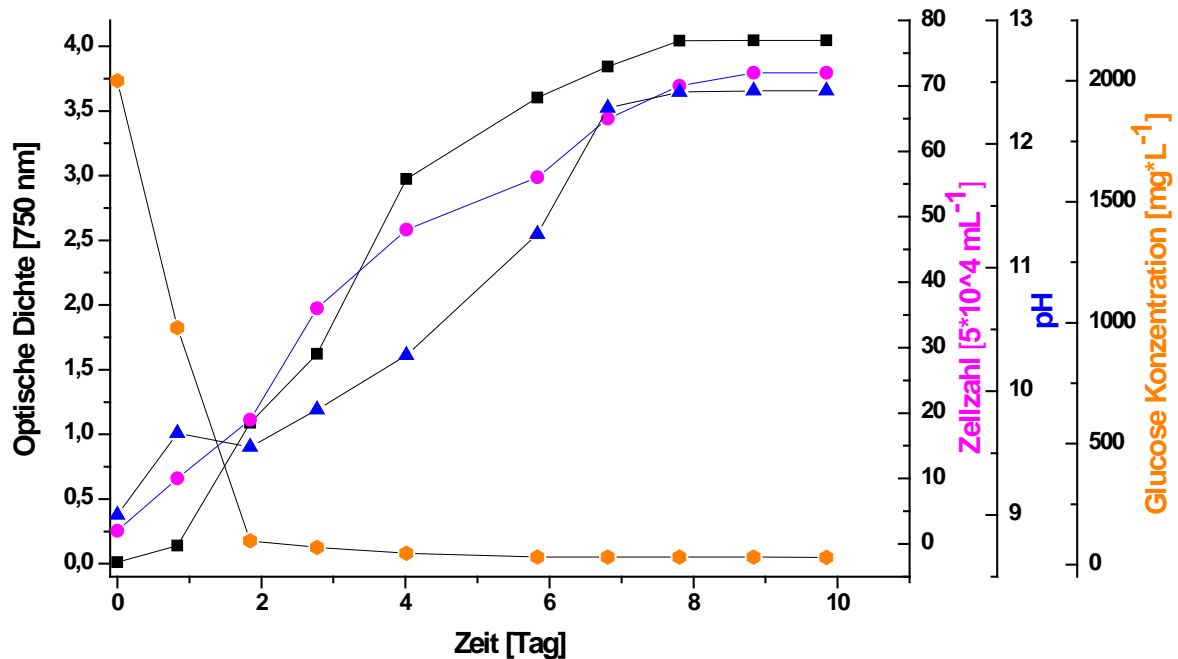


Abbildung 3.50: Verlauf der Optischen Dichte während der Kultivierung von *Spirulina platensis* Zusatz von $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose mit pH-Wert, Glucose-Konzentration und Zellzahl.

Bei der Kultivierung erreichte die Optische Dichte einen Wert von $\text{OD}_{750} = 4$ und die Zellzahl betrug $3,7 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ (Abbildung 3.50). Der pH-Wert stieg von pH 9 auf pH 12,5. Die Optische Dichte und Zellzahl zeigen eine Korrelation, die Zellzahlkurve liegt am Anfang der Kultivierung über, später unter der OD-Kurve. Dieses Verhalten erklärte sich wie folgt: Zu Beginn der Kultivierung enthält das Kulturmedium alle Nährstoffe. Aus diesem Grund entstanden bei dem Zellteilungsprozess mehr Tochterzellen als am Ende der Kultivierung. In der Abbildung 3.50 ist zudem der Verlauf der Glucose-Konzentration dargestellt. Nach 2 Tagen ist der größte Teil der Glucose verbraucht und die Optische Dichte stieg weiter an. Nach 10-tägiger Kultivierung war die Glucose nicht vollständig verbraucht. Das Medium enthielt noch $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose.

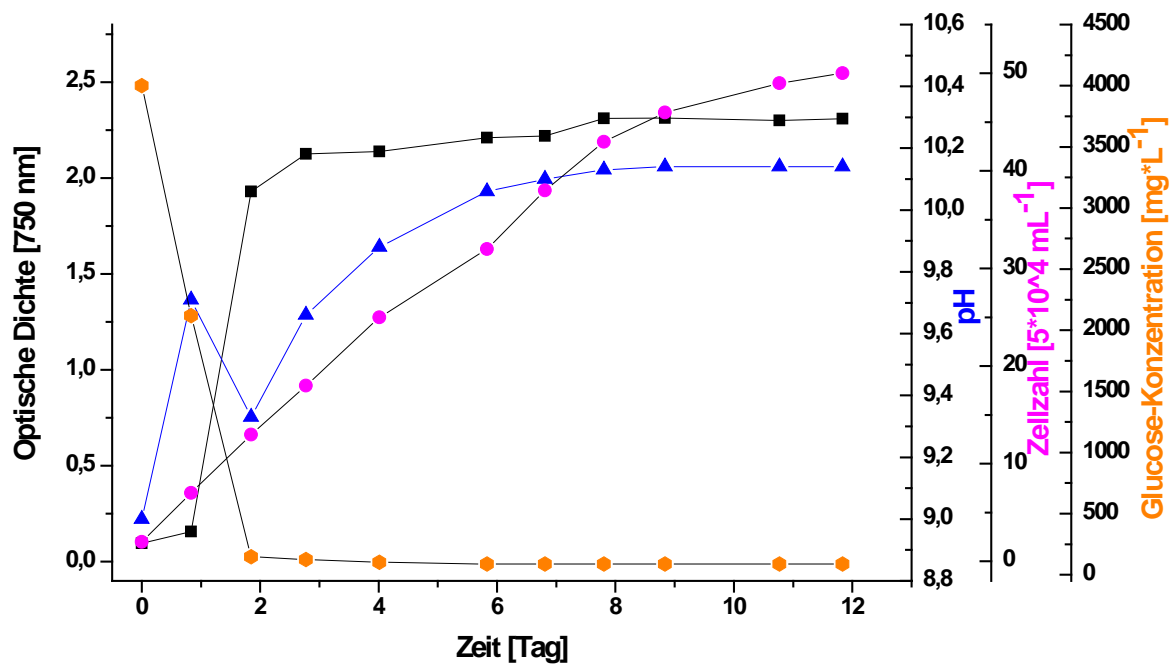


Abbildung 3.51: Verlauf der Optischen Dichte während der Kultivierung von *Spirulina platensis* mit Zusatz von $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose mit pH-Wert, Glucose-Konzentration und Zellzahl.

S. platensis wurde im Medium mit Zusatz von $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose kultiviert. Die Ergebnisse dieser Kultivierung sind in Abbildung 3.51 dargestellt. Bei dieser Kultivierung lagen die Endwerte der Zellzahl und Optischen Dichte viel niedriger als die der Kultivierung mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose-Zusatz im Medium und mit glucosefreiem Medium. Anhand der Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, dass *S. platensis* in der Gegenwart von organischen Kohlenstoffquellen kein schnelleres Wachstum als Standard-Kultivierungen zeigt. Die Glucose wurde in den ersten 2 Tagen sehr schnell verbraucht, wie dies bereits in der Kultivierung mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose der Fall war (Vgl. Abbildung 3.50). Anschließend zeigte die Glucose-Konzentration einen linearen Verlauf. Nach Beendigung der Kultivierung war noch $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose im Medium vorhanden. Bei dieser Kultivierung erreichte die Optische Dichte nach 2 Tagen einen Wert von $\text{OD}_{750} = 2,0$ und erhöhte sich bis zum Tag 12 auf $\text{OD}_{750} = 2,4$.

3.7.1.4. Fazit

Die Kultivierung von *S. platensis* wurde unter unterschiedlichen Bedingungen erfolgreich durchgeführt. Bei diesen Kultivierungen wurde festgestellt, dass sich der pH-Wert stark ändert, welches das Wachstum der Zellen inhibiert und die Zellmorphologie ändert. Aufgrund der starken Änderung des pH-Wertes wurde der Einfluss des Puffersystems untersucht. Dazu wurde die Konzentration des Carbonat-Puffers erhöht, um den pH-Wert konstant halten zu können. Bei diesen Kultivierungen erhöhte sich der pH-Wert allerdings im gleichen Maße, in Anlehnung an die Kultivierungen mit der ursprünglichen Konzentration des Carbonat-Puffers (Abschnitt 5.1.2.2). Daher wurde die in der Literatur angegebene Zusammensetzung des Mediums nicht geändert. Die Kultivierungen wurden auch mit hohen pH-Werten von pH 10 und pH 11 gestartet. Bei diesen Kultivierungen wuchsen die Zellen nicht und zeigten keine spirale Morphologie, sondern wiesen eine zylindrische Form auf, wie in Abbildung 3.37 b erkennbar ist. Bei langer Kultivierung zersetzten sich die langen Zellen in kleine Fragmente. Mögliche Ursache hierfür könnte das dauerhafte Schütteln sein, da die 500 µm langen *S. platensis* Zellen dem durch Schütteln entstehenden Scherstress ausgesetzt werden (Abbildung 3.52 a).

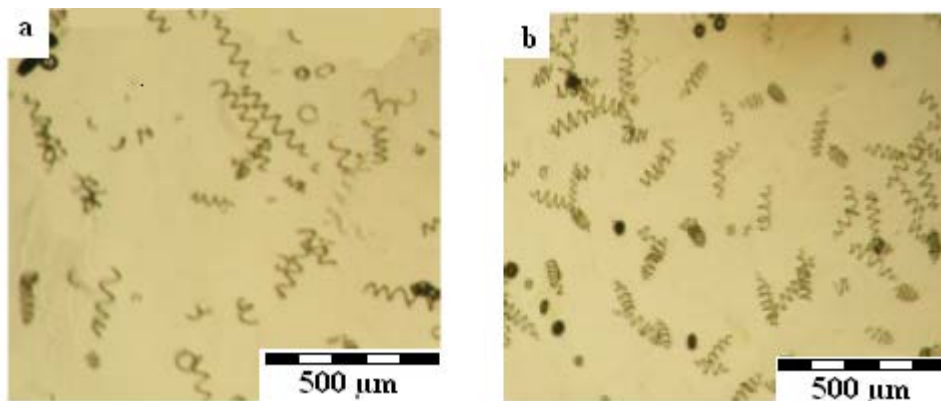


Abbildung 3.52: a) Viele kleine Zellteile während der Kultivierung (pH-Startwert 9). b) Die Form der *S. platensis* Zellen während der Schüttelkolben-Kultivierung.

Als optimaler pH-Wert wurde pH 9 festgestellt, die Temperatur wurde bei 30 °C konstant gehalten. Laut Literatur [37] sollen bei der Kultivierung von *S. platensis* die Schüttelkolben und Photobioreaktor sehr gut temperiert werden, da das Wachstum der *S. platensis* bei einer Abweichung von der optimalen Temperatur beeinträchtigt wird. In der Literatur [36, 37] wird zudem beschrieben, dass die Zugabe von Glucose die Wachstumsrate und die Biomassekon-

zentration am Ende der Kultivierung erhöht. Dies konnte in diesem Kapitel bei einer Glucose-Zugabe von $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ experimentell nachgewiesen werden. Bei der Kultivierung mit $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glucose wurden höhere Biomassekonzentrationen erreicht als im Vergleich zu der Kultivierungen ohne Glucosezusatz. Bei höherer Glucose-Konzentration ($4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) wurde das Zellwachstum jedoch negativ beeinflusst. Eventuell stellte die erhöhte Glucose-Konzentration einen Stressfaktor für die *S. platensis* Zellen dar. Aus diesem Grund waren das Wachstum und die Zellkonzentration nicht höher als bei der $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glucose-Konzentration.

Vor der Kultivierung wurde davon ausgegangen, dass das im Carbonat-Puffer vorhandene Carbonat-Ion mit dem Wasser von dem Kulturmedium reagiert und durch das entstandene H_2CO_3 der pH-Wert des Mediums konstant gehalten wird. Aber nach durchgeführten Kultivierungen ist das ersichtlich, dass der Carbonat-Puffer gar nicht das Kulturmedium puffert, vielmehr stellt es vermutlich eine C-Quelle dar. Bevor das Carbonat-Ion seine Zwecke erfüllt, wird es als CO_2 von *S. platensis* Zellen fixiert. Als Folge steigt der pH-Wert unkontrolliert an.

3.7.2. Kultivierungen im Photobioreaktor

S. platensis Zellen können sowohl photoautotroph als auch mixotroph kultiviert werden. Beide Kultivierungsarten wurden im Schüttelkolben durchgeführt und die Ergebnisse im vorigen Abschnitt präsentiert.

Für die Anpassung der Mikroalgenkultivierungen an die Durchflusszelle des in-situ-Mikroskops wurden in dieser Arbeit verschiedene Mikroalgenstämme mit unterschiedlichen Morphologien verwendet. Das Ziel war dabei die Kultivierung und Überwachung möglichst vieler Mikroalgenstämme mit möglichst unterschiedlichen Zellformen. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig die Einsetzbarkeit des Photobioreaktorsystems für den Mikroalgenstamm *S. platensis* auszuprobieren. *S. platensis* Zellen haben auch eine große Bedeutung als Nahrungsmittel. Die Kultivierungen wurden im Photobioreaktor durchgeführt. Die bei der Kultivierung verwendeten Bedingungen sind in Tabelle 3.22 zusammengefasst.

Tabelle 3.22: Kultivierungsbedingungen für *Spirulina platensis* im Photobioreaktor.

Kultivierungsbedingungen	Schüttelkolben(2,3 L)
Temperatur	30 °C
Rührergeschwindigkeit	100 min ⁻¹
pH	9
Begasung	1.500 mL ⁻¹ mit 4 % CO ₂ (v/v)
Beleuchtungsdauer (täglich)	24 h
Medium	Spirul-Medium

Die Auswertung der mit dem Durchflussmikroskop aufgenommenen Bilder der *S. platensis* war aus unterschiedlichen Gründen nicht möglich. Ein Grund war, dass die *S. platensis* Zellen infolge ihrer Morphologie nicht gut im Photobioreaktorsystem wachsen, so dass nicht genug Biomasse in dem System entstand. Die Kultivierung im PBR ist vor allem wegen der Länge der Zellen von 500 µm schwierig. Im Photobioreaktorsystem sind der Photobioreaktor und das Ausgleichsgefäß miteinander per Silikonschläuche verbunden und das Medium wird kontinuierlich mit einer Peristaltikpumpe im Kreislauf gepumpt, was zu einer Beschädigung der Zellen führen kann. Ein weiterer Grund ist, dass mit dem vorhandenen Auswertungsalgorithmus für die Zellzahl, Zellen mit einer Spiralforn nicht ausgewertet werden konnten, da die

Morphologie zu stark von der rundlich-ovalen Form abweicht. Bei *S. platensis* sollten gleichzeitig die Länge der Zellen und der Wendeldurchmesser überwacht werden. Außerdem wird bei hoher Zelldichte die Messzone wegen der Zellgröße verstopft und die Zellen fließen nicht frei hindurch. Aufgrund dieser Schwierigkeiten ist dieses System für die *S. platensis* Kultivierung ungeeignet. Der gleiche Effekt ist bei der Aufnahme mit dem Lichtmikroskop in der Abbildung 3.52 zu sehen.

4. Zusammenfassung und Ausblick

4.1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung und Charakterisierung des Photobioreaktors zur Kultivierung von Mikroalgen mit unterschiedlichen Morphologien und die Überwachung des Kultivierungsprozesses mit einem Durchflussmikroskop in die Praxis umgesetzt. Die ausgesuchten Mikroalgenstämme wurden im Schüttelkolben und teilweise auch im Photobioreaktor erfolgreich kultiviert. Hierbei wurden sechs Mikroalgenstämme untersucht. Für die unterschiedlichen Stämme wurden in Schüttelkolbenkultivierungen die Wachstumsbedingungen optimiert.

Ein Photobioreaktor wurde zur Kultivierung und Überwachung des Kultivierungsprozesses und darüber hinaus für den experimentellen Einsatz des Durchflussmikroskops entwickelt. Bei der Entwicklung des Photobioreaktors wurden das Material, die Form, die Maße, das Volumen, die Beleuchtung, die Sterilisierbarkeit und die Reinigung des Reaktors berücksichtigt, um erfolgreiche Mikroalgenkultivierungen durchzuführen. Das Photobioreaktorsystem wurde optimiert und ausführlich reaktionstechnisch charakterisiert (Kapitel 2.6). Die hierfür zu ermittelnden Parameter sind die Durchmischung, das Verweilzeitverhalten, der $k_{L}a$ -Wert, die Lichtintensität und Temperaturverteilung. Die Ergebnisse der Durchmischung und das Verweilzeitverhalten zeigten, dass sich die Parameter (Leitfähigkeit) ab einer bestimmten Pumpengeschwindigkeit nicht mehr ändern. Folglich wurde die Charakterisierung des Photobioreaktorsystem bei einem Volumenstrom von $880 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ durchgeführt. Die Ergebnisse der Durchmischung und Verweilzeitverhalten des entwickelten Photobioreaktors weisen auch eine schnelle Durchmischung und eine enge Verweilzeitverteilung auf.

Bei diesem Photobioreaktor wurde durch das Konstruktionsprinzip verändert, indem das Leuchtstoffrohr in der Mitte des Glasreaktors platziert wurde. Das Ziel der innenliegenden Beleuchtungseinheit war die maximale Ausnutzung der eingestrahnten Lichtenergie. Die Untersuchung zur Erwärmung des Photobioreaktors durch die Leuchtstoffröhre hat gezeigt, dass ihre Strahlung ohne Kühlung eine Temperaturerhöhung von $3,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ verursachen würde. Daher wurde bei den Experimenten die Temperatur im Photobioreaktor mit dem Thermostat des Biostat B (Steuergerät) reguliert, wobei das Kühlwasser über den Kühlmantel des Ausgleichgefäßes zirkuliert wurde.

Das Ergebnis der $k_{L}a$ -Bestimmung zeigte, dass in dem Photobioreaktorsystem eine gute O_2 -Verteilung gewährleistet wurde. Der $k_{L}a$ -Wert (431 h^{-1}) liegt im Bereich der Wert eines Rühr-

kesselreaktors. Bei den Lichtintensitätsmessungen wurde festgestellt, dass die Mikroalgenzellen durch die verwendete Lichtquelle im Schüttelkolben und Photobioreaktor gut beleuchtet wurden. Besonders im Photobioreaktor kommt der Form und dem Material des Reaktors eine entscheidende Rolle zu, weil durch diese Mikroalgen ausreichend und gleichmäßig beleuchtet werden. Die Lichtquelle stellt weder für die Schüttelkolben noch für den Photobioreaktor einen limitierender Faktor dar.

Das Photobioreaktorsystem zeigt neben den oben genannten Vorteilen (gute Durchmischung, enge Verweilzeitverteilung, guter Sauerstoffübergang usw.) noch eine weitere gute Eigenschaft, was dieses System interessant macht. Dieses Photobioreaktorsystem kann nämlich auch mit weiteren Glasmodulen, die miteinander über Silikonschläuche angeschlossen werden, vergrößert werden.

In dieser Arbeit wurde zudem das gesamte Photobioreaktorsystem mit Durchflussmikroskop (Abschnitt 2.3) optimiert. Zunächst wurde die optimale Position des Durchflussmikroskops im System bestimmt. Dabei wurden die Flüssigkeitsströmung in dem Mikroskop und die Überwachung des Prozesses berücksichtigt. Die Experimente zeigten, dass die optimale Position des Durchflussmikroskops mittels Bypass am Ausgleichsgefäß liegt. Der Durchfluss erfolgt vom Ausgleichsgefäß in das Mikroskop über eine Peristaltikpumpe, wodurch es möglich war, die Durchflussrate während der laufenden Kultivierungen zu ändern. Bei dem in-situ Mikroskop wurde der Mikroskopkörper in einen 25 mm Seitenport eines Ausgleichsgefäßes aus Edelstahl festgeschraubt, so dass die Messzone kontinuierlich in das zu überwachende Kulturmedium eingetaucht wurde. Anschließend wurde die Kultivierung der Referenzmikroalge *C. reinhardtii* in dem Photobioreaktorsystem mittels des in-situ Mikroskops und Durchflussmikroskops überwacht. Die Ergebnisse wurden miteinander verglichen und es wurde festgestellt, dass das Durchflussmikroskop zuverlässige Daten liefert. Der Grund für die unzuverlässigen Ergebnisse beim in-situ Mikroskop lag daran, dass die Messzone bei hoher Zelldichte komplett mit Mikroalgenzellen bedeckt war. Während der Kultivierung konnte die Messzone vom in-situ Mikroskop manuell oder computergesteuert geöffnet werden. Dadurch konnten die an der Messzone anhaftenden Zellen nicht entfernt werden, außerdem verschlechterte sich bei weit geöffneter Messzone die Qualität der Bilder.

Ein weiterer Vorteil des Durchflussmikroskops stellt die Arbeit mit kleinen Volumina dar. Aus diesen Gründen erfolgte die Überwachung der Mikroalgenkultivierungen mittels Durchflussmikroskop. Das Durchflussmikroskop wurde erfolgreich in das Photobioreaktorsystem integriert und die überwachten Kultivierungen zeigten bei rundlich-ovalen Mikroalgenzellen

eine gute Übereinstimmung mit den offline-Ergebnissen. Die online-Zellzahlbestimmung anderer Zell-Morphologien stellte sich als problematisch heraus.

Die Kultivierungen der gewählten Mikroalgenstämme wurden zunächst im Schüttelkolben durchgeführt. Für die reproduzierbaren Ergebnisse wurden die jeweiligen Kultivierungen der einzelnen Stämme 3 Mal wiederholt. Bei den Kultivierungen veränderten sich die Optische Dichte, die Chlorophyll-Konzentration und die Zellzahl je nach Kultivierungsart erheblich. Die höchsten Werte für die Optische Dichte sowie Chlorophyll-Konzentration und Zellzahl wurden bei der Kultivierung mit CO₂-Begasung erreicht. Die Mikroalgenzellen fixieren CO₂ für ein besseres Wachstum und eine hohe Zellkonzentration. Als Kohlenstoffquelle wurde im Kulturmedium zudem Glucose zugegeben. Der Glucose-Zusatz verbesserte die Ergebnisse ebenso, doch nicht ebenso effektiv wie es bei der bei CO₂-Begasung der Fall war.

Die folgende Tabelle beinhaltet die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen.

Tabelle 4.1: Die besten Ergebnisse der durchgeführten Kultivierungen im Schüttelkolben.

	Kultivierungsart	Optische Dichte	Zellzahl
<i>C. reinhardtii</i>	CO ₂ -Begasung	8	4,25*10 ⁷ mL ⁻¹
<i>C. vulgaris</i>	CO ₂ -Begasung	18	8*10 ⁸ mL ⁻¹
<i>S. platensis</i>	2 g*L ⁻¹ Glucose	4	3,7*10 ⁶ mL ⁻¹
<i>H. pluvialis</i>	CO ₂ -Begasung	0,45	4,5*10 ⁵ mL ⁻¹
<i>N. oculata</i>	CO ₂ -Begasung	1,8	4,5*10 ⁷ mL ⁻¹
<i>P. tricornutum</i>	CO ₂ -Begasung	1,1	1,1*10 ⁷ mL ⁻¹

Wie aus der Tabelle 4.1 ersichtlich ist, wurden durch den Zusatz von CO₂-Quellen die Optische Dichte und Zellzahl die höchsten Werte erzielt. Bei allen durchgeführten Kultivierungen zeigten die CO₂-Begasungen hohe Werte, abgesehen von *S. platensis*. Bei diesem Stamm wurden die besten Kultivierungsergebnisse durch den Zusatz von 2 g*L⁻¹ Glucose erreicht.

Durch diese Kultivierungen im Schüttelkolben konnte festgestellt werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten Mikroalgenstämme unter Laborbedingungen mit unterschiedlichen Kultivierungsparametern (mit und ohne CO₂- Begasung, mit Glucose-Zusatz) erfolgreich kultiviert werden konnten.

Abschließend wurden die *C. reinhardtii*, *C. vulgaris*, *S. platensis*, *H. pluvialis*, *N. oculata* und *P. tricornutum* im Photobioreaktorsystem kultiviert. In dem System wurden die Stämme *C. reinhardtii* und *C. vulgaris* mit geringem Aufwand und aussagekräftigen Ergebnissen kultiviert. Außerdem konnte die Kultivierungsprozesse mit dem Durchflussmikroskop gut überwacht und die aufgenommenen Bilder gut ausgewertet werden. Das Anwendungsspektrum des Durchflussmikroskops konnte auf die Überwachung von Mikroalgenkultivierungen erweitert werden und mit unterschiedlichen Mikroalgen (verschiedene Morphologien) konnte die Grenze des Durchflussmikroskops bestimmt werden. Mit dem online Bilderaufnahmeprogramm in-situ Control (Abschnitt 5.1.6.1 im Anhang) und des Bilderauswertungsprogramms in-situ Analysis (Abschnitt 5.1.6.2 im Anhang) wurde die Bilder aufgenommen und ausgewertet. Durch die Software in-situ Analysis, war es möglich, die Zellen hinsichtlich ihrer Anzahl, Größe und Größenverteilung zu analysieren. Die einstellbaren Schwellenwerte der Programme (in-situ Analysis und in-situ Control) ermöglichten dabei eine optimale Anpassung an die auszuwertende Kultivierung. Die eingestellten Parameter waren z.B. bei der Auswertung von *C. reinhardtii* (4-20 μm) und *C. vulgaris* (2-10 μm) unterschiedlich, weil sich die Größe der jeweiligen Zellen unterscheidet. Zur Verbesserung der Messgenauigkeit wurde ein spezieller Auswertalgorithmus für eine bessere Erkennung von Zellen (hier z.B. Mikroalgenzellen) entwickelt [43 und 4]. Mit diesem konnten auch die Zellen, die auf der Messzone festgeklebt waren (Abbildung 4.1), erfasst werden und es war damit eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen ebenfalls möglich. In der Abbildung 4.1 ist das Originalbild und das mit der Software in-situ Analysis ausgewertete Bild dargestellt. Auf dem ausgewerteten Bild sind die mit unterschiedlichen Farben markierten Zellen zu sehen. Jede Zelle wird mit einer anderen Farbe markiert, außer den rot markierten Zellen. Die Zellen sind dann rot markiert, wenn diese auf dem letzten Bild bereits mitgezählt wurden und beim nächsten Bild wieder auf gleicher Position auftauchen. So werden diese keinen Einfluss mehr auf die Zellzahl ausüben.

Anwendung des Durchflussmikroskops bei der Überwachung der Kultivierungen von *C. reinhardtii* und *C. vulgaris* sowie bei der Auswertung der Zellcharakteristiken wurden in der Veröffentlichung [65] zusammengefasst.

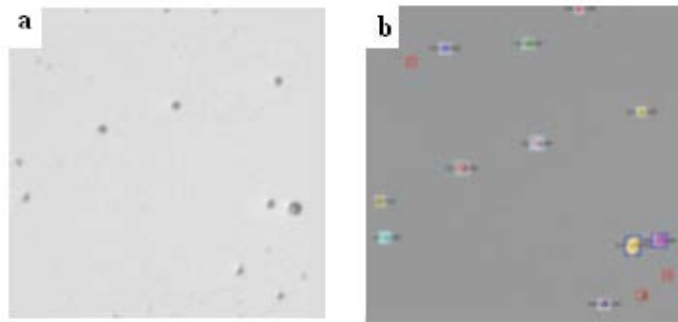


Abbildung 4.1: Bildauswertung von *C. vulgaris* mit dem Programm in-situ Analysis, **a)** Originalbild **b)** ausgewertetes Bild.

Die in Photobioreaktorkultivierungen erzielten Ergebnisse sind in der Tabelle 4.2 dargestellt. Die Ergebnisse beinhalten die mit Hilfe des Programms in-situ Control (Abschnitt 5.1.6.1 im Anhang) aufgenommenen und die durch das Programm in-situ Analysis (Abschnitt 5.1.6.2 im Anhang) ausgewerteten Bilder. Aufgrund der optimalen Bedingungen im Bioreaktor (z.B. bessere und homogene Begasung, bessere Beleuchtung) zeigten die Ergebnisse von *C. reinhardtii* und *C. vulgaris* auch größere Werte der Optische Dichte und Zellzahl.

Tabelle 4.2: Die Ergebnisse der durchgeführten Kultivierungen im Bioreaktor.

	Kultivierungsart	Optische Dichte	Zellzahl
<i>C. reinhardtii</i>	Reaktor	10	$1,2 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$
<i>C. vulgaris</i>	Reaktor	21	$40 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$
<i>H. pluvialis</i>	Reaktor	0,55	$5,5 \cdot 10^5 \text{ mL}^{-1}$
<i>N. oculata</i>	---	---	---
<i>P. tricornutum</i>	---	---	---
<i>S. platensis</i>	---	---	---

Die durch Durchflussmikroskop aufgenommenen Bilder von *C. reinhardtii* und *C. vulgaris* konnten erfolgreich ausgewertet werden. In dem Photobioreaktor war die Kultivierung von *S. platensis* hingegen nicht erfolgreich. Die Zellmorphologie und die Zellgröße spielten hierbei eine bedeutende Rolle. Die Astaxanthin produzierende Mikroalge *H. pluvialis* wurde im Photobioreaktor kultiviert und dabei wurden bessere Ergebnisse erreicht als in den Kultivierungen im Schüttelkolbenmaßstab. Doch die erzielten Werte für die Optische Dichte und Zellzahl

entsprechen nicht den tatsächlichen Werten, da die Zellen sich an den Reaktorinnenwänden abgelagert haben. Die Ablagerung der Zellen erfolgte insbesondere in den Bereichen mit hoher Beleuchtungsintensität.

Die Stämme *N. oculata* und *P. tricornutum* wurden ferner im Photobioreaktor erfolgreich kultiviert. Aufgrund der Zellgrößen und Zellmorphologie konnten die beiden Stämme nicht ausgewertet werden. Folglich konnte über die Zellparameter von *N. oculata* und *P. tricornutum* keine Aussage gemacht werden.

Abschließend kann hier erläutert werden, dass die Adaption des Durchflussmikroskops an die Überwachung und Auswertung der Mikroalgenkultivierungsprozesse erfolgreich war.

4.2. Ausblick

Insgesamt konnten die Schüttelkolbenkultivierungen aller verwendeten Mikroalgenstämme erfolgreich durchgeführt werden. Für ein besseres und schnelles Wachstum sollten die Kultivierungen mit hoher CO₂-Begasung und Glucose-Konzentration durchgeführt werden; gegebenenfalls kann eine stärkere Lichtquelle ebenso einen Beitrag leisten.

Für die Reaktorkultivierungen sind einige Optimierungen und Erweiterungen notwendig. Die durchgeführten Kultivierungen zeigten, dass manche Zelltypen am Reaktorboden sedimentieren und diese bei der online-Messung nicht nachgewiesen werden konnten. In dieser Arbeit wurde der Photobioreaktor regelmäßig gedreht, um Sedimentationseffekte zu minimieren. Um diesen unerwünschten Effekt der Sedimentation zu verhindern, sollte die Begasungseinheit oder die Anschlüsse anders eingestellt sein, um stärkere Strömungen zu ermöglichen, denn eine turbulente Strömung sollte die Sedimentationsgeschwindigkeit reduzieren. Hierfür müssten die passenden Optimierungsversuche noch durchgeführt werden. Wie schon in Abschnitt 3.4.2 bereits erläutert wurde, war die Kultivierung von *S. platensis* in diesem Photoreaktorsystem nicht möglich. In diesem Photobioreaktorsystem ist die Scherrate für *S. platensis* Zellen zu groß, was für ein alternatives Pumpensystem spricht. Nach durchgeführten Kultivierungen ist anzunehmen, dass die gepumpten Systeme für *S. platensis* generell ausscheiden. Für solche Mikroalgenstämme sollten besser in open ponds kultiviert werden. Falls die Kultivierung in einem System möglich sein sollte, ist für die Auswertung der aufgenommenen Bilder ein neues Programm in-situ Analysis notwendig.

Als eine Schwierigkeit bei der Überwachung und Auswertung von Kultivierungsprozessen stellte sich die Bildung von Zellclustern heraus. Die Zellcluster werden zwar von den Bilderauswertungsalgorithmen detektiert, können aber nur als ein Objekt klassifiziert werden. Zur

vollständigen Differenzierung der Mikroalgenzelle in den Clustern müssen die Auswertungsalgorithmen weiter optimiert werden.

Mit dem Bilderauswertungsprogramm *in-situ Analysis* konnten die aufgenommenen Bilder des Stammes *N. oculata* und *P. tricornutum* aufgrund der Zellgröße und Zellmorphologie nicht ausgewertet werden. Dafür ist ein entsprechendes Programm nötig, was in Zukunft geschrieben wird.

Obwohl weitere Optimierungen für das Photobioreaktorsystem und Durchflussmikroskop notwendig sind, um die gewählten Mikroalgenstämme erfolgreich zu kultivieren und auswerten zu können, konnte aber auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Kultivierungen und Auswertungen von den Stämmen *C. reinhardtii* und *C. vulgaris* erfolgreich waren.

5. Anhang

5.1. Material und Methoden

5.1.1. Mikrobiologische Techniken

5.1.1.1. Stammhaltung

Für die Langzeitlagerung der Stämme werden Agarplatten angelegt oder für kurze Zeitintervalle werden die Mikroalgen in Falcon-Tubes übertragen. Dafür werden Mikroalgenstämme in jeweiligen Kultur-Medien in einem 500 mL Schüttelkolben mit 2 Schikanen mit 2 mL Zellkultur (von einer Dauerkultur) angeimpft und im Inkubator bis zu einer hohen Zelldichte inkubiert. Anschließend werden jeweils 20 mL Agar-Medium auf eine Agarplatte gegossen und mit dieser Kultur bestrichen. Die Agarplatten werden anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Alle Kultivierungsarbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

5.1.1.2. Kultivierung von Mikroalgenstämmen in Schüttelkolben

Die Mikroalgenstämme werden für die Untersuchungen und Optimierungen des Prozesses in Schüttelkolben kultiviert. Die Vorkulturen für Photobioreaktorkultivierungen werden ebenfalls im Schüttelkolben durchgeführt. Dafür wird ein durch Autoklavieren sterilisierter Schüttelkolben mit 100 mL Kultur-Medium beschickt. In dieser Arbeit werden die 500 mL mit Alukappe geschlossenen Schüttelkolben mit 2 Schikanen verwendet. Die Kultur wird je nach Mikroalgenstamm bei unterschiedlicher Temperatur inkubiert. Die Schüttelgeschwindigkeit des Schüttlers beträgt 100 rpm. Die Kultivierungen werden vorwiegend bei Raumtemperatur durchgeführt. Für den Stamm *S. platensis* erfolgt die Kultivierung bei 30 °C. Deswegen wird ein Schüttler mit Haube verwendet, damit die Temperatur durch das Thermostat bei 30 °C stabil gehalten wird.

Für die Kultivierungen der verwendeten Stämme werden immer Dauerkulturen im Schüttelkolben bereits gehalten. Eine neue Schüttelkolben-Kultur wird mit 2 mL Inoculum gestartet.

5.1.1.3. Die Kultivierungsbedingungen der verwendeten Mikroalgenstämme

Die Kultivierungsbedingungen der Mikroalgenstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Die Kultivierungsbedingungen von *C. reinhardtii*, *C. vulgaris*, *S. platensis*, *H. pluvialis*, *N. oculata* und *P. tricornutum*.

Parameter	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. platensis</i>	<i>H. pluvialis</i>	<i>N. oculata</i>	<i>P. tricornutum</i>
Temperatur [° C]	18 - 22	18-30	28-35	20-25	18-26	15-23
pH	7	7	9-11	8,5	18-25	18-25
Wachstum	heterotroph, photoau- totroph	au- totroph, hete- rotroph, mixotrop	mixotrop	hete- rotroph, mixotrop		
Beleuchtung	Hell/dunkel -Zyklus	Hell/dun- kel- Zyklus	Hell/dunkel -Zyklus	Hell/dun- kel- Zyklus	Hell/dun- kel- Zyklus	Hell/dunkel
Medium	TAP	TAP	Spirul	MiEB ₁₂	F/2	F/2

5.1.2. Medien

5.1.2.1. TAP-Medium (Tris-Acetate-Phosphate)

Für die Kultivierungen von *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella vulgaris* wurde das TAP-Medium verwendet [73]. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 5.2, Tabelle 5.3 und Tabelle 5.4 dargestellt.

Tabelle 5.2: Zusammensetzung der P-Lösung.

Substanz	Konzentration [g/L]
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	288 g
KH_2PO_4	144 g
H ₂ O bis auf	1.000 mL

Tabelle 5.3: Zusammensetzung der TAP-Salze.

Substanz	Konzentration [g/L]
NH_4Cl	15 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2 g
H ₂ O bis auf	1.000 mL

Tabelle 5.4: Zusammensetzung der Hutner's Spurenelemente-Lösung.

Substanz	Konzentration [g/L]
EDTA, Dinatriumsalz	50 g
H_3BO_3	11,40 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	5,06 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	4,99 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,61 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1,57 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	1,10 g
H ₂ O bis auf	1.000 mL

Vorbereitung der Hutner's Spurenelemente-Lösung:

Für diese Spurenelemente-Lösung werden alle Komponenten außer EDTA in 800 mL ultra-reinem H₂O gelöst und gekocht. Während des Kochens wird EDTA zur Lösung hinzugefügt. Die Mischung sollte bei diesem Schritt eine grüne Farbe besitzen. Wenn die Komponenten komplett gelöst sind, wird die Lösung auf 70 °C abgekühlt und der pH-Wert mit 80-90 mL

20 % heißer KOH-Lösung auf pH 6,7 eingestellt. Das pH-Meter muss bei dieser Temperatur kalibriert werden. Für die pH-Einstellung wird nicht eine NaOH-, sondern KOH-Lösung verwendet. Danach wird die Lösung auf 1.000 mL aufgefüllt und die Lösung sollte eine klare grüne Farbe haben. Die Flasche wird mit Baumwolle verschlossen und 2 Wochen stehen gelassen. Während dieses Zeitraums wird die Flasche täglich geschüttelt. Die Farbe ändert sich von klarem Grün auf purpurrot mit rostbraunem Niederschlag. Folgend wird die Lösung solange filtriert, bis sie eine klare Farbe aufweist. Sie wird im Kühlschrank aufbewahrt [78].

Nachdem die einzelnen Medien Komponenten vorbereitet werden, werden die in der Tabelle 5.5 gegebenen Verhältnisse zusammengemischt. Der pH-Wert wird bei 7 eingestellt und durch Autoklavieren sterilisiert [73].

Tabelle 5.5: Zusammensetzung des TAP-Mediums.

Substanz	Konzentration [g/L]
P-Solution	0,375 mL
TAP-Salze	25 mL
Hutner´s Spurenelemente	1 mL
Essigsäure	1 mL
TRIS	2,42 g
H ₂ O bis auf	1.000 mL

pH wird mit HCl bei 7 eingestellt

5.1.2.2. Spirulina-Medium

Für die Kultivierung von *Spirulina platensis* wurde das Spirulina-Medium verwendet [79]. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 5.6, Tabelle 5.7 und Tabelle 5.8 dargestellt.

Tabelle 5.6: Zusammensetzung der Lösung I.

Substanz	Konzentration [g/L]
NaHCO ₃	13,61 g
Na ₂ CO ₃	4,03 g
K ₂ HPO ₄	0,50 g
H ₂ O bis auf	500 mL

Tabelle 5.7: Zusammensetzung der Lösung II.

Substanz	Konzentration
NaNO ₃	2,5 g
K ₂ SO ₄	1 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20 g
CaCl ₂ ·7H ₂ O	0,04 g
FeSO ₄ ·2H ₂ O	0,01 g
EDTA	0,08 g
Spurenelemente	5 mL
H ₂ O bis auf	500 mL

Tabelle 5.8: Zusammensetzung der Spurenelemente.

Substanz	Konzentration [g*100 mL⁻¹]	verwendete Menge
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g	1 mL
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,1 g	2 mL
H ₃ BO ₃	0,2 g	5 mL
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,02 g	5 mL
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,02 g	5 mL
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0005 g	1 mL
H ₂ O bis auf	981 mL	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,7 g	
EDTA	0,8 g	

Lösungen I und II werden separat autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösungen werden diese zusammengeführt und durch die Zugabe von $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Vitamin B12 komplettiert.

5.1.2.3. MiEB12-Medium (Micrasterias + Erddekot + Vitamin B12)

Für die Kultivierung von *Haematococcus pluvialis* wurde das MiEB₁₂-Medium verwendet [80]. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 5.9 und Tabelle 5.10 zusammengestellt.

Tabelle 5.9: Zusammensetzung des MiEB₁₂- Mediums.

Substanz	Konzentration [$\text{g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$]	verwendete Menge [mL]
KNO ₃	1 g	10 mL
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,2 g	5 mL
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g	10 mL
CaSO ₄	gesättigte Lösung	10 mL
Spurenelemente		5 mL
H ₂ O		960 mL

Tabelle 5.10: Zusammensetzung der Spurenelemente für MiEB₁₂-Medium.

Substanz	Konzentration [$\text{g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$]	verwendete Menge
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g	1 mL
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,1 g	2 mL
H ₃ BO ₃	0,2 g	5 mL
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,02 g	5 mL
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,02 g	5 mL
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0005 g	1 mL
H ₂ O bis auf	981 mL	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,7 g	
EDTA	0,8 g	

Das Medium wird autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Mediums wird Vitamin B₁₂ in einer Endkonzentration 5 µg*L⁻¹ in das Medium zugegeben.

5.1.2.4. F/2 -Medium

Für die Kultivierung von *Nannochloropsis oculata* und *Phaeodactylum tricornutum* wurde das Medium F/2 verwendet:

- 950 mL ultrareines H₂O wird in 1.000 mL Schottflasche gegeben und 32 g Seesalz in dem Wasser durch Zugabe von HCl vollständig gelöst.
- Zur Lösung wird langsam 1 mL NaNO₃ Lösung [75 g*L⁻¹] hinzugefügt.
- Danach wird langsam 1 mL NaH₂PO₄ Lösung [5 g*L⁻¹] hinzugefügt.
- Dann kommt 1 mL der Spurenelemente-Lösung.
- Die Lösung wird auf 1.000 mL mit ultrareinem Wasser aufgefüllt.
- Der pH-Wert wird mit HCl/NaOH bei 8.5 eingestellt.
- 24 h lang wird das Medium gerührt und der pH Wert nochmal bei 8,5 falls nötig eingestellt.
- Dann wird das Medium durch Autoklavieren sterilisiert.

Tabelle 5.11: Zusammensetzung des F/2-Mediums.

Substanz	Konzentration [g*L ⁻¹]	verwendete Menge [mL]
NaNO ₃	75 g	1 mL
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5 g	1 mL

Tabelle 5.12: Zusammensetzung der Spurenelemente von F/2-Medium.

Substanz	Konzentration [g*L ⁻¹]	verwendete Menge [mL]
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15 g	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4,36 g	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180 g	1 mL
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22 g	1 mL
CoCl ₂ ·6H ₂ O	10 g	1 mL
CuSO ₄ ·5H ₂ O	9,8 g	1 mL
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6,3 g	1 mL

5.1.3. Kultivierungssystem

5.1.3.1. Photobioreaktor

Der selbstentwickelte und charakterisierte Photobioreaktor hat ein Fassungsvermögen von 1,7 L pro Glasreaktorgefäß. Das gesamte Photobioreaktorsystem besitzt ein Volumen von 4 L. Die Reaktorteile sind miteinander mit Silikonschläuchen verbunden. Das Medium wird mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe zirkulär gepumpt (siehe Kapitel 2.4).

5.1.4. Online Messmethoden

Mit den im Ausgleichsgefäß integrierten Steuereinheiten werden vor und während der Kultivierung verschiedene Parameter geregelt und damit die Prozesse überwacht. Der pH-Wert des Kulturmediums wird kontinuierlich jeweils mit Hilfe einer Einstabmesskette (EASYFERM Plus TM, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) überwacht. Die Temperaturregelung der Reaktoren erfolgt über einen Thermomantel um das Ausgleichsgefäß, welches an einen der in den Steuereinheiten befindlichen Thermostaten angeschlossen wird. Die Temperatur wird kontinuierlich mit einem Thermoelement (PT100) überwacht. Die Druckluft- und CO₂-Konzentration werden mit Massendurchflussregler eingestellt und kontrolliert. Zu Kultivierungszwecken verwendete Gase werden durch Sterilfilter mit einer Porenweite von 0,2 µm geleitet.

5.1.5. Offline Messmethoden

5.1.5.1. Optische Dichte

Die Optische Dichte (OD₅₅₀ bis OD₇₅₀) der Kulturproben wird als Extinktion bei einer Wellenlänge je nachdem von 550 nm bis 750 nm in einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Uvikon 940, Fa. Kontron, Neufahrn) gemessen. Die Proben werden mit 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt bis diese unterhalb eines Extinktionswerts von 0,8 liegen. Gemessen wird in 1,5 mL Einwegküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gegen 0,9 % NaCl-Lösung.

5.1.5.2. Glucose-Konzentration

Zur Messung der Glucose-Konzentration wird der YSI Analysator Modell 2700 Select der Firma Yellow Springs Instruments, Ohio, USA benutzt. Die zu messenden Proben werden vor

der Messung mit ultrareinem Wasser auf eine Endkonzentration von etwa $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose verdünnt und sofern Zellmasse enthalten ist, für 4 min bei 13.000 min^{-1} in einer Zentrifuge zentrifugiert. Anschließend wird der zellfreie Überstand gemessen. Die Endkonzentration der Proben sollte unter $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ liegen, da das Gerät auf diesen Wert kalibriert ist und daher in diesem Bereich die genauesten Messergebnisse erreicht werden.

5.1.5.3. Chlorophyll-Konzentration

Für die Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration wird nach der Vorschrift von Ziegler und Egle [81] vorgegangen. Für dieses Vorgehen werden jeweils 2 mL der Algensuspensionen bei 4.000 g für 8 Minuten lang pelletiert. Anschließend werden 1,6 mL des Überstandes verworfen und die Mikroreaktionsgefäße mit 1,6 mL 100 % Aceton wieder auf 2 mL aufgefüllt. Das Pellet wird resuspendiert und die Mikroreaktionsgefäße werden im Dunkeln auf Eis aufbewahrt, bis sich das Chlorophyll vollständig im 80 % Acetongemisch gelöst hat. Schließlich wird das pigmentfreie Zellmaterial bei 1.000 g 2 Minuten lang pelletiert. Der klare Überstand wird nun spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 664 nm und 647 nm bestimmt, wobei das Zweistrahlphotometer bei 750 nm mit einer 80 % Acetonlösung kalibriert wurde. Die quantitative Chlorophyll-Konzentration wird mit nachfolgender Gleichung berechnet:

$$\text{Chl a } [\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}] = 11,78 * E_{664 \text{ nm}} - 2,29 * E_{647 \text{ nm}}$$

$$\text{Chl b } [\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}] = 20,25 * E_{647 \text{ nm}} - 4,77 * E_{664 \text{ nm}}$$

5.1.5.4. Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl von Mikroalgenkulturen wurde mit einer Zählkammer (Neubauer-Improved, LO – Laboroptik, Friedrichsdorf) und einem Forschungsmikroskop Olympus IX-50 mit 40-facher Vergrößerung (Olympus, Japan) durchgeführt. So werden in der Zählkammer (Abbildung 5.1) unter dem Lichtmikroskop nur die Trichome ausgezählt. Durch die bekannten Abmaße dieser Zählkammer ist dann eine Hochrechnung der Trichomzahl auf einen Milliliter über nachfolgende Formel möglich.

Formel 5.1: Formel für die Bestimmung von Zellzahlen mit Zählkammer.

$$\frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) * Kammertiefe (mm) * Verdünnung}} = \text{Zellzahl pro mL}$$

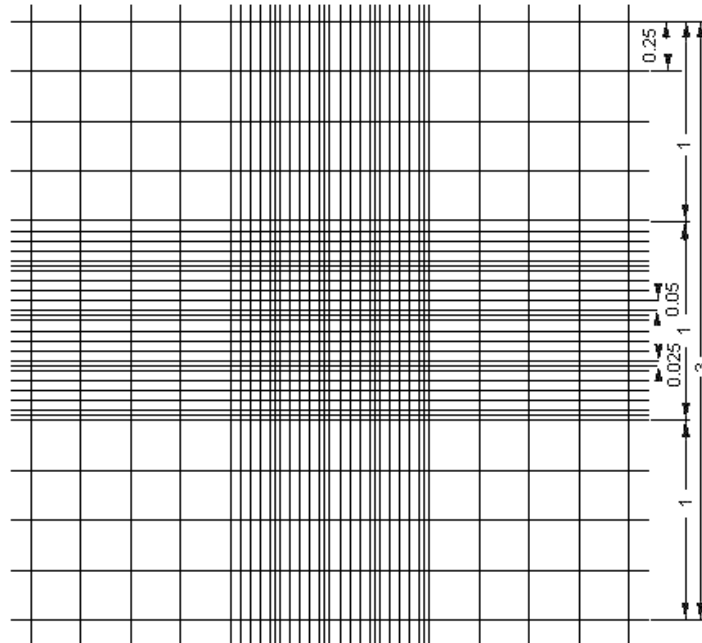


Abbildung 5.1: Neubauer-Improved-Zählkammer.

5.1.5.5. Ermittlung des pH-Wertes

Während der Kultivierungen von Mikroalgen erfolgt neben der Bestimmung der Optischen Dichte, der Zellzahl und der Chlorophyllkonzentration auch die Überprüfung des pH-Wertes. Zu diesem Zweck wird der pH-Wert der Algensuspensionen zu den Zeitpunkten der Probenentnahme mit einem pH-Meter gemessen.

5.1.5.6. Kalibration der Pumpe

Die verwendete Pumpe der Firma Heidolph ermöglicht eine Regelung der Pumpgeschwindigkeit von 1-240 Umdrehungen pro Minute ($U \cdot \text{min}^{-1}$). Zur Kalibration werden bei fest einge-

stellten Werten von 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 und 200 $\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$ das Volumen von ultra-reinem Wasser bestimmt. Daraus wird das bestimmte Volumen gegen die zugehörigen Umdrehungen pro Minute (rpm) aufgetragen. Es ergibt sich ein linearer Verlauf (Abbildung 5.2).

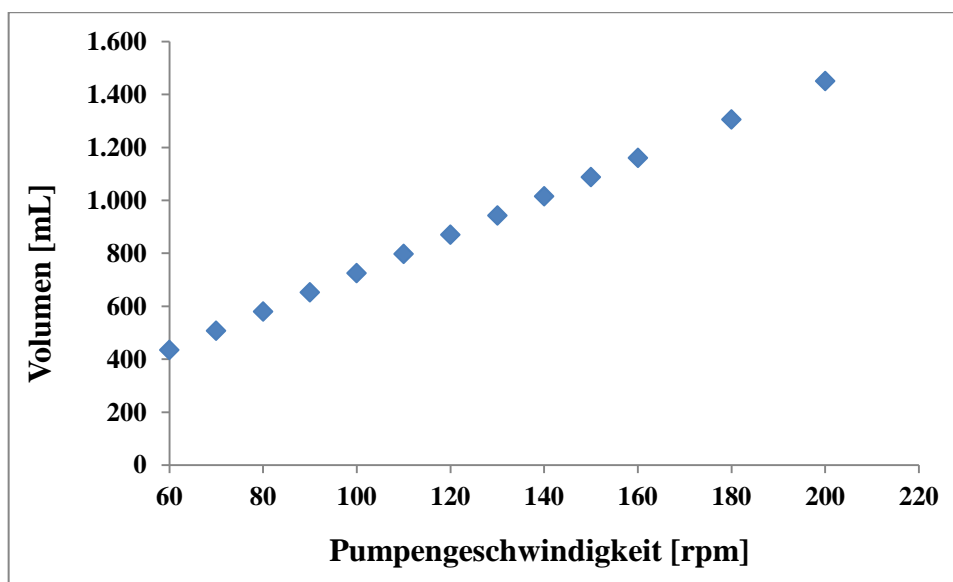


Abbildung 5.2: Die Kalibrationskurve von der Pumpe der Firma Heidolph.

5.1.6. Die in der Arbeit verwendeten Programme

Für die Überwachung von Mikroalgenkultivierungen wird hauptsächlich ein Objektiv mit 20-facher Vergrößerung verwendet. Bei hoher Zelldichte haften die Zellen an der Messzone, was die Genauigkeit der Messungen beeinträchtigt. Um dies zu verhindern, wird die Messzone je nach Kultivierungsdauer in regelmäßigen Intervallen geöffnet und wieder geschlossen, gleichzeitig wird auch die Pumpengeschwindigkeit erhöht, damit die Messzone von Zellen befreit ist. Die Bilder werden mit einer CCD-Kamera des Typus XCD-SX 910 von Sony aufgenommen. Am unteren Ende des Mikroskops befindet sich eine Lichtquelle in Form einer grünen LED ($\lambda = 505 \text{ nm}$). Für die Überwachung der Mikroalgenkultivierungen wird jede Stunde ein Aufnahmezyklus mit 50 Aufnahmen im Abstand von 1 s mit einer Belichtungsdauer von $400 \mu\text{s}$ durchgeführt. Die Versuchsdauer für jeden Mikroalgenstamm beträgt über 300 h.

Für die Auswertung der aufgenommenen Bilder wurde ein Auswertungsprogramm erstellt. Für verschiedene Zelltypen können Auswertelgorithmen modular nachgerüstet werden.

Der gesamte Prozess wird mit dem Programm in-situ Control gesteuert. Die gespeicherten Bilder können während der Kultivierung und/oder nach abgeschlossener Kultivierung mit dem Programm in-Situ Analysis ausgewertet werden, wobei die ausgewerteten Bilder parallel zu den Rohdaten auf der Festplatte gespeichert werden.

5.1.6.1. In-situ Control

Für die Bildaufnahme und die Steuerung des In-situ-Mikroskops und Durchflussmikroskops wird die Software in-situ Control verwendet, welche im Institut für Technische Chemie entwickelt wurde. Mit der Software in-situ Control können die Messzyklen, Anzahl der Bilder pro Zyklus, die Belichtung, die Höhe der Messzone und die Optionen von Datenspeicherung gesteuert und kontrolliert werden. Der Außen- und Innentubus mit Objektiv für beide Mikroskoptypen können über die Schrittmotoren durch in-situ Control schrittweise bewegt werden; eine manuelle Einstellung ist ebenfalls möglich. Die Schrittstufen (1, 10, 100 und 1.000 Schritte) können beliebig gewählt werden. 1 Schritt entspricht genau 1,25 μm . Vor dem Kultivierungsprozess wird der Außen- und Innentubus ohne Optik und Motorteil mit dem Bioreaktor autoklaviert. Für die Messungen vor der Kultivierung werden die elektronischen Mikroskopteile und die Optik an das System angeschlossen und die Kalibration (Nullpunktkalibration) durchgeführt. Für die Kalibration wird die Messzone eingangs komplett geschlossen, manuell oder über Schrittmotoren. Um das genaue Volumen der Messzone zu berechnen, wird der Abstand zwischen den Saphirscheiben auf dem in-situ Control Bildschirm dargestellt. In-situ Control errechnet anschließend das Volumen der Messzone aus dem Abstand der Saphirscheiben, multipliziert mit dem Gesichtsfeld. Das Gesichtsfeld entspricht der Anzahl der Pixel, multipliziert mit der Pixelfläche eines Pixels. Die Pixelfläche des Pixels hängt von der Vergrößerung eines Objektivs ab. Die Anzahl der Bilder, die in einem Zyklus aufgenommen werden und der Zeitabstand zwischen Zyklen kann im Bereich 1-10 s beliebig eingestellt werden. Um an der Saphirscheibe anhaftende Zellen zu entfernen, kann der Spalt zwischen den Zyklen geöffnet und wieder geschlossen werden. Die Bilder werden in dem Format von Bitmap-Dateien (.bmp) gespeichert und im Dateinamen wird das Datum, die Uhrzeit, die Zyklus- und Bildnummer sowie der Name des Experiments vermerkt. Zusätzlich wird zu jedem gespeicherten Bild eine Textdatei mit einem identischen Namen erstellt, die Informationen über die eingestellten Parameter des in-situ Mikroskops oder Durchflussmikroskops und der CCD-Kamera zum Zeitpunkt der Bildaufnahme enthält. Außerdem wird eine ise-Datei (in-situ

Experiment) erstellt, die während eines Experiments die Namen aller bereits aufgenommenen Bilder archiviert. Im Fall eines unplanmäßigen Programmabbruchs kann anhand der *ise*-Datei die genaue Uhrzeit des Abbruchs festgestellt und das Experiment über eine *Resume*-Funktion fortgesetzt werden. In der folgenden Tabelle 5.13 sind die Aufnahmeparameter und ihre zulässigen Werte dargestellt.

Tabelle 5.13: Parameter und Einstellungsbereich von in-situ Control [43].

Parameter	Einstellungsbereich
Zyklusanzahl	1 – 99999
Zyklusintervall	1- 720 min
Bilder pro Zyklus	1-30000
Zeit zwischen zwei Bildern	0,1-300 s
Beleuchtungsstärke von LED	0-100 %
Belichtungszeit	9 μ s - 16 s
Helligkeit	0 – 511
Kontrast	384 – 1023

Abbildung 5.3 zeigt das Programm in-situ Control im Livemodus während einer Kultivierung von *Chlorella vulgaris*. Die *C. vulgaris* Zellen sind gut zu erkennen. Die Zellen, die in weiße eingerahmt sind, werden ausgewertet. Auf der rechten Seite sind die verwendeten Parameter dargestellt.

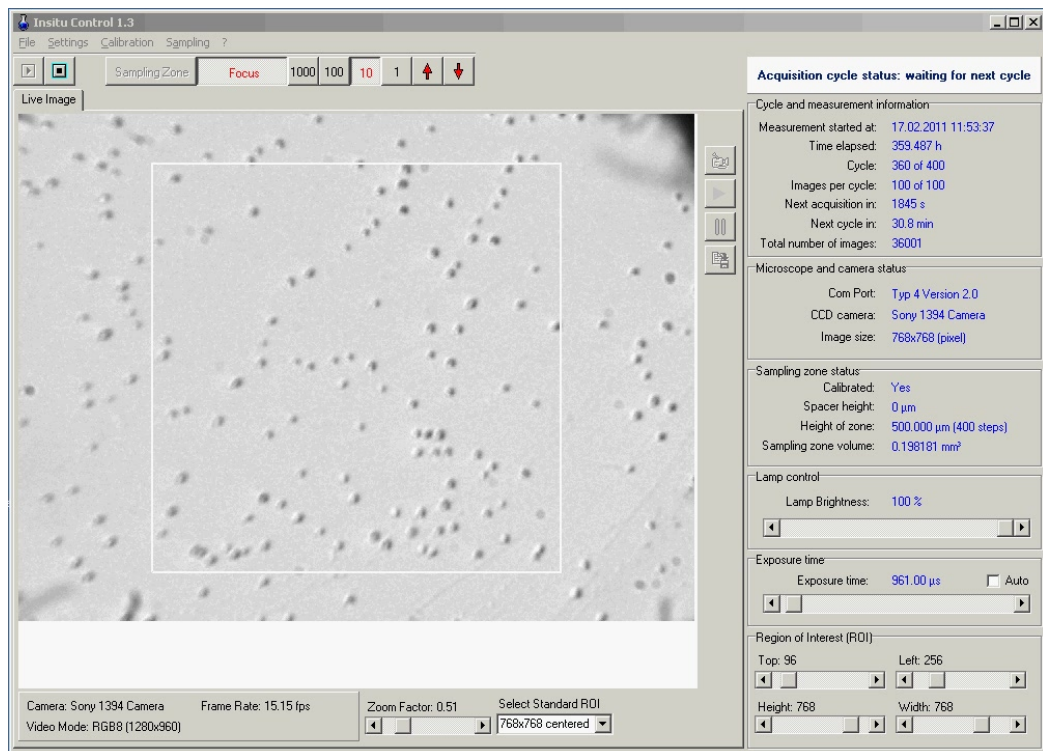


Abbildung 5.3: Benutzeroberfläche von in-situ Control 1.3. Im diesem Fenster ist ein live aufgenommenes Bild während der Kultivierung von *Chlorella vulgaris* zu sehen. Im rechten Teil sind die zur Steuerung und Bildaufnahme verwendeten Parameter gelistet.

5.1.6.2. In-situ Analysis

In-situ Analysis ist auch ein im Institut für Technische Chemie entwickeltes Programm, das die vom in-Situ Control Programm aufgenommenen Bilder auswertet, entweder während des Kultivierungsprozesses oder nach der Kultivierung. Mit der Software in-situ Analysis wurden bereits Bilder von Hefezellen, Tierzellen und Kristallpartikeln ausgewertet. In-situ Control ist modular aufgebaut. In dieser Dissertation wird die Aufnahme- und Auswertungssoftware auf die unterschiedlichen Mikroalgenkultivierungen angewendet.

Durch die flexible Gestaltung der Software hat der Benutzer die Möglichkeit weitere Module mit anderen Auswertalgorithmen als dynamische Bibliothek-Dateien (.dll) hinzuzufügen oder bereits bestehende Algorithmen zu ändern. Für eine fehlerfreie Kommunikation zwischen Hauptprogramm und Bibliothek müssen die Algorithmen einer dll definierten Struktur folgen. Diese Informationen können dann im Hauptprogramm visualisiert und exportiert werden [4].

Die Programmierung der Software wurde wie ISC (in-situ Control) ebenfalls in der Programmiersprache Delphi 7.0 durchgeführt.

Durch Auswählender Menüpunkte können bereits analysierte Experimente geladen, Analysendurchläufe gestartet bzw. abgebrochen und Einzelbilder ausgewertet werden. Nach dem Laden eines Auswertungsalgorithmus können die Parameter (Schwellenwerte) auf den zu untersuchenden Prozess angepasst werden. Der Hauptteil des Anzeigenfensters ist für Graphiken und Tabellen reserviert. Das Originalbild (aufgenommen mit dem in-situ Mikroskop-System), das Ergebnisbild und die Analysenergebnisse des ausgewerteten Bildes können als Tabelle dargestellt werden. Das Logbuch der während der Auswertung aufgetretenen Fehler und die Ergebnisse der Auswertung können als Diagramm oder Histogramm angezeigt werden. Das Programm enthält diverse Funktionen zur Visualisierung der Diagramme bzw. Histogramme. Des Weiteren sind zurzeit drei Filtertypen in die Software integriert: der Mittelwert-, Median- und Savitzky-Golay-Filter. Die fertiggestellten Analysegraphiken können als Bitmap-Grafik exportiert, in der Zwischenablage abgelegt oder als Textdatei gespeichert werden.

Die durch in-situ Analysis dargestellten Diagramme werden auch als Bitmap-Datei gespeichert. Das Programm in-situ Analysis arbeitet mit dem Programm in-situ Control zusammen, d. h., eine laufende Messung in in-situ Control kann mit in-situ Analysis in Echtzeit oder auch nach beendeter Kultivierung ausgewertet werden.

5.1.7. Die Zellbilder von den verwendeten Mikroalgenstämmen

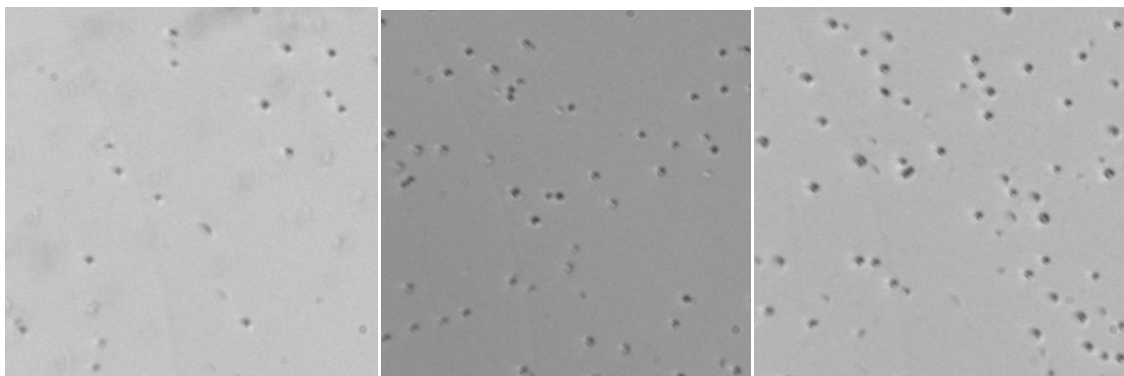


Abbildung 5.4: Die online Aufnahme der *Nannochloropsis oculata* Zellen mit Durchflussmikroskop während der Photobioreaktorkultivierung.

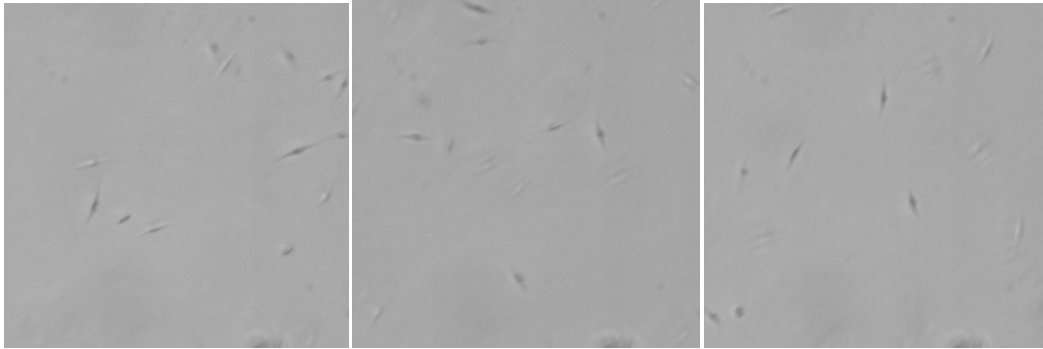


Abbildung 5.5: Die *Phaeodactylum tricorutum* Zellen während der Photobioreaktorkultivierung.

5.1.8. Die Abbildungen der Prozessanalytik-Anordnungen

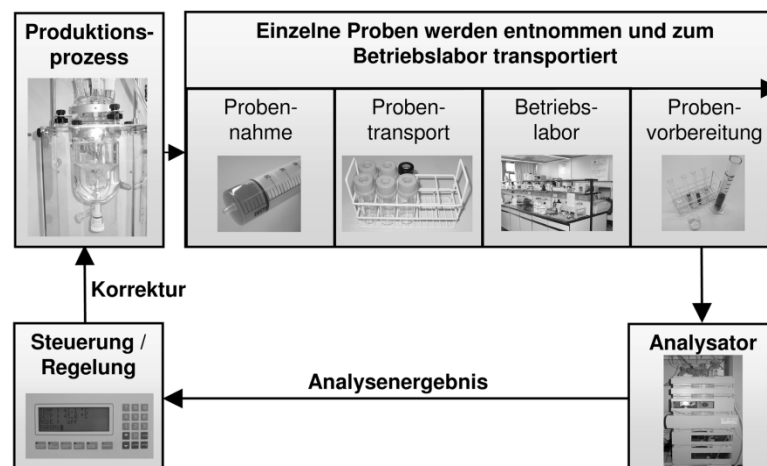


Abbildung 5.6: Steuerung und Regelung eines Prozesses mit offline Analytik [42].

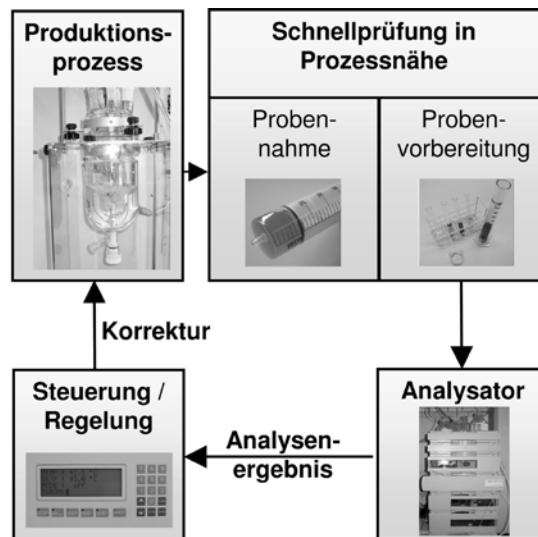


Abbildung 5.7: Steuerung und Regelung eines Prozesses mit atline Analytik [42].

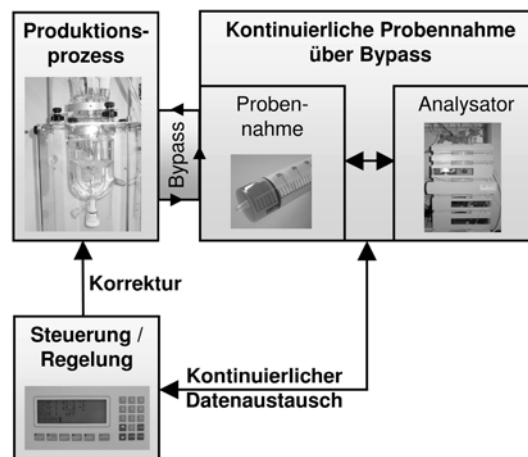


Abbildung 5.8: Steuerung und Regelung eines Prozesses mit online Analytik [42].

5.2. Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Material	Typus, Hersteller, Ort
Arium	661 Ultrapure water system Sartorius Stedim AG, Göttingen.
Autoklav	Systec V-150 Systec GmbH, Osnabrück
CCD-Kamera	XCD-SX910 Sony Corporation, Tokyo, Japan.
Durchflussmikroskop	Sartorius Stedim AG, Göttingen.
Einmalhandschuhe	Semperguard Semperit AG Holding, Wien, Österreich
Einmalküvetten	10*4*45 mm Polystyrol/Polystyrene Sarstedt AG & Co, Nümbrecht.
Glasflasche	1.000 mL Duran Schott AG, Mainz.
Inkubator	Heidolph Inkubator 1.000, Unimax 10/0, Heidolph Elektro GmbH & Co. Kg, Kelheim.
<i>In-situ Mikroskop</i>	Sartorius Stedim AG, Göttingen.
Leuchtstoffrohre	Osram L16W/640 Cool White, Osram GmbH, München.
Lichteinheit	Secret Jardin tneon 72 W, China
Lichtmikroskop	Olympus BX41 Olympus Corporation, Tokio, Japan
Magnetrührer	
Massendurchflusskontroll/-messgerät	Bronkhorst High Tech B.V Ruurlo.
Massendurchflussregler	F-201 CV, High Tech B.V Ruurlo.
Mikroreaktionsgefäße	1,5 und 2 mL Sarstedt AG & Co, Nümbrecht.

Peristaltikpumpe	Heidolph Pumpdrive 5206 Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach.
pH Meter	605 Metrohm
Photobioreaktor	Pfeufer Hannover.
Pipetten	1-10 µL, 10-100 µL, 100-1.000 µL Eppendorf AG, Hamburg.
Pipettenspitzen	diverse Typen Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe.
Präzisionswaage	AC 211S Sartorius Stedim AG, Göttingen.
Reagenz- und Zentrifugenrohren	15 mL, 50 mL Sarstedt AG & Co, Nümbrecht.
Sauerstoffmessbox (Fibox 3)	Presens Precision GmbH, Regensburg.
Sauerstoff Sensor- <i>patches</i> (5 mm)	Presens Precision GmbH, Regensburg.
Schlauchpumpe	TL Meredos GmbH, Bovenden.
Schüttelkolben	300 mL, 500 mL und 1.000 mL mit 2 Schikanen Kimax Kimble
Schüttler	Certomat S II B. Braun
Spritzen	20 mL Henke, Sass, Wolf, Tuttlingen.
Spritzenvorsatzsterilfilter	Minisart 0,2 µm Sartorius Stedim AG, Göttingen.
Sterilbank	HERAsafe KS Thermo scientific, Langenselbold.
Sterilfilter	0,2 µm Sartorius Stedim AG, Göttingen.
UV-VIS-Spektrometer	Varian, Cary 50 Scan, Palo Alto, CA, USA
Schüttler	Vibrofix VF 1 Janke & Kunkel IKA Werk, Staufen.

Vortexer	Whirli Mixer Fisons
YSI	2700 Select biochemistry analyser, Yellow Springs Instruments, Letchworth, Großbritannien.
Zählkammer	Neubauer-Improved LO – Laboroptik, Friedrichsdorf
Zentrifuge	Biofuge pico Heraeus Kendro, Osterode.
Zentrifuge	Eppendorf 5415c Eppendorf AG, Hamburg.
Zweistrahlphotometer	Uvikon Spektrophotometer 922 Kontron Instruments

5.3. Verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller, Ort
Acetonitril	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München.
Astaxanthin	
Biotin	Fluka Chemie AG, Buchs.
Borsäure	Serva
Calciumchlorid Dihydrat	Fluka Chemie AG, Buchs.
Calciumsulfat Dihydrat	Riedel-de Haën, heute Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze.
Cobaltchlorid Hexahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs.
di-Ammoniumhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs.
di-Ammoniumsulfat	Fluka Chemie AG, Buchs.
di-Kaliumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt.
di-Natriumhydrogenphosphat	Riedel-de Haën, heute Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze.
Eisensulfat Heptahydrat	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München.
Eisentrichlorid Hexahydrat	Riedel-de Haën, heute Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze.
Glukose Monohydrat	Fluka Chemie AG, Buchs.
Kaliumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs.
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt.
Kaliumhydroxid	Fluka Chemie AG, Buchs.
Kaliumnitrat	Riedel-de Haën, heute Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze.
Kupfersulfat Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt.
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs.
Manganchlorid Tetrahydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt.
Mangansulfat Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt.
Natriumacetat	Fluka Chemie AG, Buchs.
Natriumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs.

Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Fluka Chemie AG, Buchs.
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Fluka Chemie AG, Buchs.
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt.
Natriummolybdat Dihydrat	Riedel-de Haën, heute Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze.
Natriumsulfit	Merck KGaA, Darmstadt.
Thiaminhydrochlorid (Vitamin B ₁)	Fluka Chemie AG, Buchs.
Vitamin B ₁₂	Fluka Chemie AG, Buchs.
Zinksulfat Heptahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs.

6. Literatur

- [1] Qiang H., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A.: Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances (2008). *The Plant Journal* 54 (4), S. 621–639.
- [2] Konstantinov K., Chuppa S., Sajan E., Tsai Y., Yoon S.J., Golini F.: Real-time biomass-concentration monitoring in animal-cell cultures (1994). *Trends in Biotechnology* 12 (8), S. 324-333.
- [3] Frerichs J.G.: Entwicklung eines in-situ Mikroskops zur bildgestützten Online Überwachung von Bioprozessen. Leibniz Universität Hannover, Dissertation (2000).
- [4] Lindner P.: Entwicklung von Software-Systemen zur Planung, Datenaufnahme und –auswertung von Bioprozessen. Leibniz Universität Hannover, Dissertation (2006).
- [5] Algen Biotechnologie, Bestandsaufnahme, Vision und strategische Weiterentwicklung. http://www.dechema.de/dechema_media/Downloads/Positionspapiere/algen.pdf [Abrufdatum 10.08.2013, 11:21]
- [6] Baum D.: Scinexx Das Wissensmagazin, Kraftpaket Alge, Was steckt in der Algen? (2005). <http://www.scinexx.de/dossier-detail-224-6.html> [Abrufdatum 25.10.2012, 17.43].
- [7] Hemschemeier A.C.: Das anaerobe Leben der photosynthetischen Alge *Chlamydomonas reinhardtii*. Ruhr-Universität Bochum, Dissertation (2005).
- [8] Umweltbundesamt, Mikroalgen – Wie lassen sie sich zur CO₂-Fixierung, Biomasse- und Biotreibstoffproduktion oder Wasserstoffproduktion nutzen? (2010). <http://www.umweltbundesamt.de/wasser/themen/meere/mikroalgen.htm> [Abrufdatum 26.10.2012, 10:12]
- [9] Maul J.E., Lilly J.W., Cui L., de Pamphilis C.W., Miller W., Harris E.H., Stern D.B.: The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: Islands of genes in a sea of repeats (2002). *Plant Cell* 14, S. 2659–2679.
- [10] Harris E.H.: *Chlamydomonas* as a model organism (2001). *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, S. 363-406.
- [11] Tam L.W., Lefebvre P.A.: Cloning of flagellar genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by DNA insertional mutagenesis (1993). *Genetics* 135 (2), S. 375–384.
- [12] Quelle der REM Aufnahme: Dartmouth Electron Microscope Facility.

- [13] Schlösser U.G.: Entwicklungsstadien- und sippenspezifische Zellwand-Autolysine bei der Freisetzung von Fortpflanzungszellen in der Gattung *Chlamydomonas* (1976). Berichte der Deutsche Botanischen Gesellschaft 89, S 1–56.
- [14] Smith R.E.H., Harrison W.G., Harris L.R., Herman A.W.: Vertical fine structure of particulate matter and nutrients in sea ice of the high arctic (1990). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 47 (7), S. 1348–1355.
- [15] Waffenschmidt S., Spessert R., Jaenicke L.: Oligosaccharide side chains of wall molecules are essential for cell wall lysis in *Chlamydomonas reinhardtii* (1988). Planta 175, S. 513-519.
- [16] Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O, Harris E.H., Karpowicz S.J., Witman G.B., Terry A., Salamov A., Fritz-Laylin L.K., Maréchal-Drouard L., Marshall W.F., Qu L.H., Nelson D.R., Sanderfoot A.A., Spalding M.H., Kapitonov V.V., Ren Q., Ferris P., Lindquist E., Shapiro H., Lucas S.M., Grimwood J., Schmutz J., Cardol P., Cerutti H., Chanfreau G., Chen C.L., Cognat V., Croft M.T., Dent R., Dutcher S., Fernández E., Fukuzawa H., González-Ballester D., González-Halphen D., Hallmann A., Hanikenne M., Hippler M., Inwood W., Jabbari K., Kalanon M., Kuras R., Lefebvre P.A., Lemaire S.D., Lobanov A.V., Lohr M., Manuell A., Meier I., Mets L., Mittag M., Mittelmeier T., Moroney J.V., Moseley J., Napoli C., Nedelcu A.M., Niyogi K., Novoselov S.V., Paulsen I.T., Pazour G., Purton S., Ral J.P., Riaño-Pachón D.M., Riekhof W., Rymarquis L., Schroda M., Stern D., Umen J., Willows R., Wilson N., Zimmer S.L., Allmer J, Balk J., Bisova K., Chen C.J., Elias M., Gendler K., Hauser C., Lamb M.R., Ledford H., Long J.C., Minagawa J., Page M.D., Pan J., Pootakham W., Roje S., Rose A., Stahlberg E., Terauchi A.M., Yang P., Ball S., Bowler C., Dieckmann C.L., Gladyshev V.N., Green P., Jorgensen R., Mayfield S., Mueller-Roeber B., Rajamani S., Sayre R.T., Brokstein P., Dubchak I., Goodstein D., Hornick L., Huang Y.W., Jhaveri J., Luo Y., Martínez D., Ngau W.C., Otiillar B., Poliakov A., Porter A., Szajkowski L., Werner G., Zhou K., Grigoriev I.V., Rokhsar D.S., Grossman A.R.: The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions (2007). Science 318 (5848), S. 245-50.
- [17] Jaenicke, L., Kuhne W., Spessert R., Wahle U., Waffenschmidt S.: Cell-wall lytic enzymes (autolysins) of *Chlamydomonas reinhardtii* are (hydroxy)proline-specific proteases (1987). European journal of biochemistry/FEBS 170 (1-2), S. 485–91.
- [18] Harris, E.H.: The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, San Diego (1989). Science 246 (4936), S. 1503-4.

- [19] Famintzin, A.: Die Wirkung des Lichtes auf Algen und einige andere ihnen verwandte Organismen. Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik (1878). S. 175.
- [20] Streble, H., Krauter, H.: Das Leben im Wassertropfen. Mikroflora und Mikrofauna des Süßwassers. Ein Bestimmungsbuch, Stuttgart, Deutschland (1988).
- [21] Ecke Dr. M.: Mikroalgen der Spezies *C vulgaris* ein Naturprodukt mit in Europa bisher unbeachtetem pharmazeutischen Potential, Erschienen in: Die Naturheilkunde, Sonderdruck (2005).
- [22] Vogel M.: Zur Aufnahme und Bindung von Uran (VI) durch die Grünealge *Chlorella vulgaris*. Institut für Radiochemie des Forschungszentrums Dresden-Rossendorf, Dissertation (2011).
- [23] Czygan F.C.: Blood-rain and blood-snow: nitrogen-deficient cells of *Haematococcus pluvialis* and *Chlamydomonas nivalis* (1970). Archives of microbiology 74 (1), S. 69-76.
- [24] Hagen C., Siegmund S., Braune W.: Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation (2002). European Journal of Phycology 37 (2), S. 217–226.
- [25] Kobayashi, M., Kurimura Y., Kakizono T., Nishio N., Tsuji Y.: Morphological changes in the life cycle of green alga *Haematococcus pluvialis* (1997). Journal of Fermentation and Bioengineering 84, S. 61-63.
- [26] Mikroskopia (2006): *Haematococcus pluvialis*. .
<http://forum.mikroskopia.com/index.php?showtopic=5149> [Abrufdatum 16.10.2012, 12:40].
- [27] Aflalo C, Meshulam Y, Zarka A, Boussiba S.: On the relative efficiency of two vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis* (2007). Biotechnology and Bioengineering 98 (1), S. 300-5.
- [28] Fabregas, J., Dominguez, A., Regueiro, M., Maseda, A. and Otero, A.: Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis* (2000). Applied Microbiology and Biotechnology 53 (5), S. 530-5.
- [29] Boussiba S.: Carotenogenesis in the green algae *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stressresponse (2000). Journal of Plant Physiology 108 (2), S. 111-117.
- [30] Suda, S., Atsumi M., Miyashita H.: Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae) (2002). Phycologia 41 (3), S. 273-279.

- [31] Krienitz, L., Ustinova I., Friedl T., Huss V.: Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) (2001). *Journal of Phycology* 37 (5), S. 852-855.
- [32] Whittle S.J., Casselton P.J.: The chloroplast pigments of the algal classes *Eustigmatophyceae* and *Xanthophyceae* (1975). *British Phycological Journal* 10, S. 179-191.
- [33] Sheng-Yi Chiu, Kao C.Y., Tsai M.T., Ong S.C., Chen C.H., Lin C.S.: Lipid accumulation and CO₂ utilization of *N. oculata* in response to CO₂ aeration (2009). *Bioresource Technology* 100, S: 833–838.
- [34] Bohlin, K.: Zur Morphologie und Biologie einzelliger Algen. Öfversigt af Kongliga [Svenska] Vetenskademiens Förhanligar (1897). Stockholm 54, S. 507-529.
- [35] Rippka R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman, R.Y. Stanier: Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria (1979). *Journal of General Microbiology*. 43, S. 237–241.
- [36] Ciferri, O.: *Spirulina*, the edible microorganism (1983). *Microbiological Reviews* 47 (4), S. 551-578.
- [37] Falquet, J.; Hurni, J.P.: *Spiruline*, Aspects Nutritionnels. Antenna Technologies, Genève (2006).
- [38] Markou, G., Georgakakis D.: Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review (2011). *Applied Energy* 88, S. 3389–3401.
- [39] Balloni, W., Filpi, C., Florenzano, G.: Recent trends in the research on wastewater reclamation by photosynthetic bacteria and algal systems. Shelef, G., Soeder, C. J. (editors), *Algae Biomass*. Elsevier, North-Holland, Biomedical Pres, Amsterdam (1980), S. 217-227.
- [40] Hu Q.: Environmental effects on cell composition. In: Richmond A, editor. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and applied psychology*. Oxford (2004). Blackwell Science 85 (6), S. 1004-1012.
- [41] Durand-Chastel H.: Production and use of *Spirulina* in Mexico. Shelef G., Soeder C.J. (editors). *Algae Biomass Elsevier: North Holland Biomedical Press*, Amsterdam (1980). S. 243-253.
- [42] Kessler R.W.: *Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis*, Weinheim (2006).

- [43] Bluma A.: Adaption inline mikroskopischer Verfahren an die Überwachung und Charakterisierung biotechnologischer Kristallisationsprozesse. Leibniz Universität Hannover, Dissertation (2009).
- [44] Bluma A., Höpfner T., Prediger A., Glindkamp A., Beutel S., Scheper T.: Process analytical sensors and image-based techniques for single-use bioreactors (2011). *Engineering in Life Sciences*. 11 (6), S. 550-553.
- [45] Höpfner T., Bluma A., Rudolph G., Lindner P., Scheper T.: A review of non-invasive optical-based image analysis systems for continuous bioprocess monitoring (2010). *Bioprocess and Biosystems Engineering* 33 (2), S. 247-256.
- [46] Prediger A., Bluma A., Höpfner T., Lindner P., Beutel S., Müller J.J., Hilterhaus L., Liese A., Scheper T.: In Situ Microscopy for Online Monitoring of Enzyme Supports and Two-Phase Systems (2011). *Chemie Ingenieur Technik* 83 (6), S. 884-887.
- [47] Borowitzka M.A.: *Culturing Microalgae in Outdoor Ponds*. Algal Culturing Techniques, R. A. Andersen, London (2005). Elsevier Academic Press: S. 205-218.
- [48] Wang B., Lan C. Q., Horsman M.: Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses (2012). *Biotechnology Advances* 30 (4), S. 904-912.
- [49] Singh R.N., Sharma S.: Development of suitable photobioreactor for algae production-A review (2012). *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16 (4), S. 2347-2353.
- [50] Rawat I., Kumar R. R., Mutanda T., Bux F.: Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production (2013). *Applied Energy* 103, S. 444-467.
- [51] Slegers P.M., Wijffels R.H., van Straten G., van Boxtel A.J.B.: Design scenarios for flat panel photobioreactors (2011). *Applied Energy* 88 (10), S. 3342-3353.
- [52] Chen C.Y., Yeh K.L., Aisyah R., Lee D.J., Chang J.S.: Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review (2011). *Bioresource Technology* 102 (1), S. 71-81.
- [53] Grobbelaar J.U.: Microalgal biomass production: challenges and realities (2010). *Photosynthesis Research* 106 (1-2), S. 135-144.
- [54] Xu L., Weathers P.J., Xiong X.R., Liu C.Z.: Microalgal bioreactors: challenges and opportunities (2009). *Engineering in Life Sciences* 9 (3), S. 178-189.
- [55] Kommerzielle Mikroalgenproduktionsanlagen.
<http://atlanticgreenfuels.com/assets/images/SympDec16-Fig2b1.jpg>
[Stand 08.01.2013, 10:20].
- [56] Pulz, O.: Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms (2001). *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, S. 287-293.

- [57] Algosolutions, Algosolutions Phase 1: Astaxanthin (*Haematococcus pluvialis*).
<http://algosolutions.com/Algosolutions%20phase%201.pdf> [Abrufdatum 11.10.2012, 09:50]
- [58] Csogor Z., Herrenbauer M., Perner M., Schmidt I., K. Posten C.: Design of a photobioreactor for modelling purposes (1999). *Chemical Engineering and Processing* 38 (4-6), S. 517-523.
- [59] Janssen M., Tramper J., Mur L.R., Wijffels R.H.: Enclosed outdoor photobioreactors: Lightregime, photosynthetic efficiency, scale-up and future prospects (2003). *Biotechnology and Bioengineering* 81 (2), S. 193-210.
- [59a] Richmond A.: Microalgal biotechnology at the turn of the millennium (2000). A personal view. *Journal of Applied Phycology* 12, S. 441-45.
- [60] Allinger P., Warthmann T., Biopro Baden-Württemberg GmbH, Wie Mikroalgen Kohlendioxid binden und als Rohstoff dienen (2011).
<http://biopro.de/magazin/thema/06273/index.html?lang=de&artikelid=/artikel/06956/index.html> [Stand 16.01.2013, 11:10].
- [61] Algenbiomasse
<http://www2.fz-juelich.de/icg/icg-3/Lichtstress/Algenbiomasse>
[Stand 14.10.2012, 14:23]
- [62] biotechnologie.de - Initiative des Bundesministeriums:
<http://www.biotechnologie.de/BIO/Navigation/DE/Hintergrund/themendossiers,did=66146.html#> [Abrufdatum 06.10.2012, 10:35].
- [63] Seidl S.: Prozesstechnik online, Pilotanlage mit 180-l-FPA-Reaktoren in Eutingen-Weitingen (2010).
www.cav.de/0310400 [Abrufdatum: 10.08.2013, 11:30]
- [64] Fraunhofer, Flache Photobioreaktoren
http://www-alt.igb.fraunhofer.de/www/gf/umwelt/algen/en/Scale-up_en.html
[Abrufdatum 28.10.2012, 15:10].
- [65] Havlik I., Reardon K.F., Ünal M., Lindner P., Prediger A., Babitzky A., Beutel S., Scheper T.: Monitoring of microalgal cultivations with online, flow-through microscopy (2013). *Algal Research* 2, S. 253-257.
- [66] Suh I.S. and Lee S.B.: Optimization of radiator position in an internally radiating photobioreactor: A model simulation study (2003). *Journal of Microbiology and Biotechnology* 13 (5), S. 789-793.

- [67] Pegallapati A.K., Arudchelvam Y., Nirmalakhandan N.: Energy-efficient photobioreactor configuration for algal biomass production (2012). *Bioresource Technology* 126, S. 266-273.
- [68] Pegallapati A.K., Nirmalakhandan N.: Energetic evaluation of an internally illuminated photobioreactor for algal cultivation (2011). *Biotechnology letters* 33, S. 2161-2167.
- [69] Pegallapati A.K., Nirmalakhandan N.: Internally illuminated photobioreactor for algal cultivation under carbon dioxide-supplementation: Performance evaluation (2013). *Renewable Energy* 56, S. 129-135.
- [70] Gröbel M., Paravia M., Pieke S.: UV-VIS Spektrometer mit optischer Transmission, Datenblatt.
http://www.uv-groebel.de/pms_spek1.php [Abrufdatum 10.08.2013, 13:40].
- [71] Thimijan R., Heins R.D.: Photometric, radiometric, and quantum light units of measure: A review of procedures for inter conversion (1983). *HortScience* 18, S. 818–822.
- [72] Roempp, wie groß ist der k_{La} -Wert von den Reaktoren?
<http://www.roempp.com/prod/> [Abrufdatum 12.04.2013, 10:49].
- [73] Gorman, D.S., Levine R.P.: Proceedings of the National Academy of Sciences (1965). *USA* 54, S. 1665-1669.
- [74] Fan L., Vonshak A., Gabbay R., Hirshberg J., Cohen Z.: The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine (1995). *Plant and Cell Physiology* 36 (8), S. 1519-1524.
- [75] Cifuentes A.S., Gonzalez M.A., Vargas S., Hoeneisen M. Gonzalez N.: Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions (2003). *Biological Research* 36, S. 343-357.
- [76] Kobayashi M., Kakizono T., Nishio N., Nagai S., Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis* (1992). *Journal of Fermentation and Bioengineering* 74, S. 61–63.
- [77] Harker M., Tsavalos A.J., Young A.J.: Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis* (1996). *Bioresource Technology* 55, S. 207-214.
- [78] Hutner, S.H., Provasoli L., Schatz A., Haskins C.P.: Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms (1950). *Proc Am Philos Soc* 94, S. 152–170.

-
- [79] Aiba S., Ogawa T.: Assessment of growth yield of a blue- green alga, *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture (1977). Journal of General Microbiology 102: S. 179-182.
- [80] Medium Zusammensetzung
http://sagdb.uni-goettingen.de/culture_media/07%20Desmidiacean%20Medium.pdf [Stand 06.08.2013, 12:10].
- [81] Ziegler R., Egle K.: Zur quantitativen Analyse der Chloroplastenpigmente. I. Kritische Überprüfung der spektralphotometrischen Chlorophyllbestimmung (1965). Beiträge zur Biologie der Pflanzen (41), S. 11-37.

7. Lebenslauf

Mehmet Ünal

Persönliche Informationen

Geburtstag : 07.06.1981
Geburtsort : Kozakli, Türkei
Familienstand : verheiratet
Nationalität : Deutsch

Studium und berufliche Ausbildung

08/2009-10/2013 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover, Promotionsarbeit im Bereich Biotechnologie unter der Leitung von Prof. Thomas Scheper

04/2009 Abschluss des Studiums als Diplom Chemiker

10/2008-04/2009 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität mit dem Thema „Untersuchungen zur Optimierung der Actinorhodin-Produktion durch *Streptomyces coelicolor* A3(2)“ unter der Leitung von Prof. Thomas Scheper

11/2003-10/2008 Diplomstudium Chemie an der Leibniz Universität Hannover

10/1998-07/2002 Chemiestudium mit Abschluss (8 Semester) Erciyes Üniversitesi Kayseri, Türkei

Schulbildung

08/2002-10/2002 Sprachkurs am Fachsprachzentrum inklusive DSH Prüfung Leibniz Universität Hannover

09/1992-07/1998 Gymnasium mit gymnasialer Oberstufe Kozakli Lisesi Kozakli, Türkei (insgesamt 11 Jahre)

09/1987-07/1992 Grundschule Mehmet Akif Ersoy İlkokul Kozakli, Türkei

Veröffentlichungen

Artikel

- [1] Havlik I.; Reardon K. F.; Ünal M.; Lindner P.; Prediger A.; Babitzky A.; Beutel S.; Scheper T.: Monitoring of microalgal cultivations with on-line, flow-through microscopy (2013). Algal Research, doi: 10.1016/j.algal.2013.04.001

Poster

- [2] Mehmet Ünal, Michael Büring, Sascha Beutel und Thomas Scheper: Bildgebende Analyseverfahren zur Beobachtung von Mikroalgen-Bioprocessen, ZIM Innovationstag-2011, Berlin.
- [3] Mehmet Ünal, Michael Büring, Sascha Beutel und Thomas Scheper: Entwicklung und Optimierung eines in-situ Mikroskops zum Monitoring von Mikroalgenkultivierungen, 4. Bundesalgenstammtisch-2011, Hamburg.
- [4] Mehmet Ünal, Michael Büring, Andreas Prediger, Sascha Beutel und Thomas Scheper: Flow-microscopy for monitoring of microalgae cultivations in Photobioreactors, 1st European Congress of Applied Biotechnology 2011, Berlin.
- [5] Mehmet Ünal, Andreas Prediger, Michael Büring, Sascha Beutel und Thomas Scheper: *Haematococcus pluvialis* Kultivierungen und die Überwachung des Kultivierungsprozesses mittels Durchflussmikroskopie, 5. Bundesalgenstammtisch-2012, Pullach.
- [6] Andreas Prediger, Patrick Lindner, Mehmet Ünal, Ivo Havlik, Sascha Beutel und Thomas Scheper: In situ microscopy for online monitoring of microalgal cultivations, Algae Biomass Summit, Denver, CO, 2012.
- [7] Mehmet Ünal, Ivo Havlik, Patrick Lindner, Andreas Prediger, Alexander Babitzky, Sascha Beutel und Thomas Scheper: Flow-through microscopy for online monitoring of microalgal cultivations, Bundesalgenstammtisch-2013, Hamburg.

8. Übernahme fremder Leistungen

In dieser Dissertation wurden durch folgende Personen erzielte Ergebnisse oder entwickelte Geräte und Software verwendet:

Dr. Arne Bluma

Entwicklung des Durchflussmikroskops [55]

Dr. Patrick Lindner

Entwicklung der in-situ Control und in-situ Analysis Software [56]