
**Optische *In-situ*-Analytik photoautotropher
Mikroorganismen in einem entwickelten geschlossenen
Einweg-Photobioreaktorsystem**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation
von

Serge Alexander Zagermann, M. Sc.
geboren am 19.08.1985 in Bremen

2018

Referent: Prof. Dr. rer. hort. habil. Thomas Rath

Korreferent: apl. Prof. Dr. rer. nat Bernhard Huchzermeyer

Tag der Promotion: 22.12.2017

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Rath für die Annahme meines Promotionsthemas sowie für seine Betreuung und viele fruchtbare Diskussionen im Zuge der letzten Jahre. Seine Faszination für die Photonik hat auch mich nachhaltig geprägt.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer danke ich sehr für die Übernahme des Korreferates und seinen stets hervorragenden fachlichen Rat sowie für Lüneburger Aufmunterungen.

Danke Ihnen beiden für Ihre Geduld, seeeehr viel vermitteltes Wissen, Ihre Art mit Menschen umzugehen und für die Möglichkeiten die Sie mir eröffnet haben.

Ich danke meiner Oma, die IMMER für mich da war und ist. Oma, du bist die Beste!!!!
Großer Dank geht an meine Eltern, die mich im Laufe meines Studiums stets unterstützt haben und (hoffentlich?!) nie den Glauben daran verloren haben, dass diese Arbeit ein gutes Ende nimmt.

Danke an dich, Sandra, für vier unfassbar tolle Jahre! Mit dir die Welt zu entdecken hat verdammt viel Spaß gemacht!!!

Ich danke meinen FreundInnen aus Hannover, „den BremerInnen“ und allen KollegInnen und FreundInnen am BGT sowie im Institut für Botanik (Danke Birgit!) für die beste Zeit meines Lebens! Was ich von euch allen über Hilfsbereitschaft, Kollegialität, Verlässlichkeit und Freundschaft gelernt habe werde ich nie vergessen!

Und wo immer man sich wieder treffen wird: ich freu' mich drauf!

Euch, Andreas und Magdalena, sei an dieser Stelle für die Aufnahme in die Abteilung gedankt, für eure Geduld und aufmunternden Worte und eine spannende Zeit.

Dem Team der Graduiertenakademie der LUH danke ich für die gewährte Zwischenfinanzierung meines Promotionsvorhabens und die hilfreichen Beratungen.

Dasselbe gilt für alle MitarbeiterInnen der LUH, die mir und anderen in den ganzen Studienjahren mit Rat und Tat zur Seite standen.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung.....	- VII -
Abstract.....	- X -
Abkürzungsverzeichnis.....	- XIII -
1 Einleitung.....	- 1 -
2 Stand des Wissens.....	- 3 -
2.1 Einwegreaktoren, Biopolymere und phototrophe Mikroorganismen	- 3 -
2.1.1 Einweg-Photobioreaktoren	- 3 -
2.1.1.1 Systemübersicht	- 4 -
2.1.1.2 Polymermaterialien.....	- 10 -
2.1.2 Phototrophe Mikroalgen & Cyanobakterien	- 12 -
2.1.2.1 Biodiversität & Biotechnologische Nutzung.....	- 12 -
2.1.2.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	- 13 -
2.1.2.3 <i>Nostoc muscorum</i>	- 14 -
2.1.3 Biopolymere.....	- 16 -
2.1.3.1 Definition & Marktdaten	- 16 -
2.1.3.2 Biopolymere aus Polyhydroxyalkanoaten.....	- 18 -
2.1.4 Polyhydroxybutyrat (PHB)	- 19 -
2.2 Optische <i>In-situ</i> -Analysen.....	- 25 -
2.2.1 Zelldichten-Bestimmung.....	- 27 -
2.2.2 Chlorophyllfluoreszenzmessungen.....	- 29 -
2.2.3 VIS-Spektroskopie.....	- 31 -
2.2.3.1 Theoretische Grundlagen der VIS-Spektroskopie	- 31 -
2.2.3.2 Praktische Arbeiten zur VIS-Spektroskopie an phototrophen Mikroorganismen.....	- 31 -
2.2.4 NIR-Spektroskopie	- 35 -
2.2.4.1 Theoretische Grundlagen der NIR-Spektroskopie.....	- 36 -
2.2.4.2 Praktische Arbeiten zur NIR-Spektroskopie an phototrophen Mikroorganismen.....	- 36 -
2.2.5 VIS-Polarisationsspektroskopie	- 42 -
2.2.5.1 Theoretische Grundlagen der VIS-Polarisationsspektroskopie.....	- 42 -
2.2.5.2 Praktische Arbeiten zur VIS-Polarisationsspektroskopie an phototrophen Mikroorganismen.....	- 47 -
2.2.6 NIR-Polarisationsspektroskopie.....	- 50 -

2.2.6.1	Theoretische Grundlagen der NIR-Polarisationsspektroskopie	- 50 -
2.2.6.2	Praktische Arbeiten zur NIR-Polarisationsspektroskopie an phototrophen Mikroorganismen.....	- 51 -
2.2.7	Raman-Spektroskopie.....	- 52 -
2.2.7.1	Theoretische Grundlagen der Raman-Spektroskopie	- 52 -
2.2.7.2	Praktische Arbeiten zur Raman-Spektroskopie an phototrophen Mikroorganismen.....	- 54 -
3	Zielsetzung.....	- 63 -
4	Material & Methoden	- 64 -
4.1	Entwickelter Einwegreaktor	- 64 -
4.1.1	Verwendete Einweg-Polymermaterialien	- 64 -
4.1.2	Versiegelung der Einwegreaktoren	- 66 -
4.1.3	Gaswechsel-Messungen	- 67 -
4.1.4	Bestimmung der Wachstumskapazität des entwickelten Einwegreaktors	- 68 -
4.2	Kulturführung und PHB Produktion	- 70 -
4.3	PHB-Referenzanalytik.....	- 75 -
4.4	Optische <i>In-situ</i> -Analysen.....	- 76 -
4.4.1	NIR-Messungen optischer Dichten	- 78 -
4.4.2	Chlorophyllfluoreszenz-Messungen	- 79 -
4.4.3	VIS-Spektroskopie.....	- 79 -
4.4.4	NIR-Spektroskopie	- 80 -
4.4.5	VIS-Polarisationsspektroskopie	- 82 -
4.4.6	NIR-Polarisationsspektroskopie.....	- 83 -
4.4.7	Raman-Spektroskopie.....	- 84 -
4.4.7.1	Konfokale Raman-Mikrospektroskopie.....	- 85 -
4.4.7.2	VIS-Raman-Spektroskopie	- 85 -
4.4.7.3	NIR-Raman-Spektroskopie	- 88 -
4.5	Chemometrische Auswertung von Spektraldaten	- 88 -
4.5.1	Vorbehandlung von Spektraldaten.....	- 89 -
4.5.2	Hauptkomponentenanalysen	- 90 -
4.5.3	Partial-Least-quares-Regressionen.....	- 91 -
5	Ergebnisse	- 93 -
5.1	Entwickelter Einwegreaktor	- 93 -
5.1.1	Spektrale Transmissionseigenschaften der Reaktormaterialien	- 93 -
5.1.2	Gaswechsel-Messungen	- 94 -

5.1.3	Bestimmung der Wachstumskapazität des entwickelten Einwegreaktors	- 95 -
5.1.4	Dauerkulturführung im geschlossenen Einwegreaktor	- 98 -
5.2	Optische <i>In-situ</i> -Analysen.....	- 101 -
5.2.1	NIR-Messungen optischer Dichten	- 101 -
5.2.2	Chlorophyllfluoreszenz-Messungen	- 104 -
5.2.3	VIS-Spektroskopie.....	- 105 -
5.2.3.1	Vergleich von Küvetten- und <i>In-situ</i> -VIS-Spektren.....	- 106 -
5.2.3.2	Reproduzierbarkeit der <i>In-situ</i> -VIS-Spektroskopie.....	- 107 -
5.2.3.3	PHB-Referenzspektren für den unpolarisierten VIS-Bereich	- 108 -
5.2.3.4	Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten	- 109 -
5.2.3.5	Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im unpolarisierten VIS-Bereich	- 113 -
5.2.4	NIR-Spektroskopie	- 115 -
5.2.4.1	Vergleich von Küvetten- und <i>In-situ</i> -NIR-Spektren	- 115 -
5.2.4.2	Reproduzierbarkeit der <i>In-situ</i> -NIR-Spektroskopie	- 117 -
5.2.4.3	PHB-Referenzspektren für den unpolarisierten NIR-Bereich.....	- 118 -
5.2.4.4	Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten	- 119 -
5.2.4.5	Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im unpolarisierten NIR-Bereich	- 122 -
5.2.5	VIS-Polarisationsspektroskopie	- 124 -
5.2.5.1	Polarisationsabhängiges Absorptionsverhalten der Polymermaterialien im sichtbaren Spektralbereich	- 125 -
5.2.5.2	PHB-Referenzspektren für den polarisierten VIS-Bereich.....	- 125 -
5.2.5.3	Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten	- 128 -
5.2.5.4	Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im polarisierten VIS-Bereich.....	- 132 -
5.2.6	NIR-Polarisationsspektroskopie.....	- 136 -
5.2.6.1	Polarisationsabhängiges Absorptionsverhalten der Polymermaterialien im nah-infraroten Spektralbereich	- 136 -
5.2.6.2	PHB-Referenzspektren für den polarisierten NIR-Bereich	- 136 -
5.2.6.3	Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten	- 138 -
5.2.6.4	Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im polarisierten NIR-Bereich....	- 143 -
5.2.7	Konfokale Raman-Mikrospektroskopie	- 146 -
5.2.8	VIS-Raman-Spektroskopie	- 147 -
5.2.8.1	PHB-Referenzspektren für den VIS-Raman-Bereich.....	- 151 -
5.2.8.2	Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten	- 153 -
5.2.8.3	Übersicht multipler Versuchsdurchläufe der Raman-Messungen	- 156 -
5.2.9	NIR-Raman-Spektroskopie.....	- 158 -

6	Diskussion.....	- 159 -
6.1	Entwickelter Einwegreaktor	- 159 -
6.1.1	Spektrale Transmissionseigenschaften der Reaktormaterialien	- 162 -
6.1.2	Gaswechsel-Messungen	- 165 -
6.1.3	Bestimmung der Wachstumskapazität des entwickelten Einwegreaktors	- 168 -
6.1.4	Dauerkulturführung im geschlossenen Einwegreaktor	- 169 -
6.2	Optische <i>In-situ</i> -Analysen.....	- 172 -
6.2.1	NIR-Messungen optischer Dichten	- 172 -
6.2.2	Chlorophyllfluoreszenz-Messungen	- 173 -
6.2.3	VIS-Spektroskopie.....	- 175 -
6.2.3.1	Vergleich von Küvetten- und <i>In-situ</i> -VIS-Spektren.....	- 175 -
6.2.3.2	Reproduzierbarkeit der <i>In-situ</i> -VIS-Spektroskopie.....	- 177 -
6.2.3.3	PHB-Referenzspektren für den unpolarisierten VIS-Bereich	- 179 -
6.2.3.4	Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten	- 180 -
6.2.3.5	Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im unpolarisierten VIS-Bereich	- 183 -
6.2.4	NIR-Spektroskopie	- 186 -
6.2.4.1	Vergleich von Küvetten- und <i>In-situ</i> -NIR-Spektren	- 186 -
6.2.4.2	Reproduzierbarkeit der <i>In-situ</i> -NIR-Spektroskopie	- 187 -
6.2.4.3	PHB-Referenzspektren für den unpolarisierten NIR-Bereich.....	- 187 -
6.2.4.4	Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten	- 188 -
6.2.4.5	Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im unpolarisierten NIR-Bereich	- 190 -
6.2.5	VIS-Polarisationsspektroskopie	- 193 -
6.2.5.1	Polarisationsabhängiges Absorptionsverhalten der Polymermaterialien im sichtbaren Spektralbereich	- 193 -
6.2.5.2	PHB-Referenzspektren für den polarisierten VIS-Bereich.....	- 197 -
6.2.5.3	Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten	- 197 -
6.2.5.4	Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im polarisierten VIS-Bereich.....	- 201 -
6.2.6	NIR-Polarisationsspektroskopie.....	- 203 -
6.2.6.1	Polarisationsabhängiges Absorptionsverhalten der Polymermaterialien im nah-infraroten Spektralbereich	- 203 -
6.2.6.2	PHB-Referenzspektren für den polarisierten NIR-Bereich	- 203 -
6.2.6.3	Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten	- 204 -
6.2.6.4	Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im polarisierten NIR-Bereich....	- 205 -
6.2.7	Konfokale Raman-Mikrospektroskopie	- 206 -
6.2.8	VIS-Raman-Spektroskopie	- 208 -

6.2.8.1	PHB-Referenzspektren für den VIS-Raman-Bereich.....	- 209 -
6.2.8.2	Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten	- 210 -
6.2.8.3	Übersicht multipler Versuchsdurchläufe der Raman-Messungen.....	- 213 -
6.2.9	NIR-Raman-Spektroskopie.....	- 214 -
7	Schlußfolgerung & Bewertung	- 215 -
7.1	Entwickelter Einwegreaktor	- 215 -
7.2	Optische <i>In-situ</i> -Analysen.....	- 216 -
8	Ausblick	- 222 -
9	Literaturverzeichnis.....	- 224 -
10	Anhang	- 255 -
10.1	Spektroskopische Begriffsdefinitionen.....	- 255 -
10.2	Ortsaufgelöste 3D-Messverfahren	- 258 -
10.2.1	Holographische Mikroskopie	- 258 -
10.2.2	Optische Kohärenztomographie.....	- 260 -
10.3	Curriculum vitae	- 262 -
10.4	Veröffentlichungen.....	- 263 -

Kurzfassung

Mikroalgen und Cyanobakterien können in biotechnologischen Anwendungen zur Produktion diverser Metabolite genutzt werden. Um Kulturen von Algen oder Cyanobakterien in Echtzeit zu untersuchen bieten sich dabei spektroskopische Messmethoden an, da diese eine Datenaufnahme und -analyse in kurzer Zeit ermöglichen.

Verschiedene AutorInnen berichten vom Einsatz diverser spektroskopischer Messtechniken und Versuchsaufbauten zur Identifikation von Algenspezies, zur Bestimmung von deren Nährstoffstatus, zur Detektion bzw. Quantifizierung von einzelnen Metaboliten oder anderen Fragestellungen. Die meisten Ansätze waren dabei jedoch meist qualitativer statt quantitativer Natur und zudem destruktiv, da Proben von zu untersuchenden Kulturen entnommen (und teils weiter aufbereitet) wurden. Messungen in laufenden Kultivierungen fanden nur in Ausnahmefällen statt.

In dieser Arbeit sollten quantitative optische *In-situ*-Messungen in Bioreaktoren durchgeführt werden ohne laufende Kultivierungsprozesse zu stören.

Dazu wurde ein Einwegreaktorsystem genutzt, dessen Eignung zur Anzucht photoautotropher Mikroorganismen in diversen Versuchen evaluiert wurde. Dabei wurden maximal vital haltbare Kulturdichten ermittelt, die teilweise über jenen von Erlenmeyerkolben lagen, welche als Referenzsystem genutzt wurden. Es zeigte sich, dass vor allem die selektive Gasdurchlässigkeit des Reaktorverschlussmaterials für den Kulturerfolg relevant ist.

Anhand unterschiedlich kultivierter Suspensionen des Cyanobakteriums *Nostoc muscorum* wurden optische Messungen intrazellulär akkumulierter Gehalte des Polymers Poly-3-Hydroxybutyrat (PHB) durchgeführt. Durch verschiedene (Nährstoffmangel-) Medien konnte eine große Spannbreite an PHB-haltigen Proben erzeugt werden. Die minimalen PHB-Gehalte lagen bei ca. 4 % des Trockengewichts und ließen sich durch die simultane Applikation von Stickstoffmangel und Glucose- & Natriumacetatzugabe auf knapp 22 % des Trockengewichts steigern. Die im Kulturverlauf erreichten Trockengewichte der Kulturen deckten einen weiten Bereich von 16 bis 1500 mg · l⁻¹ ab.

Als optische Analysen wurden Zelldichtebestimmungen im Infrarotbereich, breitbandige Extinktionsmessungen im sichtbaren (VIS) sowie nah-infraroten (NIR) Spektralbereich und Raman spektroskopische Messungen durchgeführt. Für VIS- und NIR-

Spektroskopie erfolgten zudem polarisationssensitive Messungen. Die Spektraldaten welche mittels verschiedener Messtechniken und Versuchsaufbauten gemessen wurden, wurden Partial least squares (PLS) Regressionen unterzogen und die Vorhersagefehler (root mean square error of prediction, RMSEP) der PLS-Modelle miteinander verglichen.

Hierbei zeigten Messungen an Proben einer Versuchsreihe im nah-infraroten Spektralbereich die schlechtesten Vorhersagegenauigkeiten von PHB-Konzentrationen in der Kultursuspension mit einem RMSEP von $5,01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Die Nutzung von Messdaten derselben Proben aus dem sichtbaren Spektralbereich führte zu einem RMSEP von $3,75 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Bei Messungen an Proben einer anderen Versuchsreihe wurde nach Veränderungen im Versuchsaufbau für den NIR-Bereich ein mittlerer Fehler von $3,57 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ bestimmt. Am geringsten war der Vorhersagefehler bei der Verwendung von Raman-Spektren als Datengrundlage, hier wurde ein RMSEP von $2,85 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ erreicht. Die Nutzung polarisationssensitiver Techniken führte hingegen jeweils zu Verschlechterungen der chemometrischen PHB-Vorhersagemodelle.

Bei Extinktionsmessungen im sichtbaren Spektralbereich war lediglich eine indirekte PHB-Quantifizierung anhand von differierenden Gesamtpigmentierungen der Kulturen möglich. Es wurden Veränderungen der Spektren in den Bereichen um 680, um 560 bzw. 630 sowie unterhalb von 550 nm gefunden. Diese koinzidieren mit Hauptabsorptionsbanden von Chlorophyll, Phycobillinen und Carotinoiden, deren intrazelluläre Gehalte sich unter Stressbedingungen verändern können.

Im nah-infraroten Spektralbereich zeigten sich Extinktionssignale zwischen 1140 und 1170 sowie bei ca. 1190 nm die für eine direkte Quantifizierung von PHB nutzbar waren. Diese koinzidieren mit Absorptionsbanden der Obertonschwingungen von Carbonylgruppen bzw. Streckschwingungen zweiter Ordnung von Methylgruppen, welche in PHB-Molekülen bzw. Polymeren vorhanden sind.

Messungen von Circular dichroismen mittels polarisationssensitiver Versuchsaufbauten brachten keine Verbesserungen in der chemometrischen PHB-Vorhersage, was vor allem durch die extrem geringen Intensitäten der Extinktionsdifferenzen von links- und rechtsdrehend zirkular polarisierter Messstrahlung bedingt gewesen ist.

Mittels Raman-Messungen war eine indirekte PHB-Quantifizierung vor allem anhand breiter Raman-Banden bei ca. 1160 und 1523 cm^{-1} möglich. Diese waren vermutlich

auf Raman-Signale resonant angeregter Carotinoide zurückzuführen. Qualitative und quantitative Veränderungen intrazellulärer Carotinoidpools schienen eng mit intrazellulären PHB-Gehalten korreliert zu sein.

Bei NIR-spektroskopischen Messungen waren hohe Absorptionsintensitäten der wässrigen Kulturmedien oberhalb von 1150 nm störend in der PHB-Quantifizierung, VIS- und vor allem Raman-spektroskopische Messungen hingegen wurden kaum durch die Medien beeinflusst.

Insgesamt wurde gezeigt, dass im entwickelten Reaktor die Kultur photoautotropher Organismen möglich ist und verschiedene optische Analysetechniken für einen *In-situ*-Einsatz am geschlossenen System adaptierbar sind. Hierbei wurden deutliche Unterschiede in deren Eignung zur PHB-Quantifizierung gefunden und mögliche Optimierungen der Messsysteme sowie der Einsatz weiterer Messtechniken erörtert.

Schlagworte:

Cyanobakterien, geschlossener Photobioreaktor, Spektroskopie, *in situ*, *Nostoc muscorum*, Polyhydroxybutyrat (PHB), Raman, Partial least squares Regression (PLS), Quantifizierung

Abstract

Microalgae and cyanobacteria can be used in biotechnological for the production of diverse metabolites. For the real time monitoring of cultures spectroscopic methods allow for data acquisition and analysis within short time.

Different authors report on the use of diverse spectroscopic techniques and experimental setups for the identification of algae species, for the determination of their nutrient status, for the detection and/or quantification of single metabolites or for other objectives. Most of the approaches nevertheless were rather of qualitative than of quantitative nature and also destructive in the sense that separate samples of the cultures under evaluation were taken (and partly further processed). Measurements inside of running cultivations were only performed exceptionally.

It was the aim of this work to perform quantitative optical *in-situ*-measurements inside photobioreactors without disturbing running cultivation processes.

For this single use bioreactors were used whose suitability for the cultivation of photoautotrophic microorganisms was evaluated in diverse experiments. Maximum stable densities of vital cultures partly higher than those of Erlenmeyer flasks which were used as reference system were achieved. It was found that especially the selective gas permeability of the reactor sealing materials is relevant for successful culturing.

Using differently cultivated suspensions of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* optical measurements of intracellular accumulated levels of the polymer poly-3-hydroxybutyrate (PHB) were performed. Through the use of different (nutrient depleted) media a wide range of PHB-containing samples was created. Minimum PHB-contents were at 4 % of cell dry matter and were enhanced up to 22 % of cell dry matter by simultaneous depletion of nitrogen and addition of glucose acetate and sodium acetate. Dry matter yields achieved during cultivations covered a range from 16 to 1500 mg · l⁻¹.

In terms of optical analysis cell density determinations in the near infrared spectral region, broadband extinction measurements in the visible (VIS) and near infrared (NIR) spectral range as well as Raman spectroscopic measurements were performed. For VIS and NIR spectroscopy additional polarization sensitive measurements were done. All spectral data acquired by different methods were used for partial least squares (PLS)

regression modeling and model prediction errors (root mean square error of prediction, RMSEP) of different models were compared.

Measurements of samples from one experiment in the near infrared spectral range showed less accurate prediction abilities of PHB concentrations giving an RMSEP of $5,01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Using VIS spectral data of the same samples led to an RMSEP of $3,75 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Measurements on samples of another experiment in the NIR range which were done after modifications in the experimental setup gave an RMSEP of $3,57 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. The smallest prediction errors were found in models built upon Raman spectroscopic data where an RMSEP of $2,85 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ was obtained. The use of polarization sensitive spectroscopic techniques generally led to deteriorations in chemometric PHB prediction models.

Using extinction spectroscopic measurements in the visible spectral range only an indirect quantification of PHB through differing total pigment absorbance from cultures was possible. Spectral differences in the regions of 680, 560 and 630 as well as below 550 nm were found. These coincide with the main absorption bands of chlorophylls, phycobillines, and carotenoids, whose intracellular contents can vary under stress conditions.

In the near infrared spectral range extinction signals between 1140 and 1170 as well as at ca. 1190 nm were detected which were exploitable for a direct quantification of PHB. These coincide with absorption bands from overtone vibrations of carbonyl groups and second order stretching vibrations of methyl groups, which both are present in PHB molecules and polymers.

The acquisition of circular dichroisms through polarization sensitive spectral setups gave no improvements in chemometric PHB predictions, which was mainly attributable to the weak intensities of extinction differences between left and right handed circularly polarized measuring irradiance.

By Raman spectroscopic measurements an indirect quantification of PHB mainly based on broad Raman bands at ca. 1160 and 1523 cm^{-1} was possible. These were most probably attributable to Raman signals of resonantly excited carotenoids. Quantitative and qualitative changes in intracellular carotenoid pools seemed to be closely correlated to intracellular PHB levels.

For NIR spectroscopic measurements high absorption intensities of aqueous culture media above 1150 nm distorted the PHB quantification while VIS and Raman spectroscopic measurements were hardly affected by culture media.

Overall it has been demonstrated, that in the developed bioreactor culturing of photoautotrophic organisms is possible and that different optic analytical techniques are adaptable for *in-situ*-operation at the reactor. Hereby clear differences in their suitability for PHB quantification were found and possible optimizations of experimental setups as well as the usage of other measuring techniques are discussed.

Keywords:

Cyanobacteria, closed photobioreactor, spectroscopy, *in situ*, *Nostoc muscorum*, polyhydroxybutyrate (PHB), Raman, partial least squares regression (PLS), quantification

Abkürzungsverzeichnis

l	Liter
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
g	Gramm
mg	Milligramm
μmol	Mikromol
% w/w	Gewichtsprozent
% v/v	Volumenprozent
ppm	(Eng.) Parts per million; Millionstel
t	Zeit
pH	(Lat.) <i>potentia hydrogenii</i> ; Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
N ₂	Stickstoff
O ₂	Sauerstoff
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
PBR	Photobioreaktor
LDPE	(Eng.) low density polyethylene; Polyethylen geringer Dichte
LLDPE	(Eng.) linear low density polyethylene; Lineares Polyethylen geringer Dichte
HDPE	(Eng.) high density polyethylene; Polyethylen hoher Dichte
PET	Polyethylenterephthalat
PP	Polypropylen
PHA	Polyhydroxyalkanoat(e)
PHB	Polyhydroxybutyrat / Polyhydroxybuttersäure
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym-A
GMS	Glycerolmonostearat
λ	Wellenlänge
nm	Nanometer
UV	Ultravioletter Spektralbereich
VIS	Sichtbarer Spektralbereich

NIR	Nah-infraroter Spektralbereich
MIR	Mittlerer infraroter Spektralbereich
IR	Infraroter Spektralbereich
LD	Lineardichroismus
CD	Circulardichroismus
VCD	Vibrationscirculardichroismus
LED	(Eng.) Light emitting diode; Leuchtdiode
R^2	Bestimmtheitsmaß (eines Regressionsmodells)
RMSE	(Eng.) Root mean square error; Mittlerer absoluter Fehler (eines Regressionsmodells)
RMSEC	(Eng.) RMSE of calibration; Mittlerer Kalibrierfehler (eines Regressionsmodells)
RMSEP	(Eng.) RMSE of prediction; Mittlerer Vorhersagefehler (eines Regressionsmodells)
RMSECV	(Eng.) RMSE of cross validation; Mittlerer Kreuzvalidierungsfehler (eines Regressionsmodells)
PCA	(Eng.) Principal component analysis; Hauptkomponentenanalyse
PLS	(Eng.) Partial least squares (regression); partielle kleinste Fehlerquadrate (Regression)
SNV	(Eng.) Standard normal variate; Streulichtkorrekturverfahren
MSC	(Eng.) Multiplicative scatter correction; Streulichtkorrekturverfahren

1 Einleitung

Bei der Arbeit mit aquatischen Mikroorganismen fällt auf, dass es einen großen zahlenmäßigen Unterschied zwischen existenten und gut erforschten Organismen gibt, zwischen potenziellen biotechnologischen Anwendungen und tatsächlich existenten Prozessen, zwischen Grundlagenforschung und Anwendung. Von geschätzten 8.000 Spezies, die es an Cyanobakterien gibt, sind weniger als zehn in bestehenden Produktionsprozessen etabliert. Somit gibt es eine Fülle an ungenutzten physiologischen und biochemischen Potenzialen dieser Organismen, welche auf ihre Erforschung warten.

Zur detaillierten Charakterisierung potenziell nutzbarer Organismen aus der Gesamtheit der existenten Organismen ist es zunächst notwendig, die Anzahl von detailliert zu untersuchenden Spezies auf einen überschaubaren und versuchstechnisch handhabbaren Umfang zu reduzieren. Je nachdem, was das gewünschte Produkt bzw. der Produktionsprozess als Ziel hat, kann die Auswahl aufgrund verschiedenster Parameter geschehen. Entscheidend hierbei ist jedoch, dass die zur Auswahl genutzten Parameter im großen Maßstab gemessen bzw. überwacht werden können, um keine möglichen Produktions-Kandidaten bei großangelegten Screening-Versuchen zu übersehen. Traditionelle chemische Analysen können hierbei jedoch zu hohen Kosten und erheblichem Material- und Zeitaufwand führen, weshalb es wünschenswert ist Alternativen zu schaffen, welche bei der Suche nach Kandidaten schnell und zuverlässig belastbare Einteilungsergebnisse liefern.

Optische Analysemethoden wie beispielsweise verschiedene Techniken der Spektroskopie sind für diese Aufgabe gut geeignet, da sie in der Regel schnell durchführbar sind und im besten Fall nur geringen apparativen und arbeitstechnischen Aufwand erfordern. Allerdings ist es notwendig, vor Beginn der Tests eine Methodik auszuwählen, welche auf die zu untersuchende Stoffklasse optimal passt. Zudem müssen die optischen Eigenschaften der zu untersuchenden Organismen, sowie weitere, möglicherweise die Messungen beeinflussende Faktoren berücksichtigt werden. Hat man sich für einen Spektralbereich, eine Methodik und einen Versuchsaufbau entschieden, müssen die nachfolgenden Messungen reproduzierbar durchführbar sein. Auch nachfolgende Verarbeitungsschritte der gewonnenen Spektraldaten können große Auswir-

kungen auf die Qualität und praktische Anwendbarkeit bzw. Nutzung von spektroskopischen Methoden haben und bei unsachgemäßer Anwendung saubere Messergebnisse entwerfen.

Um alle diese Faktoren bei der Auswahl von Analysemethoden für die Anwendung bei der Untersuchung aquatischer Mikroorganismen zu berücksichtigen und ihre Einflüsse auch quantitativ einschätzen zu können, sollen in dieser Arbeit verschiedene Methoden qualitativ und quantitativ verglichen werden. Hierdurch soll AnwenderInnen¹ eine Unterstützung bei der Auswahl und Anwendung der für ihre Fragestellung optimalen Methodik gegeben werden.

¹ Zur besseren Lesbarkeit des Textes wird in dieser Arbeit nicht stets genderneutral formuliert, intentionell schließen die gewählten Begriffe jedoch alle möglichen Geschlechterformen mit ein.

2 Stand des Wissens

Zur Herausarbeitung der für diese Arbeit entscheidenden Lücken in der bestehenden Fachliteratur, soll zunächst ein Überblick über bereits existente Bioreaktorsysteme gegeben und die spezifischen Anforderungen im Bereich von Screening-Anwendungen aufgezeigt werden. Da die Systemvalidierung mittels Kulturen von photoautotrophen Mikroorganismen vorgenommen wurde, sollen diese Organismen und ihre potenziellen Anwendungen nachfolgend betrachtet werden. Abschließend und schwerpunktmäßig wird in diesem Kapitel der Stand der Forschung und Anwendung optischer Analysetechniken erörtert.

2.1 Einwegreaktoren, Biopolymere und phototrophe Mikroorganismen

2.1.1 Einweg-Photobioreaktoren

Für die Anzucht von Mikroalgen gibt es verschiedene technische Ansätze, welche jeweils eigene Vor- und Nachteile besitzen. Generell muss zwischen offenen Systemen, wie beispielsweise der Anzucht in offenen Raceway-Ponds und geschlossenen Systemen unterschieden werden. In geschlossenen Systemen ist eine bessere Prozesssteuerung möglich, da diverse Einflussfaktoren (z.B. Temperatur, pH-Wert, Durchmischung, etc.) gezielt gesteuert werden können (Pulz & Scheibenbogen, 1998, S. 135 f.). Für eine umfassende Übersicht über existente Reaktorgeometrien inklusive der jeweils inhärenten Vor- und Nachteile sei auf Borowitzka (1999) verwiesen. Eine weitere Zusammenfassung verschiedener Reaktortypen mit sehr anschaulichen Darstellungen gibt Posten (2009).

Die in den oben genannten Quellen beschriebenen Reaktortypen sind vor allem solche, welche für die Produktion von Biomasse oder Inhaltsstoffen genutzt werden können. Kleine Systeme mit einem Volumen von 50 bis 100 ml werden hierbei etwas vernachlässigt. Bei der Untersuchung bisher nicht charakterisierter Algenarten bzw. in der Prozessentwicklung sind jedoch oftmals Experimente nötig, in denen hohe Probendurchsätze erzielt werden sollen um verschiedene Einflussfaktoren (Temperatur, Zusammensetzung des Anzuchtmediums, etc.) in überschaubarer Zeit untersuchen zu können. Deshalb soll im Folgenden ein Überblick über Anzuchtssysteme mit einem Kultur-

volumen von maximal 100 ml gegeben werden, wobei Einweglösungen besonders im Fokus stehen.

2.1.1.1 Systemübersicht

Generell ist zu konstatieren, dass es wenige kommerziell verfügbare Einweg-Photobioreaktoren für das Screening von Mikroalgen gibt (Pacheco *et al.*, 2013). Auch gilt (analog zu biopharmazeutischen Einsatzbereichen), dass diese Systeme wenig standardisiert sowie offizielle Qualitätstests wenig etabliert sind, so dass eine direkte Vergleichbarkeit ihrer kulturtechnischen Eigenschaften schwierig ist (Lopes, 2015).

Kommerzielle Screeningsysteme wie beispielsweise der **PBR101™** der Firma Phenometrics (www.phenometricsinc.com) oder der **Multi-Cultivator MC 1000** der Firma Photon Systems Instruments (www.psi.cz) sind zumeist modular aufgebaut, jedoch zumeist auf Basis von mehrfach verwendbaren Materialien. Zwar gibt es verschiedene Einweg-Systeme, welche bereits routinemäßig für die Kultur von Algen (z.B. von Hahne *et al.*, 2014) oder Untersuchungen an Cyanobakterien (Cirés *et al.*, 2015) eingesetzt werden, diese sind jedoch zu groß (GE Healthcare Life Sciences beispielsweise vertreibt von seinem Cellbag®-System lediglich Ausführungen, mit einem Mindest-Beutelvolumen von 500 ml) und vor allem zu kostenintensiv (ein Exemplar der genannten 500 ml Beutel kostet über 500 € pro Stück) um einen großflächigen Einsatz als Screeningsystem zu ermöglichen. Deshalb werden im Folgenden lediglich Systeme mit einem Volumen bis maximal 100 ml aufgeführt, welche kostengünstig und in großen Stückzahlen verfügbar sind.

Als „das“ Standardsystem für Anzucht- und weitere Versuche ist sicherlich die Verwendung von **Erlenmeyerkolben** zu sehen (beispielsweise von Jia *et al.*, 2014), welche in der Regel auf Orbitalschüttlern gelagert werden, um eine gute Durchmischung der Kulturen zu gewährleisten. Ursprünglich aus Glas gefertigt, gibt es hiervon inzwischen auch Versionen aus diversen Polymeren. Die Möglichkeiten, direkt in Erlenmeyerkolben Messungen (Kulturdichte, pH, etc.) durchzuführen, sind jedoch sehr begrenzt und erfordern entweder invasive Verfahren (z.B. pH-Tauchelektroden) oder eine Entnahme von Probenaliquots, welche offline weitergehend untersucht werden können. In den letzten Jahren wurden deshalb verschiedenste Photobioreaktor-Systeme auf der Basis von Einwegmaterialien entwickelt, wobei diese Lösungen jedoch systeminhärente Vor-

und Nachteile aufweisen, welche je nach Anforderung gegeneinander abgewogen werden müssen.

Als den klassischen Erlenmeyerkolben ähnlich anzusehen, sind vor allem Kulturgefäße, welche mit mehr als 20 ml Füllvolumen betrieben werden. Diese sind in der Praxis meistens aus Anwendungen der Zellkultur übernommen, wobei es sich oftmals um geschlossene Flaschen aus Polystyrol handelt, welche durch Filterkappen verschlossen werden können und einen konstanten Gasaustausch ermöglichen. Bae *et al.* (2013) beispielsweise, verwendeten dieses System lediglich für kurze Kulturdauern von bis zu 7 Tagen.

Die Verwendung von Falcon-Röhrchen als Kulturgefäß, wie beispielsweise in den **TubeSpin®-Reaktoren** der Firma TPP Techno Plastic Products AG umgesetzt, ist eine weitere Möglichkeit, Anzuchten in Einweggefäßen durchzuführen. Diese Röhrchen gibt es in diversen Größen und auch sie lassen sich auf Orbitalschüttlern lagern. Durch den seriemäßig vorhandenen Schraubverschluss, ist kein Gaswechsel möglich, so dass Membranmaterialien oder andere Lösungen verwendet werden können, um einen besseren Gasaustausch zu ermöglichen bzw. (wie im Fall des TubeSpin®-Systems mit septierten Deckeln) sterile Probennahmen zu ermöglichen. Eine Möglichkeit, die Verwendung solcher Gefäße auszuweiten, bestünde in einer aktiven Begasung, so wie sie beispielsweise in Multi-Cultivator MC 1000 Reaktoren realisiert ist. Generell ist dieser Gefäßtyp jedoch eher für die (mittelfristige) Lagerung von Kulturen zu verwenden als für effiziente Anzuchten mit hohen Wachstumsraten.

Die Miniaturisierung von **Rührreaktoren** hingegen ist ein Ansatz, um Screeningversuche unter produktionsnahen Bedingungen durchführen zu können. So bieten Systeme wie das von Kostov *et al.* (2001) beschriebene eine gute Möglichkeit zur Hochskalierung von Messergebnissen auf größere Volumina, da durch die Rührer-induzierte gute Durchmischung der Kultursuspension hohe Gastransferraten erzielt werden können. Die Autoren konnten durch entsprechend gewählte Rührgeschwindigkeiten Bedingungen aus einem 1-l-Rührreaktor erfolgreich auf ein Volumen von ca. 2,5 ml runterskalieren. Zudem bietet das beschriebene System die Möglichkeit, berührungslos Kulturdichten über deren optische Dichte zu erfassen. Mittels im Innenraum angebrachter Sensorpunkte, welche über ein System aus Leucht- und Photodioden ausgelesen werden können, können pH-Wert und Gelöstsauerstoff zusätzlich *in situ* bestimmt werden. Das

System ist (auch aufgrund der Tatsache, dass es vornehmlich aus kostengünstigen Einwegmaterialien gefertigt ist) als potenziell tauglich für Hochdurchsatz-Screenings anzusehen. Nachteilig sind die geringen kultivierbaren Volumina, welche probenintensive nachfolgende Analysen unmöglich machen. Ein weiterer Miniatur-Rührreaktor wurde von Lamping *et al.* (2003) entwickelt. Auch dieser Reaktor erlaubt bei hohen Gastransferraten und Kulturvolumina von 6 ml eine hochskalierbare Prozessführung. Die verwendeten Materialien (dickwandiges Plexiglas) und der Aufbau des Systems (u.a. fest verbaute Sensoren für Kulturdichten, pH-Wert, etc.) sind in diesem System jedoch limitierend für eine Anwendung in großer Stückzahl. Weitere Systeme wurden u.a. von Puskeiler *et al.* (2005), Harms *et al.* (2006) oder Zhang *et al.* (2006) beschrieben und bieten durch ihre vielfältigen erfassbaren Kulturparameter (Dichte, pH, etc.) einiges Potenzial als Screening-Systeme. Den drei genannten Reaktoren ist jedoch gemein, dass sie mit Kulturvolumina von 5 ml, 2 ml respektive 150 µl in sehr geringem Größenmaßstab betrieben werden und somit die Biomassemengen kaum ausreichen um weitergehende Probenanalysen durchzuführen. Auch sind die meisten der genannten Systeme für die Anzucht von bakteriellen Kulturen entwickelt worden, so dass Informationen zur Möglichkeit der Lichtversorgung innerhalb der Systeme zumeist fehlen, ein Faktor der für Screeningversuche an phototrophen Organismen essentiell ist.

Als weiteres System sei die Verwendung von **Mikrotiterplatten** als Mini-Reaktoren erwähnt. Durch ihren sehr geringen Platzbedarf, sowie der Möglichkeit bis zu 384 oder mehr Proben auf einer Platte zu kultivieren (zumindest theoretisch, praktisch sind die möglichen Probenzahlen durch auftretende Randeffekte an den äußeren Proben, welche die Versuchsergebnisse stark verfälschen können, meist um ein Viertel oder mehr reduziert), sind sie hervorragend für Hochdurchsatz-Screenings geeignet. Vorteilhaft sind zudem diverse Möglichkeiten um Kulturdichten, spektrale Eigenschaften oder andere Signale direkt im Gefäß (*in situ*) zu messen. Nachteilig ist jedoch, dass gerade bei Platten, die sehr hohe Probenanzahlen ermöglichen, die Kulturbedingungen durch die geringen Flüssigkeitsmengen stark verfälscht werden und somit Versuchsergebnisse, welche in Platten erzielt wurden, kaum auf großvolumigere Systeme übertragbar sind. Neben Platten mit z.B. 96 Probenvertiefungen (Pacheco *et al.*, 2013), werden oftmals solche genutzt, welche zwar weniger Einzelproben pro Platte, jedoch größere Volumina je einzelner Probe ermöglichen. So werden Platten mit 48 (z.B. Liu *et al.*, 2013), 24

(Van Wagenen *et al.*, 2014) oder 12 (Abdelaziz *et al.*, 2014) Vertiefungen genutzt. Auch Ansätze für eine kontinuierliche, diffusive Bereitstellung von Anzuchtmedium und dadurch bedingte Arbeitersparnis im Handling wurden publiziert (Nowack *et al.*, 2005). In Kombination mit separaten Lichtquellen für jede einzelne Probenvertiefung, wie z.B. bei Mertiri *et al.* (2011) bzw. Chen *et al.* (2012) oder Graham *et al.* (2015), sowie Einrichtungen für verbesserte CO₂-Versorgung der Kulturen, wie z.B. durch die bei Liu *et al.* (2013) verwendeten GasPak™-Beutel der Firma Becton, Dickinson & Co. lassen sich Mikrotiterplatten in der Tat als Mini-Bioreaktoren ansehen. Auch die Verwendung von Pipettierrobotern (Radzun *et al.*, 2015) bei der Beladung von Mikrotiterplatten sowie deren Einbindung in Systeme, wie beispielsweise den **BioLector**® der Firma m2p-labs GmbH (Anwendungen sind z.B. von Kensy *et al.* (2009a, 2009b) beschrieben), welcher es mittels optischer Messtechniken ermöglicht, Messungen von Kulturdichten, Sauerstoffkonzentrationen und Fluoreszenzsignalen während laufender Kultivierungen berührungslos und in Echtzeit aufzunehmen, ist ein weiterer Schritt zur Nutzung von solchen Platten als überwachte System mit der Möglichkeit zur automatisierten und gezielten Prozesssteuerung.

Ein großer Kritikpunkt bei der Durchführung von Screenings in Standard-Mikrotiterplatten, ist die zumeist unzureichende Gasversorgung der Proben, welche eine Skalierbarkeit der Versuchsergebnisse auf größere Fermentervolumina oftmals unmöglich macht (Wenk *et al.*, 2012). Als Lösung wurden deshalb Mikrotiterplatten entwickelt, welche durch eingearbeitete Schikanen, welche für turbulente Flüssigkeitsströme sorgen, einen stark erhöhten Gasaustausch ermöglichen. Diese Platten, deren positive Eigenschaften von Funke *et al.* (2009) ausführlich untersucht wurden und die als **FlowerPlates**® kommerziell von der Firma m2p-labs GmbH vertrieben werden, sind ein weiterer Schritt um Mikrotiterplatten tatsächlich als vollwertiges Screeningsystem nutzen zu können. Letztlich sind hohe Gasaustausch- bzw generell Massentransfer-Raten jedoch vor allem bei kleinen Füllvolumina möglich, welche online-Analysen direkt in Mikrotiterplatten und vor allem nachgeschaltete offline-Analysen oftmals unmöglich machen (Kensy *et al.*, 2009a).

Mikrofluidische Systeme verstärken diese Problematik noch einmal. So berichten Shih *et al.* (2014) von einem System, welches auf Tropfen-Basis arbeitet, kostengünstig ist und auf minimalem Platz eine parallele Kultur von Algen, sowie eine Überwachung von

Kulturdichten und Fluoreszenzsignalen ermöglicht. Da dieses System fast gänzlich ohne mechanische Teile und (außer der anfänglichen Zugabe von je einem Tropfen Algen-suspension sowie Fluoreszenzfarbstoff) manuelle Arbeitsschritte auskommt, stellt es prinzipiell einen hervorragenden Ansatz für Hochdurchsatz-Screenings dar. Jedoch sind die verwendeten Kulturvolumina mit 120 µl sehr gering und starken Verdunstungseinflüssen ausgesetzt. Die von den Autoren beschriebene Kulturdauer von 24 Stunden ist dabei extrem gering und für umfassendere Screeningversuche, in denen man verschiedene Wachstumsphasen (z.B. exponentielle Phase sowie stationäre Phase) einer gleichen Kultur untersuchen will, unzureichend. Von möglichen Kulturdauern bis 68 Stunden berichten Luke *et al.* (2016), was zumindest ansatzweise die Untersuchung der Entwicklung von Zellgruppen über wenige Generationen ermöglicht. Ähnliche Systeme, beispielsweise das von Au *et al.* (2011) sowie das von Bae *et al.* (2013) beschriebene, haben dabei durchaus die Fähigkeit, Resultate, welche in größerem Maßstab (200 ml Zellkulturflaschen) erzielt wurden, zu reproduzieren. Durch den in letztgenannter Veröffentlichung realisierten konstanten Flüssigkeitsstrom des Mediums um fixierte Zellen, lassen sich zudem dieselben Zellen in verschiedenen Kulturzuständen untersuchen, wobei in der genannten Arbeit lediglich Kulturparameter auf Fluoreszenzbasis bestimmt wurden. Für eine Übersicht über weitere mikrofluidische Systeme sei auf Han *et al.* (2013) verwiesen.

Das von Menke *et al.* (2012) entwickelte Reaktorsystem, bestehend aus **Einweg-Polymeren**, welche in der Verpackungsindustrie eingesetzt werden, ist ein Ansatz, welcher nicht nur kostengünstig ist und einen hohen Probendurchsatz ermöglicht, sondern gleichzeitig die Kultivierung von Volumina bis 100 ml je Einzelprobe ermöglicht. Zudem ist die Möglichkeit gegeben, Kulturdichten sowie weitere Parameter mittels diverser Spektroskopietechniken *in situ* zu bestimmen, was eine kontinuierliche Prozessüberwachung ermöglicht. Als nachteilig wurde von den Autoren jedoch bewertet, dass die Anzucht von fragilen bzw. motilen Algenarten in ihrem System, aufgrund des durch die Begasung auftretenden Stresses, problematisch sind. Die von den Autoren ergänzend genutzte Version eines Wippenreaktors, basierend auf denselben Einwegmatten, ist auch für fragile Spezies geeignet, jedoch kann hierbei durch die gasdicht geschlossenen Probenkompartimente eine CO₂-Mangelversorgung auftreten. Der beschriebene Einsatz von Kohlenstoffquellen im Medium, welcher als Lösung präsentiert

wird, ist jedoch gerade bei unbekanntem Organismen problematisch, da Kenntnisse über deren Metabolismus (und vor allem die Fähigkeit evtl. zugegebene Kohlenstoffquellen zu verwerten) nicht zwingend gegeben sind.

In der folgenden Tabelle 2.1 sind die grundlegenden Eigenschaften verschiedener Reaktortypen zusammengefasst:

Tabelle 2.1: Gegenüberstellung ausgewählter Eigenschaften verschiedener Bioreaktortypen. Die Daten sind aus Menke (2012) sowie Kumar *et al.*, (2004) entnommen

System	Erlenmeyerkolben	Mini-Rührreaktoren	Bioreaktormatten	Mikrotiterplatten	Mikrofluidische Systeme
Volumen	25-500 ml	2,5 - 500 ml	50 ml	< 1 - 12 ml	< 100 µl
Einwegtauglichkeit	ja	ja	ja	ja	ja
Platzbedarf	hoch	sehr hoch	gering	sehr gering	extrem gering
Kultivierungsdauer	bis ca. 30 Tage	30 Tage und länger	bis ca. 14 Tage	wenige Tage	wenige Stunden bis Tage
Gasaustausch	gut	sehr gut	sehr gut	sehr gering	extrem gering
Algenwachstum	befriedigend	sehr gut	gut	schlecht	schlecht
Kosten	gering	sehr hoch	sehr gering	sehr gering	k. A. ¹
Prozesssteuerungsmöglichkeit	Nur ausgewählte Parameter ²	Viele Parameter	Nur ausgewählte Parameter	Nur ausgewählte Parameter	Nur ausgewählte Parameter

¹ Eine Angabe von Kosten ist schwierig, da sich diese Reaktortypen zumeist in frühen Entwicklungsstadien befinden. Durch optimierte Verfahren zur massenhaften Systemproduktion sollten jedoch extrem niedrige Kosten je Probe möglich sein.

² Welche Parameter hierbei genau gesteuert werden können (z.B. Temperatur, Beleuchtungsdauern und -Intensitäten, Gasversorgung etc.) hängt stark vom verwendeten System ab, jedoch ist eine vollumfängliche Kontrolle i.d.R. nicht möglich.

Wie gezeigt, sind zwar Hochdurchsatz-Lösungen erhältlich, jedoch operieren diese meist im sehr kleinen Maßstab, was nachfolgende Analysen erschwert bis unmöglich macht und bieten wenig Möglichkeiten, im Kulturverlauf Informationen über den aktuellen Kulturzustand zu erhalten. Den meisten Systemen ist dabei gemein, dass sie aus kostengünstigen Materialien gefertigt werden, weshalb im Folgenden eine kurze Übersicht über die Eigenschaften kommerziell verfügbarer Polymere gegeben wird.

2.1.1.2 Polymermaterialien

Aufgrund der spezifischen Anforderungen in verschiedenen Anwendungsbereichen, gibt es eine Vielzahl an existenten Polymeren und Polymerverbindungen, welche sich stark in ihren Materialeigenschaften bezüglich der Permeationsfähigkeit für verschiedene Gase unterscheiden. Abbildung 2.1 gibt eine Übersicht über ausgewählte Permeabilitätseigenschaften verschiedener, im Nahrungsmittel-Verpackungsbereich eingesetzter Polymere.

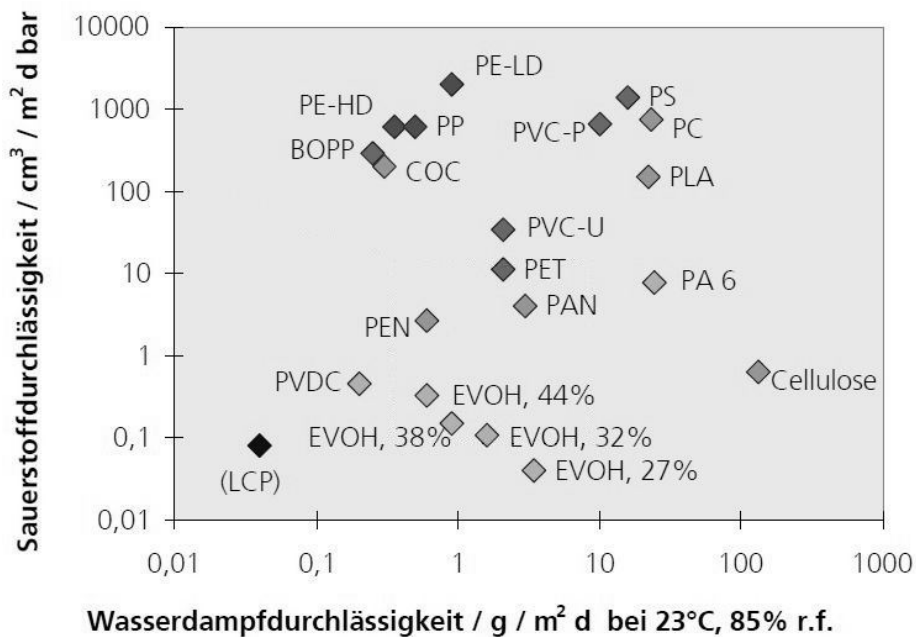


Abbildung 2.1: Übersicht der Permeabilitätseigenschaften verschiedener Polymermaterialien am Beispiel der Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit. (Quelle: Nach Langowski, 2006)

Wie aus Abbildung 2.1 ersichtlich, gibt es mit Polymeren, welche aus Polyethylen geringer Dichte (LDPE) gefertigt sind, Materialien mit hohen Permeabilitäten für Sauerstoff, bei gleichzeitig geringen Durchlässigkeiten für Wasserdampf.

Generell gilt für die Gasdurchlässigkeit von Plastikmaterialien eine Faustformel von 4:1:0,25 bezüglich der relativen Durchlässigkeit für Kohlendioxid, Sauerstoff und Stickstoff (Birus, 2007), jedoch ist dies nur ein Richtwert und neben dem Folienmaterial durch weitere Faktoren (Materialmodifikationen in Verarbeitungsvorgängen, Einsatz funktioneller Beschichtungen, Erstellung von Polymerverbänden) stark variabel. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die Permeationseigenschaften verschiedener Folienmaterialien, wobei Abweichungen von oben genannter Faustformel offensichtlich sind.

Tabelle 2.1: Relative Permeationswerte verschiedener Polymermaterialien (Nach Guisheng *et al.*, 1995)

Material	N ₂	O ₂	CO ₂
Polystyrenfolie	1	2,6	10,4
LDPE Folie	1	3,1	10,7
LLDPE Folie	1	3,1	11,1
HDPE Folie	1	3,2	11,9
Polypropylenfolie	1	4,3	13,6
PET Folie	1	3,6	17,8
Nylon 6 Folie	1	3,4	18,4

(L)LDPE: Linear low density polyethylene, (Lineares) Polyethylen geringer Dichte;

HDPE: High density polyethylene, Polyethylen hoher Dichte; PET: Polyethylenterephthalat

Um die optimalen Materialien für eine bestimmte Anwendung zu finden, sollte somit eine Materialprüfung der einzelnen Polymere im Hinblick auf die im Einsatz benötigten Eigenschaften (wie beispielsweise CO₂-Durchlässigkeit) erfolgen. Von Egbers (2005) durchgeführte Versuche an Kultursystemen für die *In-vitro*-Kultur von Pflanzen legen hierbei nahe, dass Polymere auf Basis von Polyethylen geringer Dichte gute Materialeigenschaften für eine Verwendung als Verschlussfolien zur Herstellung eines geschlossenen Anzucht-systems bieten, da sie hohe Gasaustauschraten ermöglichen. Ebenfalls von Egbers untersuchte mikroporöse Folien oder Gewebe weisen noch höhere Gasdurchlässigkeiten auf, jedoch führen die Mikroperforationen zu stark beschleunigter Verdunstung von Flüssigkeit aus dem Kulturgefäß. Gerade für längere Kultur-dauern in einem geschlossenen System, in dem keine Flüssigkeit ausgleichend zugeführt werden kann, ist dies eine stark nachteilige Materialeigenschaft.

Da im zu entwickelnden Photobioreaktor photoautotrophes Wachstum ermöglicht werden sollte, wurde anhand der aufgeführten Kriterien und Materialeigenschaften in LDPE-Folien ein geeigneter Werkstoff identifiziert, welcher eine hohe Durchlässigkeit für CO₂ und O₂ aufweist. Gleichzeitig ist die Wasserdampfdurchlässigkeit sehr gering, was bei Versuchen mit Mikroalgen, welche in flüssigen Anzuchtmedien kultiviert werden, vorteilhaft ist, da somit Verfälschungen von Versuchsergebnissen bedingt durch starke Verdunstung verhindert werden.

2.1.2 Phototrophe Mikroalgen & Cyanobakterien

Da in dieser Arbeit verschiedene Organismen genutzt wurden, wird an dieser Stelle zunächst ein genereller Überblick über Eigenschaften und Nutzungsmöglichkeiten mariner Mikroorganismen gegeben, bevor das Cyanobakterium *Nostoc muscorum* detaillierter betrachtet wird.

2.1.2.1 Biodiversität & Biotechnologische Nutzung

Da der Ursprung allen Lebens in den Weltmeeren liegt, haben aquatische Organismen einen sehr langen Evolutionsprozess durchlaufen, was zu einer großen Diversität mariner Spezies geführt hat. In einschlägigen Datenbanken (www.algaebase.org, Stand: 2014) sind inzwischen mehr als 2.900 Spezies von Grünalgen aus der Klasse der Chlorophyta gelistet. Zudem sind über 3.800 prokaryotische Organismen aus der Klasse der *Cyanobacteria* bereits taxonomisch erfasst. Auch wenn man große Ungenauigkeiten bei der Prognose tatsächlich existenter Spezies berücksichtigt, so ist anzunehmen, dass die Anzahl noch unentdeckter und unerforschter Arten beträchtlich ist. Zudem gibt es eine starke Diskrepanz zwischen existenten und tatsächlich wirtschaftlich genutzten Spezies. So sind von geschätzten 8.000 Spezies, die es alleine an Cyanobakterien gibt (Guiry, 2012), weniger als zehn in bestehenden Produktionsprozessen etabliert (Priyadarshani & Rath, 2012). Zwar liefern beispielsweise Picardo *et al.* (2013) interessante methodische Ansätze um aus bereits publizierten Daten für definierte Prozesse geeignete Organismen zu identifizieren, jedoch ist diese Meta-Auswahl anhand von physiologischen Parametern nur für gut untersuchte Organismen geeignet und vernachlässigt weniger erforschte Arten beinahe vollkommen. Somit gibt es eine Fülle an ungenutzten physiologischen und biochemischen Potenzialen innerhalb dieser Organismen, welche auf ihre Erforschung warten.

Für eine umfangreiche Übersicht über bereits existente und potenzielle Nutzungsmöglichkeiten photosynthetisch aktiver mariner Mikroorganismen sei auf die Veröffentlichungen von Priyadarshani & Rath (2012) sowie Wijffels *et al.* (2013) verwiesen.

Es sollen jedoch einige Nutzungsmöglichkeiten zumindest grob umrissen werden, um eine Einordnung dieser Arbeit in der marinen Biotechnologie zu erlauben.

So kann einerseits die gesamte, abgesehen von Zentrifugationsprozessen zur Aufkonzentrierung, wenig prozessierte Biomasse zur Energiegewinnung genutzt werden. Dies

kann unter anderem durch Vergärungsprozesse zur Herstellung von Biogas geschehen (Collet *et al.*, 2011), oder durch die Extraktion von Lipiden und deren Umwandlung in Biodiesel (Sawaengsak *et al.*, 2014). Dieser Verwendung stehen jedoch hohe Investitions- und Betriebskosten entgegen, welche eine rein energetische Nutzung der Biomasse wirtschaftlich nicht rentabel machen; eine Tatsache die auch durch die Nutzung von hochpreisigen Beiprodukten wie beispielsweise Omega-3-Fettsäuren nicht komplett eliminiert werden kann (Sawaengsak *et al.*, 2014).

Vielversprechender erscheint die zielgerichtete Gewinnung von hochpreisigen und gleichzeitig in großen Mengen herstellbaren Produkten, um die noch hohen Investitionskosten wirtschaftlich sinnvoll auffangen zu können und dabei die kontinuierliche Weiterentwicklung von Anlagen und Prozessen zu ermöglichen. Dies können beispielsweise in der Medizintechnik anwendbare Biopolymere sein, welche in dieser Arbeit als Zielmetabolit ausgewählt wurde. Die Herstellung solcher Stoffe in marinen Organismen wurde bereits hinlänglich bewiesen, wobei vor allem das Cyanobakterium *Nostoc muscorum* als photoautotropher Polymerproduzent attraktiv erscheint und deshalb im Folgenden noch detaillierter betrachtet werden soll.

2.1.2.2 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris zählt zu den ausführlichst beschriebenen und erforschten phototrophen Organismen. Bereits 1890 von Beyerinck taxonomisch erfasst, hat *Chlorella* seitdem den Status eines Modellorganismus erreicht, an welchem verschiedenste Umwelteinflüsse und Stoffwechselwege detailliert untersucht wurden. Dies ist neben der simplen Organisationsform dieses einzelligen Organismus, bei der eine Zelle beispielsweise nur einen großen Chloroplasten besitzt (Kuchitsu *et al.*, 1987), vor allem auf kulturtechnische Vorteile zurückzuführen. So können durch geeignete Kulturführung komplett synchrone Kulturen hergestellt werden, in denen sich alle einzelnen Zellen in demselben physiologischen Zustand befinden. Diese vor allem von Tamiya *et al.* bereits 1953 entwickelte Methodik erlaubt es, Stoffwechselprozesse auf „Quasi-Einzelzellniveau“ jedoch anhand wesentlich größerer Probenvolumina zu untersuchen. Insbesondere Zellzyklen und ihnen zugrunde liegende Funktionsmechanismen des Photosyntheseapparats konnten so von den Autoren analysiert werden. Vor allem jedoch die Übertragbarkeit vieler Erkenntnisse auf andere photosynthetisch aktive Mik-

roorganismen und sogar höhere Pflanzen als auch die hohe (morphologische und metabolische) Variabilität dieser Spezies unter verschiedenen (Umwelt-) Bedingungen machen sie als Versuchsobjekt so weitverbreitet.

So ist beispielsweise die Zusammensetzung der Primärcarotinoide in *Chlorella* relativ stabil und vergleichbar mit jener von höheren Pflanzen, während Umwelteinflüsse und Zellstatus die differentielle Produktion von Sekundärcarotinoiden (gezielt) beeinflussen können (Gouveia *et al.*, 1996). Auch Vermehrungsraten und die Anzahl entstehender Tochterzellen bei der mitotischen Zellteilung sind in hohem Maße variabel und durch die Anzuchtbedingungen beeinflussbar (Mandalam & Palsson, 1997). Dadurch, dass diese Veränderungen innerhalb kurzer Zeitspannen beobachtbar sind, *Chlorella* (wie bereits erwähnt) den Status eines Modellorganismus besitzt und auch ökonomisch interessant ist, wurde es als Basisorganismus für Wachstumsversuche in dieser Arbeit verwendet. Für weitergehende Informationen zu diesem Organismus sei an dieser Stelle auf den sehr umfangreichen Übersichtsartikel von Safi *et al.* (2014) verwiesen.

2.1.2.3 *Nostoc muscorum*

Nostoc muscorum ist ein photoautotrophes Cyanobakterium, welches vor allem in Böden und Frischwasserhabitaten angesiedelt ist (Allison *et al.*, 1937). Da *Nostoc* zudem eine (je nach Stamm unterschiedlich stark ausgeprägte) Salztoleranz aufweist (Blumwald & Tel-Or, 1982b), sowie auch längere Trockenperioden überdauern kann (Wang *et al.*, 2010), kann es allerdings auch saline Medien und Wüstenregionen besiedeln. Die zusätzliche Fähigkeit, in spezialisierten Zellen, den Heterozysten, atmosphärischen Stickstoff zu fixieren, (Clyde, 1958) macht aus *Nostoc* eines der weitverbreitetsten Cyanobakterien überhaupt.² Hierbei ist die Eigenschaft verschiedener *Nostoc*-Spezies zu nennen, symbiotische Beziehungen mit höheren Pflanzen einzugehen, wobei *Nostoc* hierbei zumeist extrazellulär mit den Pflanzen assoziiert bleibt (Meeks, 1998). Als prokaryotischer Organismus besitzt *Nostoc* weder intrazelluläre Chloroplasten, noch einen Zellkern, Stattdessen findet die Photosynthese an freien Thylakoidmembranen statt, welche sich vor allem in der Nähe der Zellwand organisieren (Blumwald & Tel-Or, 1982a). Die Zellwand besteht aus mehreren Schichten einschließlich der für Cyanobakterien typischen Peptidoglykanschicht und *Nostoc* besitzt die (je

² Nicht umsonst wurde *Nostoc muscorum* von der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie zur Mikrobe des Jahres 2014 gekürt!

nach Kulturbedingungen verschieden stark ausgeprägte) Fähigkeit, Exopolysaccharide zu bilden und abzugeben (Shah *et al.*, 2003), wodurch es zu starken Verklumpungen innerhalb der Kulturen kommen kann. Diese Schleimschichten sind unter anderem an den unterschiedlichen morphologischen Varianten beteiligt, in denen *Nostoc* auftreten kann. Wenngleich zumeist fädiges Wachstum in Form sogenannter Trichome vorherrscht, kann *N. muscorum* unter bestimmten Bedingungen in Form einzelner, agglomerierter Zellen vorliegen (Allison *et al.*, 1937).

Für detailliertere Beschreibungen der Struktur und Morphologie von Cyanobakterien im Allgemeinen und *Nostoc muscorum* im Speziellen sei an dieser Stelle auf Jürgens & Weckesser (1985) und Rippka *et al.* (1979) sowie Allison *et al.* (1937) und Shah *et al.* (2003) verwiesen.

Während die Vermehrung normalerweise durch eine Teilung der Trichome vonstattengeht, aus jener freibewegliche, gleitende Fragmente (die Hormogonien) resultieren, kann auch eine Vermehrung über Einzelzellen (durch wiederholte Zellteilung) sowie über Sporen erfolgen (Allison *et al.*, 1937). Dies führt dazu, dass sich Vermehrungsraten und vorherrschende Zellmorphologien innerhalb einzelner Kulturen stark voneinander unterscheiden können und vor allem gestresste Kulturen stark vom klassischen Trichom differierende optische Eigenschaften aufweisen. Dieser Effekt wird durch die variierende Pigmentierung unter verschiedenen Umweltbedingungen zusätzlich verstärkt, wobei vor allem Carotinoid- und Phycobillingehalte stark variabel sind (Canto de Loura *et al.*, 1987; Srivastava, 2010).

Nostoc muscorum bildet zudem intrazelluläre Speichergranula aus dem Biopolymer Polyhydroxybuttersäure (PHB), welche vor allem als Kohlenstoffspeicher dienen und deren Produktion durch gezielten Nährstoffmangel (beispielsweise Phosphat- oder Stickstoffmangel) gesteigert werden kann (Sharma & Mallick, 2005a). Somit kann die intrazelluläre PHB-Anreicherung gezielt beeinflusst werden und ein breites Spektrum an metabolischen Stadien erzeugt werden.

Gerade die letztgenannten Eigenschaften sorgen für eine hohe erreichbare Heterogenität in Bezug auf Zellmorphologie, -komposition und -metabolismus, weshalb dieser Organismus einen geeigneten Kandidaten zur Implementierung und Validierung optischer Analysemethoden unter verschiedensten Bedingungen darstellt und somit in dieser Arbeit Verwendung findet.

Um jedoch die potenzielle wirtschaftliche und gesellschaftliche Relevanz einer photoautotrophen Biopolymerproduktion zu verdeutlichen, sollen im Folgenden einige Grundbegriffe und Grundlagen der Biopolymerproduktion detaillierter betrachtet werden.

2.1.3 Biopolymere

Konventionelle Polymermaterialien werden meist auf der Basis fossiler Rohstoffe (allen voran Erdöl) produziert. Durch die großen Mengen benötigter Plastikmaterialien in den verschiedensten Anwendungsbereichen entstehen Probleme im Hinblick auf den nachhaltigen Einsatz dieser Produkte. Alternativen bieten sich in der Nutzung von Polymeren, welche auf der Basis nachwachsender Rohstoffe hergestellt werden. Neben der bestenfalls resultierenden Unabhängigkeit von fossilen Rohstoffen ergeben sich vor allem im Zuge ihrer Entsorgung gravierende Vorteile gegenüber konventionellen Produkten, da das hierbei freigesetzte CO₂ bestenfalls im vorherigen Produktionsprozess aus der Atmosphäre gebunden wurde. Je nachdem aus welchem Blickwinkel man Biopolymere betrachtet, gibt es verschiedene Definitionen des Begriffs, so dass im Folgenden zunächst geklärt werden soll, was in dieser Arbeit als „Biopolymer“ bezeichnet wird.

2.1.3.1 Definition & Marktdaten

Der Terminus „Biopolymer“ wird in der Literatur nicht immer eindeutig verwendet, was durch die Tatsache bedingt ist, dass man sich auf verschiedenem Wege einer Einteilung von Polymeren nähern kann. Zu differenzieren sind vor allem zwei Aspekte:

- eine Klassifizierung aufgrund der *Herkunft* von Polymer-Rohmaterialien
- eine Klassifizierung aufgrund der *Abbaubarkeit* von Polymeren

Folgt man dem Kriterium der Abbaubarkeit, so können auch petrochemisch hergestellte Polymere wie beispielsweise Polybutylensuccinat als Biopolymer eingestuft werden, sofern sie durch enzymatische Aktivität von Mikroorganismen in die Endprodukte Wasser, CO₂ und anorganische Komponenten zerlegt werden können (Niaounakis, 2013, S. 77 ff.). Schaut man hingegen auf die Herkunft der Rohmaterialien, so sind solche Stoffe als Biopolymere klassifiziert, welche aus nachwachsenden Rohstoffen bestehen und zwar in einer Nachwuchsrate, welche vergleichbar oder schneller als ihr Verbrauch ist (Niaounakis, 2013, S. 78). Beispielhaft für diese Definition als Biopolymer

sei pflanzliche Stärke genannt. Neben den bisher genannten Stoffen gibt es weitere Biopolymere, welche sich hinsichtlich ihrer Herkunft und Abbaubarkeit unterscheiden. Eine grobe Übersicht verschiedener Materialien ist in Abbildung 2.2 gegeben, wobei folgende Biopolymergruppen unterschieden werden können:

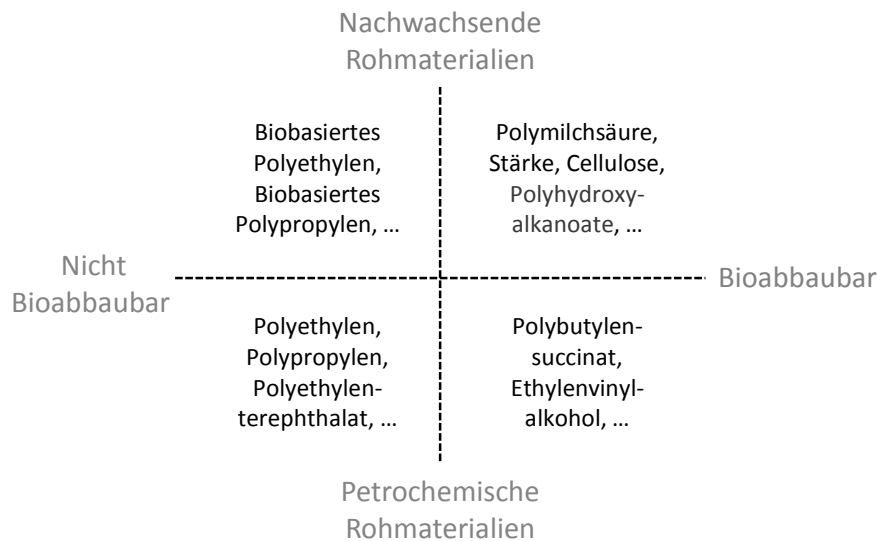


Abbildung 2.2: Einteilung von (Bio-) Polymeren anhand ihrer Ausgangsstoffe sowie im Hinblick auf ihre Bioabbaubarkeit. Rot hervorgehoben wurde die in dieser Arbeit untersuchte Stoffklasse der Polyhydroxyalkanoate.

Im Optimalfall zeichnet sich ein Biopolymer somit dadurch aus, dass es sowohl aus nachwachsenden Ressourcen besteht, als auch biologisch abbaubar ist, so wie dies bei Polyhydroxyalkanoaten (PHA) der Fall ist. Aus diesem Grund wurde mit Poly(3-Hydroxybutyrat) ein Vertreter dieser Stoffklasse als zu untersuchendes Ziel-Polymer in dieser Arbeit ausgesucht.

Auch wenn Biopolymere aufgrund ihrer Nachhaltigkeit ein großes Marktpotenzial bergen, sind sie jedoch momentan eher eine Randerscheinung im weltweiten Kunststoffgeschäft. Bei einer weltweiten Gesamt-Kunststoffproduktion von fast 300 Millionen Tonnen pro Jahr betrug der Anteil an Biopolymeren im Jahr 2012 mit ca. 1,5 Millionen Tonnen weniger als 0,5 % (European Bioplastics, 2014). Ursächlich hierfür sind verschiedene Einflussfaktoren. So sind konventionelle Polymere auf Erdölbasis konkurrenzlos günstig in der Herstellung und Verarbeitung, während die gleichen Mengen an Biopolymeren wesentlich teurer sind, der Kilopreis für PHAs kann dabei den von petrochemischen Polymeren wie Polyethylen oder Polypropylen bis um ein fünffaches über-

steigen (Türk, 2014, S. 84). Zudem sind die Materialeigenschaften von PHA-Polymeren und deren Blends zwar bereits in vielen Fällen für spezifische Anwendungen optimiert, trotzdem ist hier weitere Forschung und Entwicklung nötig, gerade im Hinblick auf eine einfache Einbindung in bestehende Produktions- und Verarbeitungsprozesse.

Die Möglichkeit, PHAs als „nachwachsenden Rohstoff“ zu gewinnen und die Tatsache, dass durch stetige Weiterentwicklungen Kostensenkungen bei der Produktion dieser Biopolymere möglich sind (Chen, 2009), eröffnen insgesamt jedoch Potenzial für deren großtechnische Nutzung.

2.1.3.2 Biopolymere aus Polyhydroxyalkanoaten

Polyhydroxyalkanoate (PHA) sind Carbonsäuren, welche vor allem als Speicherstoffe in Bakterien synthetisiert werden. Ihre potenzielle wirtschaftliche Bedeutung liegt in der Tatsache, dass sie (bei geeigneter Zusammensetzung) vergleichbare Materialeigenschaften zu konventionellen, petrochemisch hergestellten Kunststoffen besitzen. In der Natur gibt es ein breites Spektrum von über 100 verschiedenen Hydroxyalkanoat-Monomeren (Sudesh *et al.*, 2000), deren molekulare Strukturen zu unterschiedlichen Eigenschaften der aus Ihnen synthetisierten Polymere führen. Rein theoretisch ergibt sich aus den bisher bekannten Monomeren ein breites Spektrum herstellbarer Copolymere, deren Eigenschaften sich gezielt beeinflussen lassen.

In Tabelle 2.2 sind verschiedene PHA-(Co)-Polymere aufgelistet

Tabelle 2.2: Vergleich der Materialeigenschaften verschiedener PHA-(Co)-Polymere mit denen konventioneller Plastikmaterialien. Daten entnommen aus Sudesh *et al.*, 2000.

Polymer	Schmelztemperatur (°C)	Glasübergangstemperatur (°C)	Zugfestigkeit (MPa)	Dehnbarkeit bis Bruch (%)
Popypropylen	176	-10	38	400
Polyethylen geringer Dichte	130	-30	10	620
Poly-3-Hydroxybutyrat	180	4	40	5
Poly-3-Hydroxybutyrat-co- 20 Mol-% 3-Hydroxyvalerat	145	-1	20	50
Poly-3-Hydroxybutyrat-co- 6 Mol-% 3-Hydroxyalkanoat ¹	133	-8	17	680

¹ 3-Hydroxialkanoat: 3-Hydroxydecanoat (3 mol-%), 3-Hydroxydodecanoat (3 mol-%), 3-Hydroxyoctanoat (< 1 mol-%), 3-Hydroxy-cis-5-Dodecenoat (< 1 mol-%)

Wie zu erkennen, zeigen beispielsweise Copolymere aus Polyhydroxybutyrat und Polyhydroxyvalerat ähnliche Eigenschaften wie konventionell hergestelltes Polyethylen. Copolymere aus PHB und anderen PHAs zeigen gar nahezu identische Eigenschaften wie Polyethylen geringer Dichte (LDPE).

Die Beeinflussbarkeit der Polymereigenschaften führt dazu, dass maßgeschneiderte Polymere für die verschiedensten Anwendungen hergestellt werden können, was beispielsweise zum Einsatz von PHAs in der Landwirtschaft zur kontrollierten Freisetzung von Herbiziden (Singh *et al.*, 2016), in der Verpackungsindustrie (hier vor allem als Folienblends verwendet) sowie in der Medizintechnik (als abbaubare Implantate oder als Gerüstmaterialien bei der Gewebekultur) geführt hat (Gumel *et al.*, 2013). Durch die stetige Entwicklung neuer PHA-basierter Polymere und deren Anpassung durch anwendungsspezifische Blendmaterialien ist davon auszugehen, dass sich die Einsatzfelder von PHAs in Zukunft weiterhin diversifizieren werden.

2.1.4 Polyhydroxybutyrat (PHB)

Poly(3-Hydroxybutyrat) (PHB) ist ein Biopolymer aus der Klasse der Polyhydroxyalkanoate, welcher in vielen Organismen als Speicherstoff synthetisiert wird. Es ist ein Polymer der 3-Hydroxybuttersäure, deren auftretende Enantiomere in Abbildung 2.3 dargestellt sind:

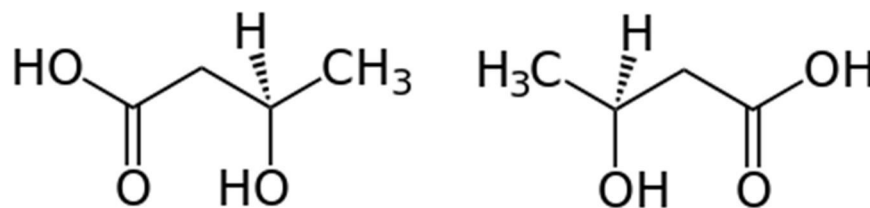


Abbildung 2.3: Struktureller Aufbau eines 3-Hydroxybutyrat-Moleküls. Links: (R)-Form des Moleküls. Rechts: (L)-Form (Quelle: www.wikipedia.de; Zugriff am 14.02.2014)

Chemisch betrachtet handelt es sich um eine Carbonsäure welche im Energiestoffwechsel vieler Lebewesen eine bedeutende Rolle spielt. Bei höheren Lebewesen tritt 3-Hydroxybutyrat lediglich als Monomer im Metabolismus auf. Es wird unter Nährstoffmangelbedingungen durch den Abbau von Fettsäuren als bedeutendster der drei Ketonkörper synthetisiert und kann nachfolgend als Energiequelle verwertet werden (Laffel, 1999). In diversen Mikroorganismen tritt 3-Hydroxybutyrat zudem als Polymer

auf, wobei es in dieser Form vor allem als Energiespeicher und als Senke für überschüssigen Kohlenstoff fungiert.

PHB wurde bereits 1926 von dem französischen Mikrobiologen Lemoigne im Bakterium *Bacillus megaterium* beschrieben (Steinbüchel & Valentin, 1995). Es dauerte jedoch einige Zeit, bis weitere Informationen über die Struktur sowie die Eigenschaften von PHB publiziert wurden (u.a. Williamson & Wilkinson, 1958, Alper & Lundgren, 1963). In der folgenden Zeit wurde klar, dass dieses Polymer in Bakterien weit verbreitet ist (eine Übersicht über einige zur PHB-Synthese fähige Bakterien gibt Steinbüchel, 1991) und sich die intrazellulär eingelagerten PHB-Mengen durch die Bereitstellung verschiedener Substrate und veränderte Kulturbedingungen (beispielsweise Stickstoffmangel) beeinflussen und erhöhen lassen (McRae & Wilkinson, 1958). Grundlegende Untersuchungen zur Synthese von PHB, beteiligten Enzymen und Genen wurden vor allem in dem hierfür als Beispielorganismus dienenden Bakterium *Alcaligenes eutrophus* durchgeführt (Steinbüchel & Schlegel, 1991). Dieser Organismus kann unter geeigneten Kulturbedingungen über 90 % seines Trockengewichts in Form von PHB einlagern und wird deshalb zur fermentativen Produktion von PHB-PHV-Copolymeren genutzt, welche beispielsweise unter dem Namen Biopol kommerziell vertrieben wurden (Steinbüchel & Schlegel, 1991). Um die Herstellungskosten von PHB zu senken wurden bereits verschiedene Ansätze verfolgt. So wurden teure Substrate durch kostengünstigere ersetzt (Sudesh *et al.*, 2000) und ganze Biosynthesewege gentechnisch in schneller wachsende und im Hinblick auf ihre Substrate noch anspruchslosere Bakterien wie *Escherichia coli* transferiert (Zhang *et al.*, 1994). Auch transgene Pflanzen, welche bis zu 40 % (*Arabidopsis thaliana*; Bohmert *et al.*, 2000) bzw. 18% (*Nicotiana tabacum*, Bohmert-Tatarev *et al.*, 2011) ihres Trockengewichts in Form von PHB einlagern, wurden bereits erzeugt. Nachteilig hierbei ist jedoch, dass diese Pflanzen oftmals stark veränderte Phänotypen aufweisen (z.B. Wuchshemmungen und Chlorosen) und während eine PHB-Produktion in Tabakpflanzen nicht ökonomisch ist, besitzt *Arabidopsis* sogar keinerlei agronomischen Wert (Somleva *et al.*, 2013). Eine Übertragung solcher hoher Anreicherungsraten auf ertragsstarke C₄-Pflanzen steht noch aus und ist essentiell um eine wirtschaftliche kommerzielle PHB-Produktion in Pflanzen zu ermöglichen. Als alternative photoautotrophe PHA-Produzenten bieten sich deshalb aquatische Mikroorganismen an, welche ohne Zugabe externer Kohlenstoffquellen PHAs synthetisier-

ren können. Dies können neben (transgenen) Mikroalgen vor allem Cyanobakterien sein, welche die natürliche Fähigkeit besitzen PHB zu produzieren. Normale Akkumulationsraten liegen dabei im unteren Prozentbereich bezogen auf das Gesamt-Trockengewicht der Zellen, was letztlich nur eine geringe PHB-Ausbeute ermöglicht (Asada *et al.*, 1999). Geeignete Kulturbedingungen können jedoch oftmals zu einer Vervielfachung der PHB-Produktion führen (Brandl *et al.*, 1990). So zeigten beispielsweise Sharma & Mallick (2005a), dass sich der PHB-Grundgehalt in *Nostoc muscorum*, welcher bei ca. 8,5 % des Trockengewichts liegt, unter photoautotrophen Bedingungen durch induzierten Phosphatmangel auf 23 % steigern lässt. Unter chemoheterotrophen Stickstoffmangel-Bedingungen (mit Acetat-Zugabe) sind gar Anreicherungsraten von bis zu 43 % des Trockengewichts möglich (Sharma & Mallick, 2005b).

Im Gegensatz zu Landpflanzen konkurrieren Cyanobakterien nicht mit Anbauflächen, welche für die Nahrungsmittelproduktion genutzt werden können und sie weisen wesentlich höhere Vermehrungsraten auf. Wie bereits von Sudesh *et al.* (2000) angeregt, könnten sie theoretisch sogar in Prozessen eingesetzt werden (beispielsweise bei der biologischen Reinigung von Abwässern), in denen PHB schließlich „nur“ als Beiprodukt aus der Biomasse extrahiert wird (denkbarerweise auch nach der vorherigen Extraktion von Pigmenten oder anderen hochpreisigen Inhaltsstoffen), was zu einer Kostensenkung der PHB-Produktion beitragen würde.

In Abbildung 2.4 ist ein Auszug des zellulären Stoffwechsels von *Synechocystis* PCC6803 gegeben. Es handelt sich hierbei um ein Cyanobakterium, welches als Modellorganismus fungiert und unter anderem zur PHB-Synthese fähig ist. Auch wenn in dieser Arbeit ein anderer Organismus untersucht wurde und die gezeigte Stoffwechselkarte nicht direkt auf *N. muscorum* übertragbar ist, so ist doch der enzymatische PHB-Syntheseweg identisch und wird im Folgenden näher erläutert.

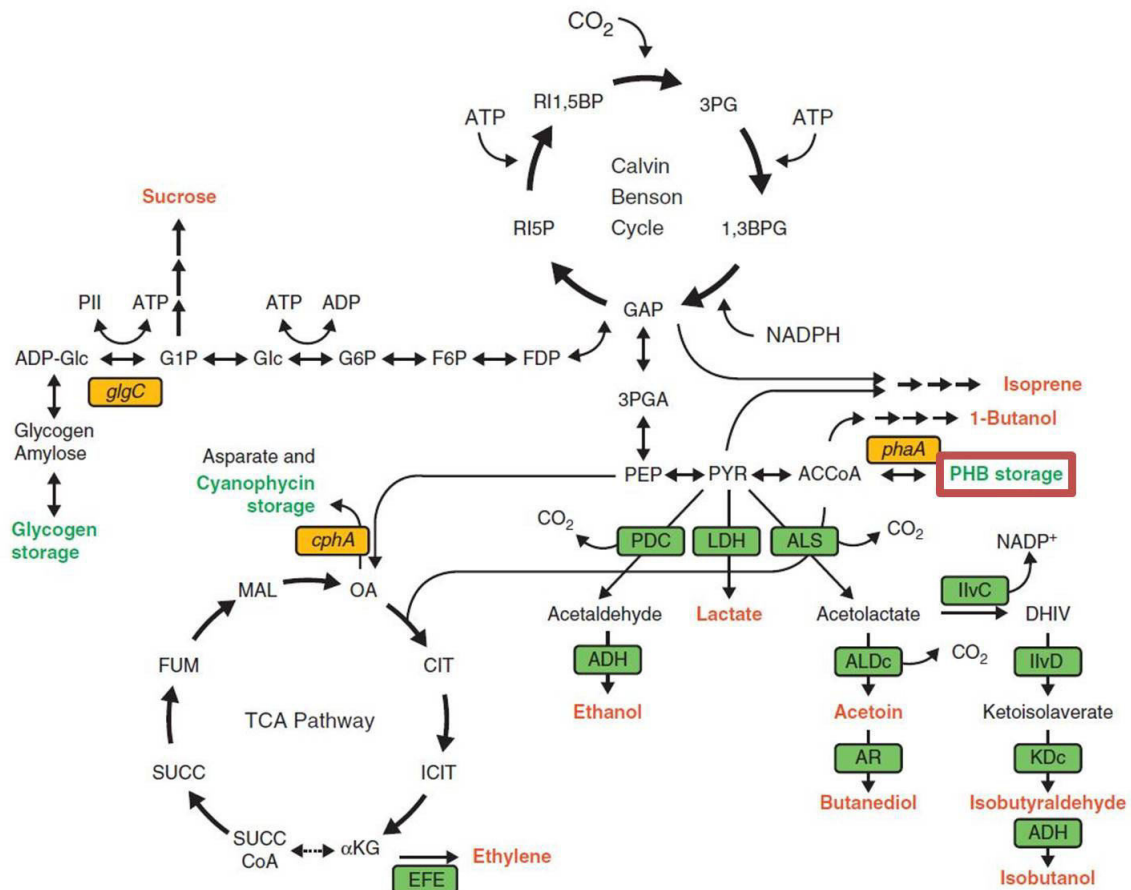


Abbildung 2.4: Schematische Übersicht des intermediären Stoffwechsels von *Synechocystis* PCC8603. Wirtschaftlich nutzbare (Speicher-) Stoffe wurden farblich hervorgehoben. PHB ist rot markiert. (Quelle: Wijffels *et al.*, 2013)

Wie zu erkennen, dient Acetyl-Coenzym-A (Acetyl-CoA) als Ausgangsstoff der cyanobakteriellen PHB-Synthese. Während die obige Darstellung mit *phaA* lediglich ein Gen aufführt, sorgt tatsächlich jedoch das Zusammenspiel dreier Enzyme für die intrazelluläre PHB-Synthese aus Acetyl-Co-A. Abbildung 2.5 zeigt die an der Synthese beteiligten Gene, bzw. die aus ihnen translatierten Enzyme sowie die von ihnen katalysierten Reaktionswege.

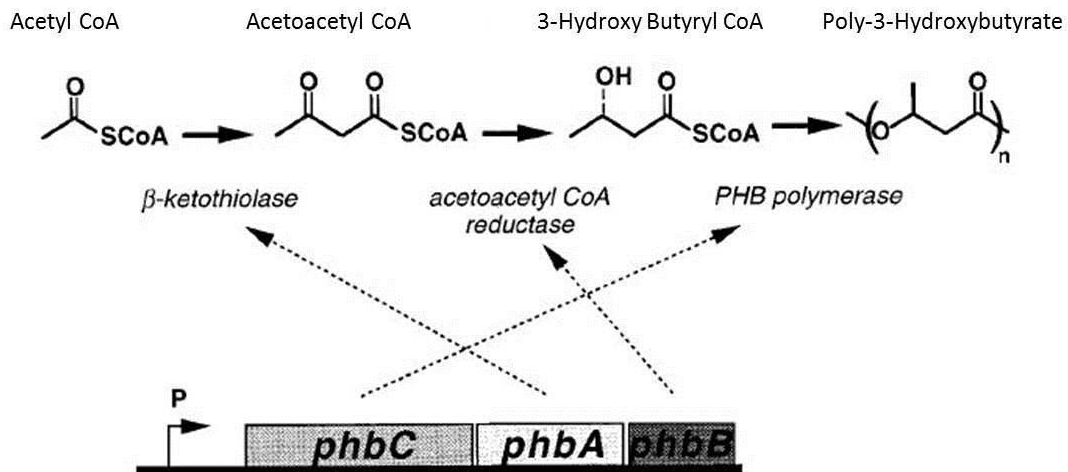


Abbildung 2.5: An der Biosynthese von PHB beteiligte Gene und Enzyme. In einem dreistufigen Prozess wird zunächst Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA umgewandelt, woraus nachfolgend Poly-3-Hydroxybutyryl-CoA gebildet wird. Die Polymerisation der Monomere zu PHB wird durch eine PHB-Polymerase katalysiert. Alle Gene befinden sich auf einem Operon, welches durch einen gemeinsamen Promotor gesteuert wird. (Quelle: Nach Madison & Huisman, 1999)

Bei der mehrstufigen PHB-Synthese werden zunächst Acetyl-CoA-Moleküle durch das von *phbA* codierte Enzym β -Ketothiolase im Cytoplasma zu Acetoacetyl-CoA kondensiert. In einem nachfolgenden Schritt wird durch eine Acetoacetyl-CoA-Reduktase, welche durch das Gen *phbB* codiert wird, das Acetoacetyl-CoA in 3-Hydroxybutyryl-CoA umgewandelt. Für die abschließende Polymerbildung ist eine PHB-Polymerase zuständig, welche vom Gen *phbC* codiert wird (Madison & Huisman, 1999).

Das entstandene Polymer lagert sich nachfolgend zu amorphen Einschlüssen zusammen, welche von einer dünnen Lipidmembran umgeben sind (Jensen & Sicko, 1971).

In dieser Membran sind neben der PHB-Polymerase (welche nach Erkenntnissen von Haywood *et al.*, (1989) sowohl frei im Cytoplasma als auch Granula-assoziiert vorliegt), u.a. weitere Proteine verankert, welche die PHB-Synthese kontrollieren (Kadowaki *et al.*, 2011). Somit wirkt diese Membran zum einen regulierend auf die PHB-Synthese, zum anderen stabilisieren weitere Proteine wie beispielsweise Phasine die Struktur der PHB-Granula (Pötter & Steinbüchel, 2005).

Bemerkenswert bei der PHB-Synthese ist unter anderem die Konformationspezifität einiger der beteiligten Enzyme. So ist die Reduktion von Acetoacetyl-CoA zu β -Hydroxybutyryl-CoA, welche den zweiten Syntheseschritt bildet, ein enantioselektiver Prozess, an dessen Ende stets die R-Form der Hydroxybutyryl-CoA-Monomere entsteht (Steinbüchel & Schlegel, 1991; Reddy *et al.*, 2003). Diese Monomere werden

wiederum in einem stereoselektiven Prozess zu PHB polymerisiert, wobei die für diesen Prozess verantwortliche PHB-Synthase lediglich R-Hydroxybutyryl-CoA als Edukt nutzt (Steinbüchel & Schlegel, 1991). Als Konsequenz liegt biosynthetisches PHB stets in seiner R-Form vor (Steinbüchel & Valentin, 1995) und ist somit ein optisch aktives Molekül, welches die Fähigkeit besitzt, die Polarisationsrichtung von linear polarisiertem Licht zu drehen (Alper *et al.*, 1963) bzw. links- und rechtsdrehend zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren.

Unter anderem die Enantiomerreinheit von biogenem PHB in Kombination mit den (auch photoautotroph) erzielbaren beachtlichen Anreicherungsraten machen diesen Stoff zu einem interessanten Kandidaten für eine industrielle Produktion in geschlossenen Anzuchtssystemen wie Photobioreaktoren.

Aufgrund der beschriebenen (optischen) Eigenschaften wurde PHB als Demonstrationsmetabolit für die Evaluierung der im Folgenden aufgeführten optischen Analyseverfahren ausgewählt.

2.2 Optische *In-situ*-Analysen

Anmerkung: Zur Klärung in welchem Wortsinn diverse Termini der optischen Messtechnik in dieser Arbeit verwendet werden sei an dieser Stelle auf die im Anhang dieser Arbeit (Abschnitt 10.1) gegebenen Kurzdefinitionen verwiesen.

Im Bereich der optischen Analyseverfahren gibt es eine große Spannweite von Methoden, welche für einen *In-situ*-Einsatz³ zur Untersuchung von Kultursuspensionen phototropher Organismen geeignet sind. Das Hauptaugenmerk bei der Auswahl der in dieser Arbeit evaluierten Methoden liegt hauptsächlich in ihrer Anwendbarkeit in wässrigen Kulturmedien. Da alle im Folgenden detaillierter aufgeführten Verfahren prinzipiell für diese Anwendung geeignet sind, soll zudem ein Einblick in bisherige Arbeiten anderer AutorInnen gegeben werden, wobei jeder Technik ein eigener Abschnitt gewidmet ist und explizit der Fokus auf Einsätze zur Analyse von Mikroalgen bzw. Cyanobakterien gelegt wird.

Als einschränkend für die in Betracht zu ziehenden Messmethoden und Wellenlängenbereiche sind gewisse physikalische Zusammenhänge ausschlaggebend. So wirkt der hohe Energieeintrag in die zu untersuchenden Proben bei Wellenlängen unter 400 nm potenziell zellschädigend und mutagen (Jenkins, 2009; Pessoa, 2012). Analysen mittels Röntgen- oder tiefer UV-Strahlung scheiden deshalb für Anwendungen im *In-vivo*-Bereich aus, da beispielsweise UV-C-Applikationen bereits innerhalb kurzer Zeit ($t = 15$ Minuten) physiologische Reaktionen hervorrufen können (Sharma *et al.*, 2014). Einzig die relativ gesehen energieärmere UV-A-Strahlung kann in begrenztem Maße für Analysen lebender Organismen verwendet werden. Auch hohe Absorptionen durch wässrige Kulturmedien (wie beispielsweise im NIR-Bereich beobachtbar) führen zu einer starken Einschränkung des nutzbaren Wellenlängenbereiches für *In-situ*-Messungen.

Tabelle 2.3 gibt eine Übersicht jener Verfahren, welche an lebenden Organismen eingesetzt werden können sowie ihrer grundlegenden Stärken und Schwächen, wobei explizit darauf hingewiesen sei, dass diese Auflistung gewisse Verallgemeinerungen

³ Es sei an dieser Stelle explizit darauf hingewiesen, dass in dieser Arbeit auch der Begriff „nicht invasiv“ verwendet wird. Beides bezieht sich auf eine Vermessung von Kultursuspensionen direkt im Reaktorgefäß, ohne dass aus diesen vor der Messung eine separate Probe entnommen werden muss und ist praktisch äquivalent zum Term „*in situ*“ zu betrachten. Wo der Begriff anders zu interpretieren ist, ist dies explizit vermerkt.

aufweist und Einzelfälle (beispielsweise durch unterschiedliche Versuchssetups, Geräte, Zielmetabolite etc.) von dieser Bewertung abweichen können.

Tabelle 2.3: Verallgemeinerte Übersicht der Funktionalitäten verschiedener Verfahren der optisch-spektroskopischen Prozessanalytik. Aus: Kessler (2006), verändert nach Penner (2010)

Messmethode	UV / VIS	NIR	MIR	Fluoreszenz	Raman
Wellenlängenbereich (nm)	10 - 380 / 380 - 780	780 - 2500	2500 - 25000	10 - 1000 ¹	100 - 1064 ²
Physikalische Grundlage	Anregung von Elektronen auf höhere Energieniveaus	Anregung von Schwingungszuständen (Obertonschwingungen)	Anregung von Schwingungszuständen (Grundschwingungen)	Anregung von Elektronen und Stokes-verschobene Strahlungsemission	Monochromatische Anregung von Schwingungszuständen
Empfindlichkeit	+++	+ (+)	+++	+++ (+)	(+)
Sampling	+++	+++	+	++	+++
Arbeiten in wässrigem Medium	+++	-	--	++	+++
Universelle Anwendbarkeit für diverse Zielanalyte	+++	++	+	+	+
Anwendbarkeit für die Prozessanalyse	+++	+++	+	+	+++
Gemessenes Signal	Absorption	Absorption	Absorption	Emission	Absorption
Vermessbare Probenotypen	fest, flüssig gasförmig	fest, flüssig	fest, (flüssig) gasförmig	fest, flüssig (gasförmig)	fest, flüssig (gasförmig)
Techniken	Transmission, Reflexion, ATR ⁴	Transmission, Reflexion, ATR	ATR, (Transmission)	Reflexion, Transmission	Reflexion
Relative Kosten	1	3-5	6-10	4-6	8-12

¹ Der tatsächlich nutzbare Wellenlängenbereich hängt hierbei (unter anderem) stark von der zu untersuchten Probe ab. So muss die Anregungswellenlänge lediglich energiereich genug sein, um das Zielmolekül auf einen angeregten Zustand zu heben (auf Spezialfälle wie Zwei- oder Mehrphotonenanregungen durch langwelligere Energiequellen sei hierbei nicht näher eingegangen).

² Der nutzbare Anregungsbereich hängt auch hier (unter anderem) von der Probe ab, wobei deren thermische Stabilität meist die minimale Wellenlänge bedingt. Im langwelligen Bereich ist das Verfahren vor allem durch technische Faktoren wie Sensitivität und ein begrenztes Repertoire an Anregungslasern, sowie die geringe Signalintensität der Raman-Banden limitiert.

³ Emission von Fluoreszenzsignalen nach vorheriger Strahlungsabsorption durch die Probe.

⁴ Abgeschwächte Totalreflexion (attenuated total reflection, ATR) bedient sich der Tatsache, dass bei vorhandener Totalreflexion von Strahlung (beispielsweise in einem Lichtleiter) stets evaneszente Wellen entstehen, welche mit einer Probe, die an der reflektierenden Fläche aufgebracht ist, wechselwirken können.

Weitere laserbasierte Analysetechniken wie beispielsweise die laserinduzierte Plasmaspektroskopie, welche durch die Produktion eines Plasmas aus dem Zielanalyt obligat destruktiv ist, wurden zwar bereits für die Anwendung zur Untersuchung von Algen-suspensionen beschrieben (Pořízka *et al.*, 2012), werden aber aufgrund der Tatsache, dass sie (meist) destruktive Verfahren sind, in dieser Arbeit nicht ausgeführt und angewendet. Für eine Übersicht zu weitergehenden laserbasierten Verfahren wie dem oben genannten sowie deren Anwendungen sei auf Pořízka *et al.* (2014) verwiesen.

2.2.1 Zelldichten-Bestimmung

Für viele Fragestellungen, ist es unabdingbar, die aktuell in einer Algenkultur vorherrschende Zellzahl zu kennen. Dies ist neben der Bestimmung von Wachstumsraten vor allem dann der Fall, wenn weitere Messergebnisse (z.B. ein quantitativ bestimmter Inhaltsstoffe) in Relation zur einzelnen Zelle gesetzt werden sollen. Da die Messung der Biomassekonzentration solch fundamentale Bedeutung hat, gibt es eine entsprechend große Bandbreite an verfügbaren Methoden.

Gravimetrische Bestimmungen durch wiegen von Zell-Frisch- oder -trockenmasse sind einfach durchzuführen, jedoch für geringe Zelldichten schlecht geeignet, da hohe Messfehler auftreten können. Gleiches gilt für volumetrische Bestimmungen, beispielsweise durch Zentrifugation in speziell skalierten Probengefäßen. Die Auszählung mittels Zählkammer, wobei ein definiertes Volumen visuell ausgewertet wird, ist eine der genauesten Methoden, jedoch ist sie sehr zeitintensiv und erfordert, genau wie gravimetrische und volumetrische Methoden, stets eine Entnahme von Probenmaterial aus dem laufenden System. Der große Vorteil in der Kulturdichtebestimmung mittels optischer Methoden liegt darin begründet, dass diese bestenfalls direkt im Reaktor durchgeführt werden können und aufgrund kurzer Messdauern Daten nahezu in Echtzeit erfasst werden können. Tabelle 2.4 gibt eine Übersicht über optische Messmethoden zur Kulturdichtebestimmung, wobei im Hinblick auf einen Einsatz in geschlossenen Reaktorsystemen vor allem die Möglichkeit zur Implementierbarkeit in ein online-Messsystem hervorgehoben werden soll.

Tabelle 2.4: Optische Methoden zur Messung von Kulturdichten in Suspensionen von phototrophen Mikroorganismen

Methode	Vorteile	Nachteile	Nicht-Invasivität	Quelle
Auszählen per Mikroskopie	sehr genau, Zellmorphologie erfassbar	extrem zeitaufwändig	nicht möglich	Guillard & Sieracki, 2005
Extinktionsmessungen	einfaches Verfahren, geringer Geräteaufwand	Bei Messungen im VIS-Bereich sind Messfehler durch variierende Pigmentierung möglich, u.U. sind Verdünnungsschritte bei hohen Kulturdichten nötig	möglich	Havlik <i>et al.</i> , 2013b; Sandnes <i>et al.</i> , 2006; Benavides <i>et al.</i> , 2015; Jia <i>et al.</i> , 2015
Reflexionsmessungen	einfaches Verfahren, geringer Geräteaufwand	Bei Messungen im VIS-Bereich sind Messfehler durch variierende Pigmentierung möglich	möglich	Gitelson <i>et al.</i> , 1999
Farbanalysen von Kulturbildern	einfaches Verfahren, geringer Geräteaufwand	Fehleranfälligkeit von Algorithmen zur Farbanalyse	möglich	Jung & Lee, 2006; Sarrafzadeh <i>et al.</i> , 2015
Fluoreszenzmessungen	sehr genau	Störungen durch variierende Pigmentierungen möglich	möglich	Guillard & Sieracki, 2005
Bildanalytische Techniken	Zellmorphologie erfassbar	Fehleranfälligkeit von Algorithmen zur Zelli-identifikation/-zählung	nicht möglich	Coltelli <i>et al.</i> , 2013 ⁴
<i>In-situ</i> -Mikroskopie	<i>In-situ</i> -Messungen möglich, Zellmorphologie erfassbar	Kontakt mit Kultursuspension notwendig	möglich	Havlik <i>et al.</i> , 2013a
Durchflusszytometrie	sehr genau, Zellmorphologie erfassbar	relativ langsam, bei Messungen ohne Durchflusssystem Probennahme nötig	möglich	Hyka <i>et al.</i> , 2013
Holografie	extrem schnell, Zellmorphologie erfassbar	nur bei geringen Kulturdichten anwendbar	möglich	Garcia-Sucerquia <i>et al.</i> , 2006

Wie ersichtlich, gibt es vielfältige Verfahren, um Kulturdichten von Mikroorganismen zu bestimmen. Die meisten der in Tabelle 2.4 aufgeführten Verfahren besitzen jedoch den erheblichen Nachteil, dass eine Probenentnahme aus dem laufenden Kulturpro-

⁴ Zwar ist das Ziel dieser Arbeit vor allem die Identifizierung von Algenarten anhand ihrer Morphologie, eine Anwendung zur Quantifizierung erscheint jedoch möglich.

zess nötig ist, bevor sie angewendet werden können. Extinktionsmessungen in Küvetten sind vor diesem Hintergrund für online-Messungen nicht anwendbar. Nichtsdestotrotz gibt es einige Umsetzungen dieses Messprinzips, welche Dichtemessungen ohne Probenentnahme ermöglichen. So funktioniert beispielsweise der von der Firma Endress+Hauser Messtechnik GmbH & Co. KG (Weil am Rhein) vertriebene Sensor OUSBT66, indem die von einer Infrarot-Leuchtdiode (IR-LED) emittierte Strahlung, bzw. deren Abschwächung durch Partikel, detektiert wird. Zwar operiert dieses System im NIR-Bereich, so dass Fehlbestimmungen der Biomasse durch variable Pigmentabsorptionen minimiert werden können, allerdings arbeitet der Sensor nicht berührungslos und muss im Messbetrieb stets in Kontakt mit der Kultursuspension stehen. Ein berührungslos messendes Konzept wurde von Sandnes *et al.* (2006) vorgestellt. Das System arbeitet mit NIR-LEDs, welche eine Peak-Emissionswellenlänge von 880 nm besitzen. Als Detektor fungieren Fotodioden und die Messungen werden direkt in einem Röhrenphotobioreaktor durchgeführt. Hierfür wurde der Reaktor-Röhrendurchmesser von den Autoren an einer Messstelle auf eine Schichtdicke von einem Zentimeter verringert, an welcher die Kulturdichten *in situ* und im laufenden Betrieb aufgenommen werden können. Das gleiche Prinzip wurde von Jia *et al.* (2015) verwendet, wobei diese Autoren bei drei verschiedenen Wellenlängen messen. Bei einmalig durchgeführter Sensorkalibrierung ist somit ist eine schnelle und automatisierte Messung von Zelldichten möglich, jedoch handelt es sich bei dem beschriebenen System um eine stationäre Messung an einem großvolumigen Photobioreaktor, wodurch es nicht möglich ist, viele Einzelproben separat zu vermessen.

Weitere der oben genannten Verfahren wie bildanalytische Techniken o.ä. seien an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt, da diese stets eine Probenentnahme voraussetzen.

2.2.2 Chlorophyllfluoreszenzmessungen

Grundlegend für diese Art von Messungen ist die Tatsache, dass Pigmente, welche sich nach der Absorption von Photonen auf erhöhten Energieniveaus befinden, mehrere konkurrierende Möglichkeiten haben, in ihren energetischen Grundzustand zurückzukehren. Wie u.a. von Campbell (1998) beschrieben, gibt es folgende Mechanismen:

1. Übertragung der Anregungsenergie auf ein benachbartes Pigment, so wie es beispielsweise in Antennenkomplexen geschieht
2. Photochemische Reaktionen, wobei in den photosynthetischen Reaktionszentren angeregte Elektronen vom Pigmentmolekül in die Elektronentransportkette übertragen werden
3. Rückkehr in den Grundzustand durch Wärmeabgabe
4. Energieabgabe in Form von Fluoreszenz-Photonen mit größerer Wellenlänge
5. Energieabgabe über längere Zeiträume in Form von Phosphoreszenz-Photonen

Diese Prozesse laufen parallel mit verschiedenen Wahrscheinlichkeiten ab, wobei ihre relativen Verhältnisse zueinander unter „normalen“ Umweltbedingungen oft recht konstant sind. Umgekehrt können Abweichungen in den relativen Häufigkeiten Rückschlüsse auf veränderte physiologische Zustände eines Versuchsorganismus erlauben. Als ein Faktor kann deshalb die Fluoreszenz betrachtet werden und anhand dieses Signals nachfolgend Rückschlüsse auf andere metabolische Faktoren gezogen werden.

Als grundlegend für die beobachtbaren Fluoreszenzsignale sind direkt aufeinanderfolgende Absorptions- und Emissionsvorkommnisse von Photonen an einem Molekül, welche aufgrund der Spinbeibehaltung im Nanosekundenbereich ablaufen. In biologischen Systemen ist vor allem das Photosystem II an einer beobachtbaren (variablen) Fluoreszenzemission beteiligt. Für Chlorophyll innerhalb von Algenzellen liegt die Quanteneffizienz der Fluoreszenz unter ungestressten Bedingungen bei ca. 33 % der eingestrahltten Photonen, während andere Pigmente wie z.B. Carotinoide teilweise nur ein Zweitausendstel dieses Wertes erreichen (Kleinegris *et al.*, 2010). In Cyanobakterien tragen zudem Phycobilliproteine zum Fluoreszenzsignal bei, welches sich somit qualitativ anders verhält als jenes von Grünalgen und höheren Pflanzen (Schubert *et al.*, 1989; Campbell, 1998).

Viele bisherige Arbeiten nutzten Fluoreszenzsignale um zelluläre Reaktionen von Grünalgen beispielsweise auf Herbizide und Schadstoffe (Juneau *et al.*, 2001) oder andere Umwelteinflüsse zu detektieren und waren weniger darauf ausgerichtet, quantitative Aussagen im Hinblick auf einen bestimmten Metabolit innerhalb der Zellen zu treffen. Auch für *Nostoc* und andere Cyanobakterien gibt es solche qualitativen Untersuchungen zum Einfluss von Umweltfaktoren (beispielsweise Rahman *et al.*, 2011). Auch gibt es Untersuchungen, in denen Fluoreszenzsignale direkt mit Konzentrationen

verschiedener Inhaltsstoffe wie beispielsweise Phycocyaningehalten oder Vorgängen wie der Sauerstoffproduktion quantitativ korreliert werden konnten (z.B. Campbell *et al.*, 1998). Eine Nutzung von Chlorophyllfluoreszenzsignalen zur indirekten Quantifizierung eines einzelnen Zielmetabolites direkt in Bioreaktoren ist jedoch nicht gegeben.

2.2.3 VIS-Spektroskopie

2.2.3.1 Theoretische Grundlagen der VIS-Spektroskopie

Da es sich bei der VIS-(Extinktions)-Spektroskopie um ein relativ einfaches Verfahren handelt, welches bereits routinemäßig im Labor, im Feld und in industriellen Anwendungen zum Einsatz kommt, sei an dieser Stelle auf eine dezidierte theoretische Grundlagenausführung verzichtet. Vielmehr sei beispielhaft auf Penner (2010) und auf Standardwerke der Spektroskopie wie jenes von Skrabal (2008) verwiesen, in denen diese Messtechnik ausführlich erläutert wird.

2.2.3.2 Praktische Arbeiten zur VIS-Spektroskopie an phototrophen Mikroorganismen

Viele der publizierten Arbeiten zur Anwendung VIS-spektrometrischer Techniken in der Analyse von Mikroalgen und anderen marinen photoautotrophen Organismen behandeln vor allem in der Hinsicht quantitative Fragestellungen, als sie das Ziel haben, einzelne Algenarten oder Mischkulturen quantitativ in der Umwelt zu erfassen (beispielsweise im Hinblick auf potenziell giftige Algenblüten). So fokussiert sich ein großer Teil dieser Veröffentlichungen denn auch auf Pigmentanalysen, anhand derer sich Rückschlüsse über die Zusammensetzung von Algenpopulationen oder die taxonomische Einordnung einzelner Arten ziehen lassen (z.B. bei Millie *et al.*, 2002), während die *In-situ*-Detektion von anderen Metaboliten nicht Teil dieser Arbeiten ist.

Aus diesem Grund sind in der folgenden Tabelle 2.5 vor allem jene bisher publizierten Arbeiten aufgeführt, in denen VIS-spektroskopische Methoden zur Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten in photoautotrophen Mikroorganismen zur Anwendung kommen.

Tabelle 2.5: Auswahl bisheriger Arbeiten zur VIS-spektroskopischen Analyse phototropher Mikroorganismen (I)

Messmethodik	$\Delta\lambda_{\text{mess.}}$ (nm)	Untersuchter Organismus	Zielsetzung	Zielanalyt	Quantitative Analyse	Nicht invasiv	Besonderes	Quelle
In-vivo-Absorptionsspektroskopie	400-652	31 verschiedene Algenarten aus 10 verschiedenen Klassen	Klassenspezifische Zuordnung der Absorptionsspektren von Mikroalgen anhand einzelner Wellenlängen	Intrazelluläre Pigmente	Nein, da nur relative Unterschiede zwischen verschiedenen Spektren nach Einpunktnormierung als Regressionsgrundlage dienten	Nein, da Proben aus Reaktoren entnommen wurden	3-5 einzelne Wellenlängen als Regressionsgrundlage waren ausreichend für über 86 % korrekte Klassenzuordnung	Johnsen et al., 1994
Absorptionsspektroskopie	440-650	<i>Gymnodinium breve</i>	Quantifizierung einer potenziell Algenblüten bildenden Art anhand von Carotinoideisignaturen in artifizialen und echten Gewässerproben	Gyroxanthindiester (Carotinoid)	Nein, da mathematisch (aus Einzelspektren) erzeugte Mischkulturen nur qualitativ klassifiziert wurden	Nein, da abfiltrierte Algenproben (spektrometrisch) vermessen wurden	Berechnungen wurden anhand von zuvor normierten Ableitungsspektren vierter Ordnung durchgeführt. Je nach Zusammensetzung der Proben reichen wenige Wellenlängen für korrekte Klassifizierungen aus	Millie et al., 1997
In-vivo-Absorptionsspektroskopie	350-750	Artifizielle Daten, einzelne Algenarten, Mischpopulationen	Ermittlung von Lorenzkurven bzw. Gaußkurven zur Dekonvolution von Pigmentbanden in Absorptionsspektren sowie deren Rekonstruktion	Chlorophylle, Carotinoide, weitere Pigmente	Semi, da zwar die Spektren an sich theoretisch und quantitativ untersucht wurden, es jedoch keinen Zielanalyt o.ä. gab	Nein, da Proben aus Reaktoren entnommen wurden	Pigmentidentifizierungen wurden anhand von artifizial berechneten Ableitungsspektren vierter Ordnung durchgeführt	Aguirre-Gomez et al., 2001
In-vitro-Absorptionsspektroskopie	350-770	9 Algenarten aus verschiedenen taxonomischen Abteilungen	Quantifizierung des prozentualen Anteils einzelner Algenabteilungen an der Gesamtbio-masse anhand von	Kein bestimmter Anteil	Semi, da zwar die prozentualen Anteile einzelner Abteilungen auf 6 bis 11 % der Gesamtmasse genau bestimmt wurden aber keine absoluten Quantifizierungen stattfanden	Nein, da Proben abfiltriert und Pigmente vor deren Spektroskopie extrahiert wurden	Berechnungen wurden anhand von normierten Ableitungsspektren erster Ordnung durchgeführt. Angabe, dass durch den Kreuzvalidierungsfehler von durchschnittlich 8,6 % einzelne Abteilungen mit einem Anteil unter 20 % nicht in Mischproben identifiziert werden kann	Moberg et al., 2002

Tabelle 2.5 (Fortsetz.): Auswahl bisheriger Arbeiten zur VIS-spektroskopischen Analyse phototropher Mikroorganismen (II)

Messmethodik	$\Delta\lambda_{\text{Mess}}$ (nm)	Untersuchter Organismus	Zielsetzung	Zielanalyt	Quantitative Analyse	Nicht invasiv	Besonderes	Quelle
Mikroskopie	400-700	Diverse Algen und Cyanobakterien (aus Messungen der Autoren und Literatürübersicht)	Fit von Pigmentspezifischen Gaußkurven in Extinktionsspektren und artspezifische Betrachtung von intrazellulären Pigmentkompositionen	Diverse Pigmente (Chlorophylle, Carotinoide, Phycozyanine)	Semi, da zwar Spektren in sich quantitativ zerlegt wurden jedoch keine Stoffquantifizierungen o.ä. anhand gemessener Extinktionsintensitäten stattfanden	Nein, da einzelne Zellen mikroskopiert wurden	An Ableitungsspektren vierter Ordnung konnten die Lagen der Absorptionsmaxima einzelner Pigmente bestimmt werden und somit die zudem durchgeführten Bandenfits validiert werden	Barsanti et al., 2007
Absorptionsspektroskopie	240-900	<i>Karenia brevis</i> modellierte Spektren von Zellkompartimenten	Kompartimentspezifische Extinktionsanteile in Extinktionsspektren modellieren um Veränderungen in gemessenen Extinktionsspektren lebendiger Kulturen ursächlich erklären zu können	Zellkompartimente und ganze Zellen	Nein, da vor allem theoretische Modellierungen von Spektraldaten erfolgten	Nein, da Proben in Quarzküvetten vermessen wurden	Laut Autoren ermöglicht es der Ansatz, die Zelle in multiple Komponenten aufzuteilen, Spektrale Eigenschaften von Organismen detailliert zu interpretieren. Zum VIS-Bereich zusätzliche Messungen im UV-Bereich können Parameter wie Zellgröße, Nukleotid- und Proteinkonzentrationen charakterisiert werden	Spear et al., 2009
Mikroskopie	400-700	24 verschiedene Mikroalgenarten	Identifizierung von Algenarten anhand spektraler und geometrischer Eigenschaften mittels Mikroskopie und Bildanalyse	Pigmente und Zellkontur	Nein, da zwar 96,6 % aller 3423 Aufnahmen von 24 verschiedenen Organismen korrekt klassifiziert wurden, jedoch keine Konzentrationen o.ä. irgend eines Stoffes erfasst wurden	Nein, da einzelne Zellen mikroskopiert wurden	Sowohl geometrische als auch spektrale Eigenschaften wurden zur Identifizierung und Klassifizierung von Algenarten vermessen. Als Ergänzung zu nicht-invasiven Techniken ein hochgradig interessanter Ansatz	Coltelli et al, 2013
Reflexionspektroskopie	400-1050	<i>Spirulina platensis</i>	Vorhersage des Proteingehaltes in <i>Spirulina</i> -Pulver anhand von Transmissionsspektren	Proteine	Ja, da Proteingehalte von 59,94 bis 64,37 % mit einem RMSEP von 0,181 % ($R^2 = 0,986$) vorhergesagt wurden	Nein, da getrocknetes <i>Spirulina</i> -Pulver vermessen wurde	Der RMSEP bei Verwendung von PLS-Regressionen war doppelt so hoch wie bei der Verwendung von support vector machine-Regression. Streulichtkorrekturen zeigten sich als die beste Datenvorbereitungsmethode	Wu et al., 2013

Tabelle 2.5 (Fortsetz.): Auswahl bisheriger Arbeiten zur VIS-spektroskopischen Analyse phototropher Mikroorganismen (III)

Messmethodik	$\Delta\lambda_{\text{Mess}}$ (nm)	Untersuchter Organismus	Zielsetzung	Zielanalyt	Quantitative Analyse	Nicht invasiv	Besonderes	Quelle
Transmissionspektroskopie	346-1038	<i>Spirulina</i> sp.	Quantifizierung intrazellulärer Carotinoide anhand von Transmissionsspektren	Carotinoide	Ja, da Carotinoide mit einem mittleren Vorhersagefehler von 0,24 mg l ⁻¹ (R ² = 0,96) vorhergesagt wurden	Nein, da Proben der Hauptkulturen genommen wurden (Die Messungen wären theoretisch aber auch direkt in Kultursuspensionen möglich)	Regression anhand von 5 ausgewählten Wellenlängen ergab minimal besseren Vorhersagefehler (RMSEP = 0,23 mg l ⁻¹ ; R ² = 0,96) als jene anhand von Vollspektren	Shao <i>et al.</i> , 2015a
Transmissionspektroskopie und hyperspektroale Reflexionsmessungen	400-1050	<i>Chlorella</i> sp.	Vorhersage und räumliche 2D-Visualisierung der Lipidakkumulation in Mikroalgenpopulationen	Lipide	Ja, da Lipidkonzentrationen von 16,4 bis 32,7 % (w/w) mit einem RMSEP von 0,00245 % vorhergesagt wurden	Nein, da separate Proben vermessen wurden (Messungen wären theoretisch aber auch in situ anwendbar)	Regression nach hyperspektroalen Reflexionsmessungen ergaben ebenso gute Ergebnisse wie Transmissionspektroskopie	Wei <i>et al.</i> , 2016
Transmissionspektroskopie	346-1038	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Identifizierung von 4 Algenarten anhand ihrer Transmissionspektren	Keiner, nur Algenarten klassifiziert	Nein, da nur qualitative Unterscheidung verschiedener Algenarten (mit einer Trefferquote von durchschnittlich 85 %)	Nein, da Proben separat vermessen wurden (Der faser-gestützte Sensor-kopf wäre theoretisch aber auch in situ anwendbar)	Im Gegensatz zur Regression mit Vollspektren konnte die gezielte Auswahl einzelner Wellenlängen die Vorhersagegüte verschiedener Modelle verbessern. ELM-Modelle (extreme learning machine) waren besser als PLS-Regressionen	Zhu <i>et al.</i> , 2016
Hyperspektroale Reflexionsmessungen	380-1030 (davon 400-1000 als Grundlage für PLS)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Indirekte Identifikation von Herbiziden anhand der Hyperspektralsignaturen von Mikroalgen, die diesen Herbiziden ausgesetzt waren	Kein spezifischer, da indirekte Regression von Vollspektren	Nein, da nur die Art des applizierten Herbizids bestimmt wurde. Dies geschah mit einer Trefferquote von 86,7 % bei der Verwendung von Vollspektren	Nein, da Proben der Hauptkulturen genommen wurden (Die Messungen wären theoretisch aber auch direkt in Kultursuspensionen möglich)	Regressionen wurden lediglich anhand von variierenden Pigmentierungen erstellt und es fand keine direkt Quantifizierung irgendetwas Metabolites statt. Vollspektren-Regression mit gleicher Vorhersagegüte wie jene anhand von 7 einzelnen Wellenlängen	Shao <i>et al.</i> , 2016a; 2016b

Wie in der obigen Tabelle erkennbar, werden bereits seit einigen Jahrzehnten VIS-spektroskopische Untersuchungen an Mikroalgen und Cyanobakterien durchgeführt. Viele dieser Arbeiten beschäftigten sich mit der Identifikation von Algenarten und Kulturständen anhand von Extinktionsspektren, wobei zumeist Messungen an abfiltrierten oder anders entnommenen und teilweise getrockneten Proben stattfanden. Auch wurden viele Messungen an einzelnen Zellen mittels mikroskopischer Spektroskopietechniken durchgeführt. Nicht-invasive *In-situ*-Messungen sind generell nicht vorhanden. Es wurden verschiedene Regressionsverfahren eingesetzt und teilweise nur einzelne Wellenlängen als vereinfachte Regressionsgrundlage genutzt, wobei teilweise vorhandene Verbesserungen der Vorhersagegüten jedoch nicht konsistent beobachtet wurden. Hervorzuheben ist, dass viele Autoren mit Ableitungsspektren vierter Ordnung arbeiten, in welchen Extinktionsmaxima engbandiger sind und überlappende Absorptionen verschiedener Pigmente teilweise klarer voneinander separiert werden können. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass sich die meisten dieser Arbeiten eher mit der Identifizierung einzelner Proben anhand von Pigmentmustern beschäftigten als damit, einen konkreten Zielanalyt quantitativ zu bestimmen.

Dies geschah in den Arbeiten von Wei *et al.* (2016), in welcher Lipidkonzentrationen mit extremst geringen Vorhersagefehlern bestimmt wurden⁵, und von Shao *et al.* (2015a), in welcher Carotinoide mit einem Fehlerwert von $0,23 \text{ mg l}^{-1}$ ($R^2 = 0,96$) anhand von Transmissionsspektren quantifiziert wurden.

Insgesamt wurden somit zumeist Messungen an Proben durchgeführt, welche vorher aus laufenden Kulturen separiert wurden, *In-situ*-Messungen direkt in Anzuchtssystemen sind nicht gegeben.

2.2.4 NIR-Spektroskopie

Im Folgenden wird neben einer kurzen Einführung in die Schwingungsspektroskopie vor allem bisherigen Arbeiten zur Nah Infrarot-Spektroskopie (im Folgenden auch NIR-Spektroskopie bzw. NIRS genannt) Raum gegeben, in denen Untersuchungen an Mikroalgen bzw. Cyanobakterien durchgeführt wurden.

⁵ Die der Publikation entnommenen Vorhersagefehlerwerte scheinen etwas unrealistisch, da sie extremst gering waren und bei nur 0,015 % des vermessenen Wertebereiches ($\Delta_{\text{Lipidkonz.}} = 16,3 \%$) lagen.

2.2.4.1 Theoretische Grundlagen der NIR-Spektroskopie

Im Gegensatz zur Anregung von Elektronen auf höhere Energieniveaus, welche bei Absorption von elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren Spektralbereich zu beobachten ist, werden bei der Absorption von Photonen im NIR-Bereich Elektronen in höhere Schwingungsniveaus versetzt. Dies geschieht, wenn die Frequenzen von einzelnen (oder kombinierten) Molekülbindungen und Photon koinzidieren, so dass eine Energieübertragung vom Photon auf ein Molekül möglich ist. Durch diese Interaktion können je nach Anregungswellenlänge verschiedene Bindungsarten in Schwingung versetzt werden, wodurch sich molekülspezifische Absorptionsmuster ergeben. Da die Energiedifferenzen zwischen verschiedenen Schwingungsniveaus einzelner Molekülbindungen sehr gering sind, ergeben sich viele mögliche Anregungszustände bei Anregung mit nicht streng monochromatischer Strahlung. Dies führt zu breitbandigen Absorptionsbanden in gemessenen Spektren, welche sich zusätzlich mit Banden anderer Bindungen überlagern können. Auch Effekte wie Streuung treten im NIR-Bereich auf und addieren sich zur Absorption, was gerade bei der Vermessung wässriger Suspensionen zu breitbandigen Extinktionsspektren führt.

Für eine detaillierte Betrachtung der zugrunde liegenden Mechanismen von Strahlungsabsorption im NIR-Bereich sowie von Bandenzuordnungen sei auf entsprechende Grundlagenwerke verwiesen, so wie auf vertiefende Arbeiten wie z.B. von Workman & Weyer (2008).

2.2.4.2 Praktische Arbeiten zur NIR-Spektroskopie an phototrophen Mikroorganismen

In der folgenden Tabelle 2.6 sind Arbeiten zu quantitativen Analysen von Mikroalgen und Cyanobakterien mittels NIR-spektroskopischer Methoden aufgeführt. Im Fokus der Zusammenfassung stehen Arbeiten, die sich mit Inhaltsstoffanalysen befassen, bestenfalls nicht invasiv⁶ sind und zumeist verschiedene Regressionsmethoden wie PLS-Regressionen zur Konzentrations- bzw. Mengenvorhersage von Metaboliten befassen.

⁶ „Nicht invasiv“ bedeutet im Zuge dieser Zusammenfassung, dass die Messung ohne Eingriff in das Kultursystem erfolgte.

Tabelle 2.6: Bisherige Arbeiten zur NIR-spektroskopischen Analyse phototropher Mikroorganismen (I)

Mess- methodik	$\Delta\lambda_{\text{Mess}}$ (nm)	Untersucher Organismus	Zielsetzung	Zielanalyt	Quantitative Analyse	Nicht invasiv	Besonderes	Quelle
Reflexions- spektrosko- pie	400- 2500	<i>Laminaria hyperborea</i>	Quantifizierung intrazellulärer Algi- natgehalte	Alginat	Ja, da Alginatgehalte von 2,2 bis 40,8 Gewichtsprozent mit einem RMSEP von 2,07 % ($R^2 =$ unbekannt) vorher- gesagt wurden	Nein, da alle Proben gefrier- getrocknet wurden	Der RMSEP lag bei 2,07 % (w/w) obwohl der Fehler der Refe- renzanalytik laut Autoren bis zu ± 10 % betragen haben könnte	Horn <i>et al.</i> , 1999
Reflexions- spektrosko- pie	1100- 2500	<i>Sargassum flavicans</i>	Quantifizierung von intrazellulären Elementen und Metaboliten	Kohlen- stoff, Stick- stoff, Phlo- rotannine	Ja, da Kohlenstoff von 25,1 bis 28 Gewichtsprozent mit einem Vorher- sagefehler (SEP) von 0,31 Gewichts- prozent ($R^2 = 0,95$), Stickstoff von 0,6 bis 1,5 % bei einem SEP von 0,05 % (R^2 $= 0,98$) und Phlorotannine von 0,8 bis 5,6 % bei einem SEP von 0,49 % ($R^2 =$ 0,91) vorhergesagt wurden	Nein, da alle Proben gefrier- getrocknet und zermahlen wurden	-	Hay & Millers, 2010
Reflexions- spektrosko- pie	1100- 2500	<i>Nannochloropsis sp.</i> , <i>Chlorococcum sp.</i> , <i>Spirulina sp.</i> , unbe- kannte Diatomee	Quantifizierung von in 9 Konzentrations- stufen zugegebenen Stoffstandards	Zu Algen- pulver hinzuge- bene Trig- lyceride und Phos- pholipide	Ja, da extern hinzugegebene Triglyce- ride je nach Spezies mit einem RMSECV von 0,098 bis 0,144 Ge- wichtsprozent ($R^2 = 0,982 - 0,991$) und Phospholipide mit einem RMSECV von 0,148 bis 0,296 % ($R^2 = 0,915 - 0,980$) bestimmt wurden	Nein, da alle Proben gefrier- getrocknet und zermahlen wurden	In dieser Arbeit wurden nur extern hinzugegebene Triglyceri- de und Phospholipide quanti- fiziert, wobei interne Metabolit- gehalte vernachlässigt wurden	Laurens & Wolfrum, 2011
Reflexions- spektrosko- pie	1100- 2500	Konsortien aus fila- mentösen Grünalgen (<i>Rhizoclonium hiero- glyphicum</i> , <i>R. hiero- glyphicum</i> Kützing, <i>Microspora willleana</i> , <i>Ulothrix ozonata</i> Kütz, <i>Oedogonium sp.</i> u.a.	Quantifizierung intrazellulärer Me- tabolite anhand von NIR- und MIR- Reflexionsspektren	Asche-, Stickstoff und Phos- phorgehal- te, Zucker, Fettsäuren	Ja, da Asche- und Stickstoffgehalte mit einem mittleren Fehler von 0,041 % bzw. 0,846 % ($R^2 = 0,994$ bzw. 0,787) vorhergesagt wurden	Nein, da ge- trocknete und zermahlene Biomasse ver- messen wurde	Während Asche- und Stickstoff- gehalte anhand von NIR- Spektren vorhergesagt werden konnten, gelang dies für Lipid-, Phosphor- und Zuckergehalte nicht. Insgesamt lieferten NIR- und MIR-Spektren basierte Mo- delle ähnliche Vorhersagegütern	Mulbry <i>et al.</i> , 2012
Reflexions- messung	400- 2500	<i>Posidonia australis</i> (Seegras)	Entwicklung von NIR-Kalibrationen zur Vorhersage von Metabolitgehalten	Phenole, Stickstoff, Kohlenstoff	Ja, da Phenole mit einem Vorhersage- fehler von 0,77 ($R^2 = 0,90$) und Stick- stoff von 0,15 Gewichtsprozent ($R^2 =$ 0,90) vorhergesagt wurden	Nein, da Probe gefriergetrock- net und gemah- len wurde	Modified-PLS als Regressions- modell, da geringere Modellfeh- ler als mit PLS erhalten wurden	Bain <i>et al.</i> , 2013

Tabelle 2.6 (Forts.): Bisherige Arbeiten zur NIR-spektroskopischen Analyse phototropher Mikroorganismen (II)

Messmethodik	$\Delta\lambda_{\text{Mess}}$ (nm)	Untersuchter Organismus	Zielsetzung	Zielanalyt	Quantitative Analyse	Nicht invasiv	Besonderes	Quelle
Reflexions-spektroskopie	400-2500	<i>Chlorella</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Nannochloropsis</i> sp.	Bestimmung der Zusammensetzung von Algenbiomasse	Lipide, Proteine, Kohlenhydrate	Ja, da Lipide in einem Bereich von 6,8 bis 53 % der Trockenmasse mit einem Vorhersagefehler (RMSEP) von 3,64 % Trockenmasse, Kohlenhydrate von 9,5 bis 52,3 % mit einem RMSEP von 4,93 % und Proteine von 7,4 bis 42,5 % mit einem RMSEP von 2,11 % vorhergesagt wurden	Nein, da alle Proben gefriergetrocknet und zermahlen wurden	Mittels geeignetem Versuchsaufbau reichten geringe Probenmengen mg zur spektroskopischen Messung aus	Laurens & Wolfrum, 2013
Reflexions-spektroskopie	400-1050	<i>Spirulina platensis</i>	Vorhersage des Proteingehaltes in Spirulina-Pulver anhand von Transmissionspektren	Proteine	Ja, da Proteingehalte von 59,94 bis 64,37 % mit einem RMSEP von 0,181 % ($R^2 = 0,986$) vorhergesagt wurden	Nein, da getrocknetes Spirulinapulver vermessen wurde	Der RMSEP bei Verwendung von PLS-Regressionen war doppelt so hoch wie bei der Verwendung von support vector machine-Regression. Streulichtkorrekturen zeigten sich als die beste Datenvorbereitungsmethode	Wu et al., 2013
Reflexionsmessung	1100-1900	<i>Kirchneriella</i> sp., <i>Nannochloropsis</i> sp.	Quantifizierung von Mikroalgen-Biomasse und intrazellulären Lipidgehalten	Biomasse, Fettsäuren	Ja, da Fettsäuren mit einem Kreuzvalidierungsfehler (RMSECV) von 0,16 mg ($R^2 = 0,85$) vorhergesagt wurden	Nein, da Zellen filtriert und <i>In-situ</i> gemessen wurden	Erste Anwendung von NIR-Spektrometrie zur Vermessung von nicht-getrockneten Biofilmen (wodurch starke Wasser Signaturen in den Spektren enthalten waren)	Brown et al., 2014
Reflexionsmessung	300-1100-2500 (ex situ)	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Navicula</i> sp. 1, <i>Navicula</i> sp. 2, <i>Nitzschia pusilla</i>	Quantifizierung von Mikroalgen-Biomasse und Lipidgehalten	Biomasse, Fettsäuren	Ja, da z.B. <i>Chlorella</i> -Biomasse <i>in situ</i> (Messbereich 300-1100 nm) mit einem RMSECV von 0,32 g l ⁻¹ ($R^2 = 0,95$) und <i>ex situ</i> auf 0,28 (300-1100 nm; $R^2 = 0,96$) bzw 0,28 g l ⁻¹ (1100-2500 nm; $R^2 = 0,97$) vorhergesagt wurde. Lipidgehalte wurden <i>ex situ</i> an getrockneten Proben (je nach Spezies) auf 0,011 - 0,089 g l ⁻¹ ($R^2 = 0,63 - 0,85$) genau bestimmt	Jein, da zumindest teilweise <i>In-situ</i> Messungen in Kulturgefäßen stattfanden, die meisten Proben jedoch getrocknet wurden	Die Modelle waren nur unter sehr definierten Kulturbedingungen stabil. Diverse Datenvorbehandlungen ergaben inkonsistente Ergebnisse, weshalb Rohspektren genutzt wurden	Challagulla et al., 2014

Tabelle 2.6 (Forts.): Bisherige Arbeiten zur NIR-spektroskopischen Analyse phototropher Mikroorganismen (III)

Messmethodik	$\Delta\lambda_{\text{Mess}}$ (nm)	Untersuchter Organismus	Zielsetzung	Ziel-analyt	Quantitative Analyse	Nicht invasiv	Besonderes	Quelle
Reflexions-spektroskopie	1000-2500	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella protothecoides</i> , <i>Chlorella zoffingensis</i>	Quantifizierung von intrazellulären Fettsäuren und ihrer Zusammensetzung	Fettsäuren	Ja, da Gesamtfettsäuregehalte von 233,76 bis 446,49 mg g Trockenmasse ⁻¹ mit einem Kreuzvalidierungsfehler von 7,15 mg g Trockenmasse ⁻¹ ($R^2 = 0,994$) bestimmt wurden	Nein, da gefriergetrocknete Proben vermessen wurden	Eine Regression mit eingeschränktem Wellenlängenbereich (1030-1500 plus 1600-1880 nm) ergab einen verringerten Vorhersagefehler von 5,28 mg g TM ⁻¹	Liu <i>et al.</i> , 2015
Transmissions-spektroskopie	346-1038	<i>Spirulina</i> sp.	Quantifizierung intrazellulärer Carotinoide anhand von Transmissionspektren	Carotinoide	Ja, da Carotinoide mit einem mittleren Vorhersagefehler von 0,24 mg l ⁻¹ ($R^2 = 0,96$) vorhergesagt wurden	Ja, da zwar Proben der Hauptkulturen genommen wurden, die Messungen theoretisch aber auch direkt in Kultursuspensionen möglich wären	Regression anhand von 5 ausgewählten Wellenlängen ergab minimal besseren Vorhersagefehler (RMSEP = 0,23 mg l ⁻¹ ; $R^2 = 0,96$) als jene anhand von Vollspektren	Shao <i>et al.</i> , 2015a
Transmissions- und Reflexions-spektroskopie	1100-2500	<i>Rhopalosolen saccatus</i>	Quantifizierung von Mikroalgen-Biomasse und Lipidgehalten sowie deren Zusammensetzung	Fettsäuren	Ja, da Biomasse in Reflexionsmessungen an getrockneten Proben mit einem RMSECV von 199,1 mg l ⁻¹ ($R^2 = 0,93$) und in Transmissionsmessungen an Kultursuspension auf 192,5 mg l ⁻¹ ($R^2 = 0,93$) vorhergesagt wurde. Absolute Lipidgehalte wurden in Reflexion mit einem RMSECV von 112,3 ($R^2 = 0,86$) und in Transmission auf 131,9 mg l ⁻¹ ($R^2 = 0,81$) genau bestimmt	Nein, da Proben der Kultursuspension entnommen wurden und diese zumeist getrocknet wurden	Während Biomasse und Gesamtlipidgehalte gut vorhergesagt werden konnten, lieferten Modelle zur quantitativen Vorhersage einzelner Fettsäuren schlechte Vorhersagen	Challagulla <i>et al.</i> , 2016
(abgeschwächte Total-) Reflexions-spektroskopie	1000-2500-19048		Quantifizierung von Lipiden, Proteinen sowie Energie- und Aschegehalten	Fette, Proteine, Aschegehalte	Ja, de im NIR-Bereich Lipide auf 20,2 g kg ⁻¹ ($R^2 = 0,73$), Proteine auf 3,57 % ($R^2 = 0,90$), Energiegehalte auf 2,21 kJ g ⁻¹ ($R^2 = 0,57$) und Aschegehalte auf 7,42 % ($R^2 = 0,70$) genau vorhergesagt wurden. Im MIR-Bereich wurden jeweils Fehler von 22,4 ($R^2 = 0,70$), 4,2 % ($R^2 = 0,85$), 1,86 kJ g ⁻¹ ($R^2 = 0,59$) sowie 7,71 % (0,68) erreicht	Nein, da gefriergetrocknete, vermahlene Proben vermessen wurden	Modelle die anhand von NIR-Spektren erstellt wurden zeigten leicht geringere Fehler als auf MIR-Spektren basierte Modelle	Ge & Thomasson, 2016

Tabelle 2.6 (Forts.): Bisherige Arbeiten zur NIR-spektroskopischen Analyse phototropher Mikroorganismen (IV)

Messmethodik	$\Delta\lambda_{\text{mess.}}$ (nm)	Untersucher Organismus	Zielsetzung	Zielanalyt	Quantitative Analyse	Nicht invasiv	Besonderes	Quelle
Reflexions-spektroskopie	1000-2500	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Quantifizierung von intrazellulären Astaxanthingehalten	Algenmassen, Astaxanthin	Ja, da Trockenmassen von 1 bis 5,5 mg mit einem Vorhersagefehler von 0,254 mg ($R^2 = 0,979$) und Astaxanthinergehalte von 8 bis 155 μg mit einem Fehler von 6,12 μg ($R^2 = 0,988$) vorhergesagt wurden	Nein, da Proben genommen und diese auf Quarzglas aufgebracht wurden	Multiple Streulichtkorrektur als beste Methode zur Vorbehandlung der Rohspektren identifiziert	Liu et al., 2016
Hyperspektromessungen	380-1030 (davon 400-1000 als Grundlage für PLS)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Indirekte Identifikation von Herbiziden anhand der Hyper-sketralsignaturen von Mikroalgen, die diesen Herbiziden ausgesetzt waren	Kein spezifischer, da indirekte Regression von Vollspektren	Nein, da nur die Art des applizierten Herbizids bestimmt wurde. Dies geschah mit einer Trefferquote von 86,7 % bei der Verwendung von Vollspektren	Ja, da zwar Proben der Hauptkulturen genommen wurden, die Messungen theoretisch aber auch direkt an Kultursuspensionen möglich wären	Regressionen wurden lediglich anhand von variierenden Pigmentierungen erstellt und es fand keine direkt Quantifizierung irgendeines Metabolites statt. Vollspektren-Regression mit gleicher Vorhersagegüte wie jene anhand von 7 einzelnen Wellenlängen	Shao et al., 2016a; 2016b
Transmissionspektroskopie	325-1075 bzw. 380-1030 hyperspektromessung	<i>Chlorella</i> sp.	Vorhersage und räumliche Visualisierung der Lipidakkumulation in Mikroalgenpopulationen	Lipide	Ja, da Lipidkonzentrationen von 16,4 bis 32,7 % mit einem RMSEP von 0,00245 % vorhergesagt wurden	Ja, da Proben separat vermessen, Messungen theoretisch aber auch <i>in situ</i> anwendbar wären	Regression nach hyperspektralen Reflexionsmessungen ergaben ebenso gute Ergebnisse wie Transmissionspektroskopie	Wei et al., 2016
Transmissionspektroskopie	346-1038	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Identifizierung von 4 Algenarten anhand ihrer Transmissionspektren	Keiner, nur Algenarten klassifiziert	Nein, da nur qualitative Unterscheidung verschiedener Algenarten (mit einer Trefferquote von durchschnittlich 85 %)	Ja, da Proben separat vermessen, fasergestützter Sensorkopf aber auch <i>in situ</i> anwendbar wäre	Im Gegensatz zur Regression mit Vollspektren konnte die gezielte Auswahl einzelner Wellenlängen die Vorhersagegüte verschiedener Modelle verbessern. ELM-Modelle (extreme learning machine) waren besser als PLS-Regressionen	Zhu et al., 2016

Wie aus der vorherigen Tabelle ersichtlich, gibt es eine Vielzahl an Arbeiten, zu NIR-spektroskopische Messungen an getrockneten und vermahlenden Algenproben. Es wurden dabei verschiedenste Zielanalyte untersucht und mittels chemometrischer Methoden quantifiziert bzw. Analytkonzentrationen in unbekanntem Proben mittels chemometrischer Methoden vorhergesagt. Auffällig oft werden hierbei PLS-Regressionen verwendet und mit verschiedensten Datenvorbehandlungen kombiniert.

Einige grundlegende Erkenntnisse, die sich aus den oben aufgeführten Arbeiten ergeben sind:

- NIR-spektroskopische Messungen wurden meist an getrockneten Proben durchgeführt
- Überwiegend wurden Reflexionsmessungen durchgeführt
- Nur äußerst wenige Messungen wurden im kurzwelligen NIR-Bereich durchgeführt
- Wellenlängenbereiche von 1100 bis 2500 Nanometern wurden vermehrt genutzt
- Vorhersage von Proteinkonzentrationen bis auf 0,181 % (w/w) genau; von Lipiden bis auf 3,64 % (w/w) sowie 11 bzw. 0,16 mg l⁻¹ genau; von Kohlenhydraten bis auf 4,93 % (w/w) genau und von Stickstoffgehalten bis auf 0,846 % (w/w)
- Weitere Metabolite wie Alginat wurden bis auf 2,07 % (w/w) genau vorhergesagt
- Pigmente wie Carotinoide wurden auf 0,24 mg l⁻¹ oder gar 6,12 µg genau vorhergesagt
- Häufige Anwendung von PLS-Regression in Kombination mit Datenvorbehandlungen
- Oftmals inkonsistente Auswirkungen von Vorbehandlungen auf Modellgüten
- Wahl der Regressionsmethode hat (teilweise) starke Auswirkung auf die Vorhersagegenauigkeit

Ein direkter Vergleich beispielsweise von Vorhersagefehlern ist aufgrund der verschiedenen Versuchssetups und Auswertungsmethoden zwar schwierig, es wurde jedoch insgesamt gezeigt, dass verschiedenste Inhaltsstoffe mit Genauigkeiten im Milligramm-pro-Liter-Bereich mittels NIR-Spektroskopie quantifiziert werden können. Wie von Horn *et al.* (1999) bemerkt, kann dabei der Vorhersagefehler sogar kleiner sein als der Fehler einer referenzanalytischen Methode. Auch Messungen an stark wasserhaltigen Proben wurden dabei durchgeführt (Brown *et al.*, 2014) und dieselben Autoren berichten sogar von Vorversuchen zu Transmissionsmessungen in Küvetten.

Wie in den beschriebenen Arbeiten zu erkennen, sind *In-situ*-Messungen direkt in Anzuchtssystemen zwar theoretisch möglich, wurden in der Praxis bisher jedoch nicht umgesetzt.

2.2.5 VIS-Polarisationsspektroskopie

Zum besseren Verständnis der im Ergebnisteil beschriebenen Beobachtungen, sowie zur fundierten Einordnung der Diskussion derselben, sei zunächst eine Einführung in die der Polarisationsspektroskopie zugrunde liegenden Mechanismen gegeben, bevor auf bisherige Forschungsarbeiten zu dem Thema eingegangen wird.

2.2.5.1 Theoretische Grundlagen der VIS-Polarisationsspektroskopie

Mit dem Wort Polarisation wird generell die Schwingungsrichtung einer (elektromagnetischen) Welle beschrieben welche immer senkrecht zur Ausbreitungsrichtung steht. Während „natürliches Licht“ stets eine ungeordnete Mischung aus Photonen unterschiedlichster Schwingungsrichtungen ist, ist polarisiertes Licht eine „geordnete“ Strahlung, innerhalb derer alle Photonen mit hoher Wahrscheinlichkeit dieselbe Schwingungsrichtung besitzen.

Dies ist in Abbildung 2.6 dargestellt, in der im rechten Bildteil eine Mischung von Photonen angedeutet ist, deren elektrische Feldvektoren in alle Raumrichtungen oszillieren, d.h. die verschiedenste Polarisationsrichtungen besitzen.

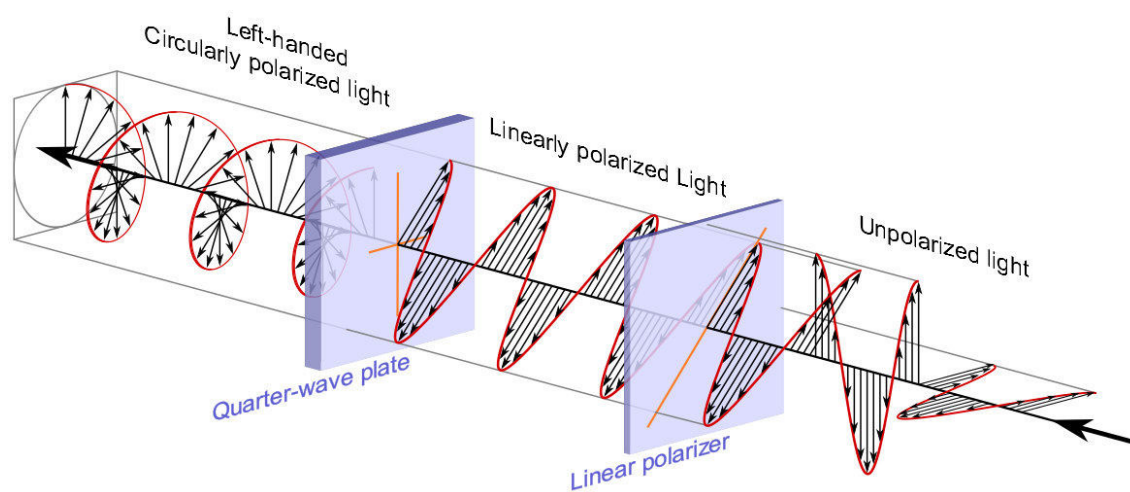


Abbildung 2.6: Übersicht einiger möglicher Polarisationsrichtungen von Photonen.
(Quelle: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/84/Circular.Polarization.Circularly.Polarized.Light_Circular.Polarizer_Creating.Left.Handed.Helix.View.svg)

Mittels Polarisationsfiltern können aus dieser ungeordneten Strahlung bestimmte Anteile selektiv herausgefiltert werden. Dies ist im mittleren Bildteil sichtbar, wo lediglich solche Photonen vorhanden sind, welche in derselben Raumebene schwingen. Diese linear polarisierte Strahlung kann dabei auch als Überlagerung zweier gegensätzlich

zirkular oszillierender Wellen angesehen werden. Aus dieser überlagerten Welle, kann mit Hilfe geeigneter polarisationsmodulierender Optiken einseitig drehend zirkular polarisiertes Licht hergestellt werden, welches im linken Bildteil sichtbar ist.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass linear polarisierte Strahlung sowohl als Überlagerung zweier, im Winkel von 90° zueinander stehenden, linearen Wellen betrachtet werden kann, als auch als Überlagerung zweier gegenläufig oszillierender zirkular polarisierter Wellen, welche jeweils in gleicher Phase zueinander schwingen. Dies ist in Abbildung 2.7 dargestellt, wobei im oberen Bildteil die Dekomposition in lineare Trajektorien und im unteren Bildteil jene in zirkulare gezeigt ist.

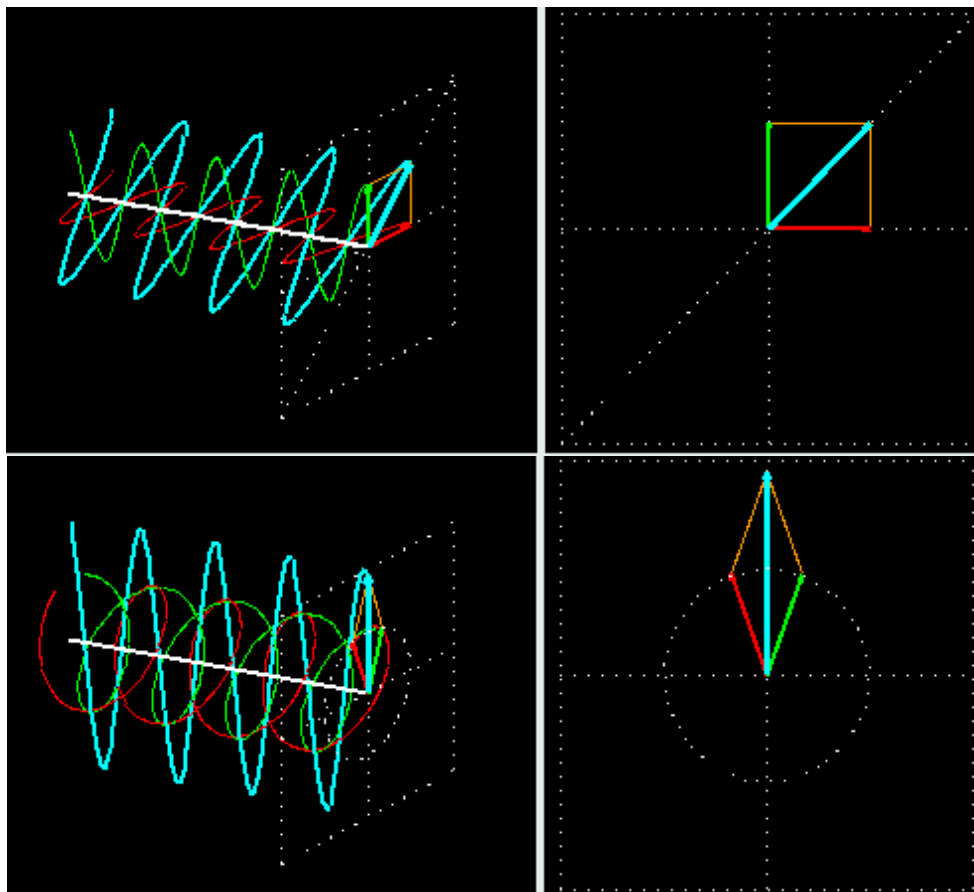


Abbildung 2.7: Darstellung einer linear polarisierten Strahlung als Überlagerung zweier Strahlen differierender Polarisation. Oben: Überlagerung von senkrecht zueinander schwingenden linear Polarisierten Wellen. Unten: Überlagerung von gegenläufig zueinander zirkular oszillierenden Wellen. In allen Bildteilen sind jeweils in rot bzw. grün die kombinierenden Wellen, in hellblau die resultierende Welle eingezeichnet. Im linken Bildteil sind jeweils sich im Raum ausbreitende Wellen skizziert, im rechten die Darstellung der Intensitäten der elektrischen Feldvektoren am Ort der im linken Bildteil eingezeichneten Ebene. Die im rechten Bildteil gepunktet dargestellten Linien entsprechen den „Enden“ der jeweiligen Feldvektoren bzw. der von ihnen beschriebenen Trajektorien. (Quelle: András Szilágyi; http://cddemo.szialab.org/index_de.html; Abgerufen am 07.01.2016)

Es sei an dieser Stelle auch darauf hingewiesen, dass die in den Abbildungen eingezeichneten Linien lediglich mögliche (mathematische) Dekompositionen von Polarisationszuständen eines Photons zeigen, welche dieses zur selben Zeit beinhalten kann.

Treffen Photonen auf Materie, kommt es zu Wechselwirkungen, von denen besonders die Absorption im Folgenden betrachtet werden soll. Abhängig von den molekularen, sowie den makroskopischen Eigenschaften der wechselwirkenden Materie werden Photonen mit verschiedenen Energiegehalten unterschiedlich stark absorbiert. Neben der wellenlängenabhängigen Absorption, welche beispielsweise im Fall von Pigmenten zu charakteristischen Absorptionsmustern führt, ist das Absorptionsverhalten unter anderem durch die Polarisations-eigenschaften der einfallenden Strahlung determiniert. Dies hängt damit zusammen, dass bestimmte Materialien räumliche Abhängigkeiten der Absorptionsintensität der elektrischen Feldvektoren zeigen, was nichts anderes bedeutet, als dass in verschiedene Raumrichtungen oszillierende Wellen unterschiedlich stark absorbiert werden. Je nach Polarisationsgrad kommt es beim Auftreffen der Strahlung zu unterschiedlichen Effekten, welche anhand der folgenden Darstellungen kurz erläutert werden sollen:

Im Falle des Durchgangs durch ein Medium mit einem höheren Brechungsindex als Luft sind innerhalb des Mediums kürzere Wellenlängen beobachtbar, welche nach Austritt aus diesem Medium wieder ihre ursprüngliche Länge aufweisen (siehe Abbildung 2.8). Gleichzeitig sinkt (zumindest in der gezeigten Raumebene!) die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Photonen im Vergleich zum bisher umgebenden Medium.

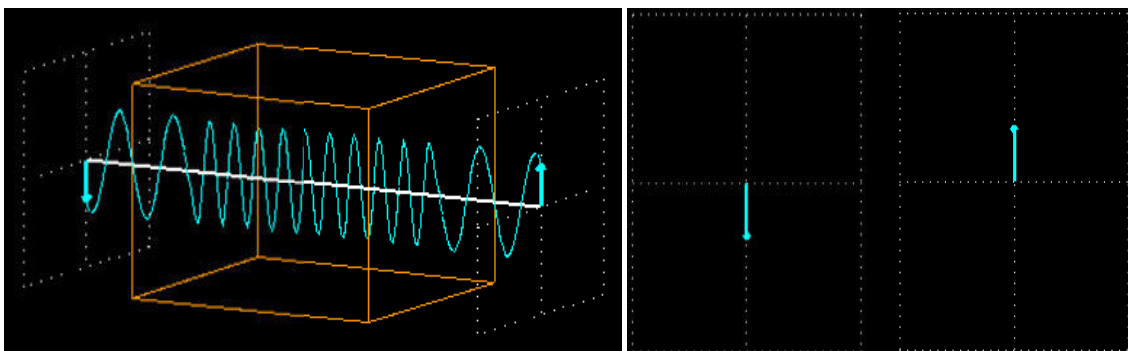


Abbildung 2.8: Verhalten einer linear polarisierten Welle beim Durchgang durch ein Medium mit erhöhtem Brechungsindex relativ zum umgebenden Medium. Im linken Bildteil ist erneut die Welle im Raum, sowie in Orange der Körper mit erhöhtem Brechungsindex. Im rechten Bildteil sind die Intensitäten der elektrischen Feldvektoren am Ort der im linken Bildteil eingezeichneten Ebenen zu sehen. (Quelle: András Szilágy; http://cddemo.szialab.org/index_de.html; Abgerufen am 07.01.2016)

Hierdurch kommt es zu einer (je nach Materialdicke mehr oder weniger stark ausgeprägten) Phasenverschiebung der Wellenmaxima. Das gleiche Prinzip gilt auch für zirkular polarisierte Wellen in isotropen Körpern, so wie in Abbildung 2.9 dargestellt.

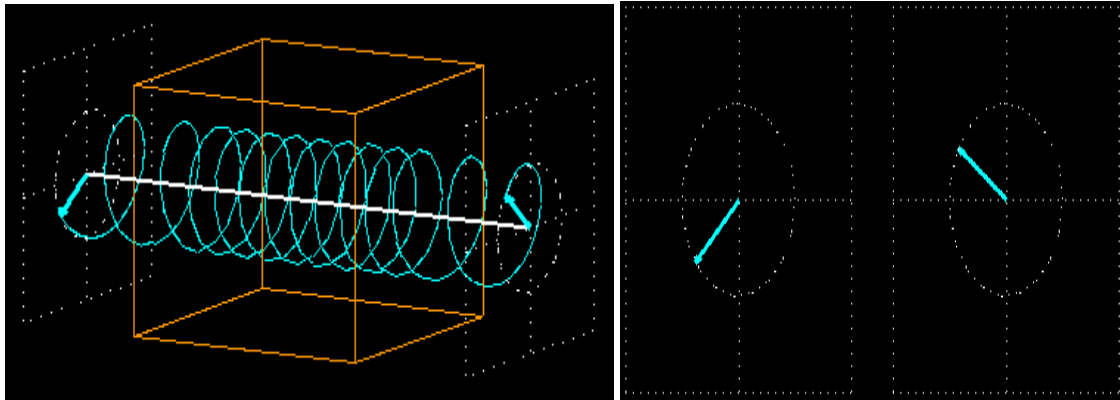


Abbildung 2.9: Verhalten einer zirkular polarisierten Welle beim Durchgang durch ein Medium mit erhöhtem Brechungsindex relativ zum umgebenden Medium. Im linken Bildteil ist erneut die Welle im Raum, sowie in Orange der Körper mit erhöhtem Brechungsindex. Im rechten Bildteil sind die Intensitäten der elektrischen Feldvektoren am Ort der im linken Bildteil eingezeichneten Ebenen zu sehen. (Quelle: András Szilágyi; http://cddemo.szialab.org/index_de.html; Abgerufen am 07.01.2016)

Diese selektive Phasenverzögerung einzelner Polarisationsrichtungen wird unter anderem bei der Erzeugung zirkular polarisierter Strahlung ausgenutzt.

Passiert (polarisierte) Strahlung isotrope Medien, in denen sie absorbiert wird, führt dies nicht zu einer Phasenverschiebung, sondern lediglich zu einer Verringerung der Strahlungsintensität, so wie in Abbildung 2.10 dargestellt.

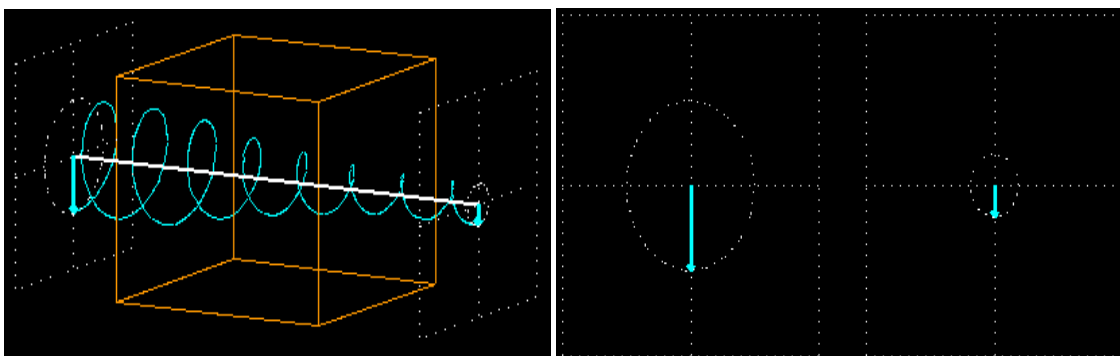


Abbildung 2.10: Verhalten der Strahlungsintensität einer zirkular polarisierten Welle bei Durchquerung eines absorbierenden Mediums. Im linken Bildteil ist erneut die Welle im Raum dargestellt. Im rechten Bildteil sind die Intensitäten der elektrischen Feldvektoren am Ort der im linken Bildteil eingezeichneten Ebenen zu sehen. (Quelle: András Szilágyi; http://cddemo.szialab.org/index_de.html; Abgerufen am 07.01.2016)

Dies bedeutet nichts anderes, als dass einzelne Photonen absorbiert und in andere Energieformen (z.B. Wärme) umgewandelt bzw. als solche wieder abgegeben werden. Dieses Absorptionsverhalten kann sich dabei in Abhängigkeit der räumlichen Struktur eines Stoffes für zirkular linksdrehende und zirkular rechtsdrehende Strahlung in seiner Intensität durchaus unterscheiden (Drake, 1986). Die hieraus entstehenden Zirkulardichroismen (circular dichroism, CD), welche an chiralen Molekülen bzw. aus ihnen aufgebauten Polymeren messbar sind, sind dabei wellenlängenabhängig und werden oftmals zur Charakterisierung von biologischen Strukturen wie beispielsweise Pigmentkomplexen genutzt (Georgakopoulou *et al.*, 2006). Erwähnt sei an dieser Stelle, dass Circulardichroismen in ihrer Intensität generell geringer ausgeprägt sind als Lineardichroismen (Drake, 1986; Kaminsky, 2000). Jedoch ist vor allem die in Abbildung 2.11 dargestellte Nichtnotwendigkeit der exakten Winkeleinstellung bei der Aufnahme von Circulardichroismen vorteilhaft für die generelle Messung von Dichroismen in chaotisch organisierten Proben wie den in dieser Arbeit vermessenen Suspensionen phototropher Mikroorganismen, welche daraus resultiert, dass die Händigkeit chiraler Moleküle dieselbe bleibt, unabhängig vom gewählten Betrachtungswinkel (Garab & Van Amerongen, 2009).

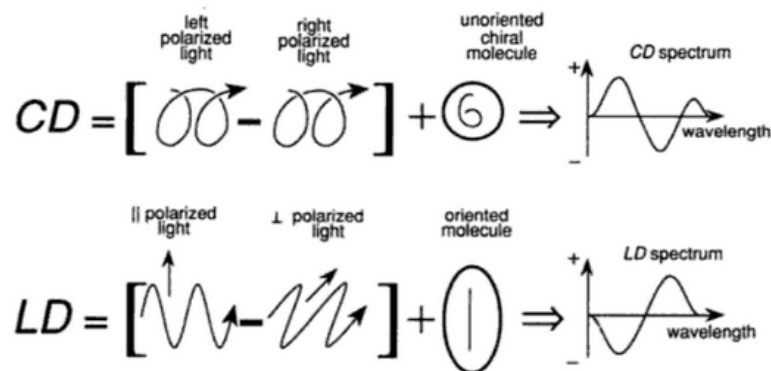


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der Voraussetzungen bei der Messung von linearen (LD) und zirkularen (CD) Dichroismen. (Quelle: Rodger & Nordén, 1997, S. 1)

Führen wir uns nun erneut vor Augen, dass wir zirkulare Polarisation als Überlagerung zweier linear polarisierter Wellen betrachten können, sowie eine lineare Polarisation als Überlagerung von zwei sich gegenläufig drehenden zirkularen Einzelwellen. Nun lassen sich durch Kombinationen der oben beschriebenen Effekte bei Wechselwirkun-

gen von elektromagnetischer Strahlung mit Materie auch komplexere Szenarien, wie das in Abbildung 2.12 dargestellte, erklären. Hierbei trifft ein linear polarisiertes Photon auf ein Medium, welches sowohl einen Circular dichroismus aufweist, als auch eine Phasenverschiebung einer zirkularen Einzelwelle bewirkt.

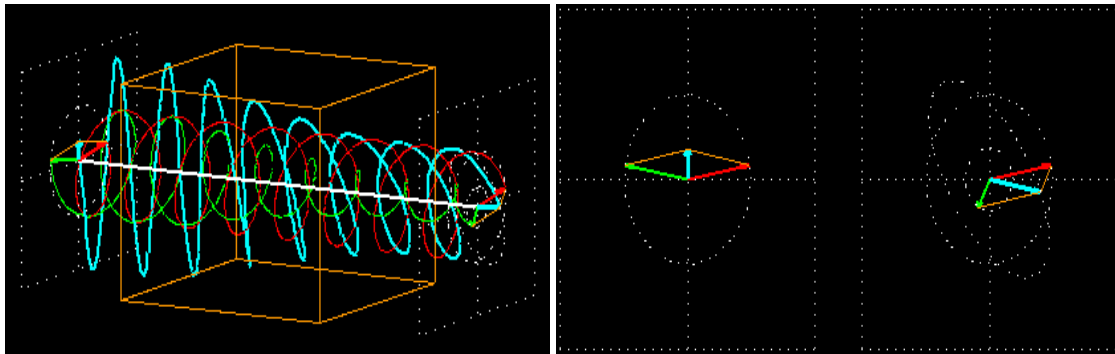


Abbildung 2.12: Verhalten eines linear polarisierten Lichtstrahls bei der Durchquerung eines Mediums, welches sowohl absorbiert als auch brechend wirkt. Im linken Bildteil ist in rot die nicht-beeinflusste zirkulare Teilwelle, in grün die verlangsamte und abgeschwächte zirkulare Teilwelle, sowie in hellblau die resultierende lineare Welle eingezeichnet. Im rechten Bildteil sind die Intensitäten der jeweiligen Feldvektoren am Ort der im linken Bildteil eingezeichneten eben zu sehen. (Quelle: András Szilágyi; http://cddemo.szialab.org/index_de.html; Abgerufen am 07.01.2016)

Als Resultat dieser kombinierten Wechselwirkungen entsteht ein elliptisch polarisiertes Photon. Die gekippte Achse ist dabei auf zirkulare Doppelbrechung (unterschiedlicher Brechungsindex bei rechts- und linksdrehender Polarisation) und die Elliptizität auf einen Circular dichroismus (unterschiedliche Absorption bei rechts- oder linksdrehender Polarisation) zurückzuführen. Die hier genannten Eigenschaften von polarisierter elektromagnetischer Strahlung, sowie die sich daraus ergebenden Konsequenzen bei der Wechselwirkung mit Materie werden im Diskussionsteil dieser Arbeit erneut aufgegriffen. Für weitere Informationen zu phänomenologischen Aspekten der Entstehung von Circular dichroismen sowie zu experimentellen Fallstricken bei ihrer Vermessung sei auf Kaminsky (2000) verwiesen.

2.2.5.2 Praktische Arbeiten zur VIS-Polarisationsspektroskopie an phototrophen Mikroorganismen

Während die Polarisationsspektroskopie seit vielen Jahrzehnten praktische Anwendung in der Analyse von Biomolekülen findet, werden vor allem Proteinkonformationen und ihre resultierende biologische Wirkung untersucht (beispielsweise von Chen

et al., 1972), wobei zumeist Lösungen einzelner aufgereinigter Stoffe analysiert werden und selten *In-vivo*-Messungen stattfinden. Dies ist aufgrund der großen Vielzahl unterschiedlicher Biomoleküle in lebenden Zellen nachvollziehbar, da dort die Aufnahme einzelner Zielanalytinformationen durch andere Stoffe erheblich gestört werden können. Dies erklärt auch, weshalb es bisher wenige Arbeiten zur *In-vivo*-Quantifizierung von Stoffen mittels Polarisationspektroskopie gibt. Ist als Anforderung zudem eine *In-situ*-Detektion und -Quantifizierung von Analyten ohne vorherige Entnahme und Aufarbeitung von biologischen Proben gewünscht, tauchen durch weitere Versuchseinflüsse (beispielsweise die Materialien von Bioreaktorwänden, Bestandteile von Anzuchtmedien, etc.) auch weitere Probleme auf, die einen *In-situ*-Einsatz von polarisationsspektroskopischen Analysemethoden erschweren.

In der folgenden Tabelle 2.7 sind bisher publizierte Arbeiten aufgeführt, in denen VIS-polarisationsspektroskopische Methoden in der Analyse von photoautotrophen Mikroorganismen zur Anwendung kamen.

Tabelle 2.7: Bisherige Arbeiten zu VIS-polarisationsspektroskopischen Analysen phototropher Mikroorganismen mit dem Schwerpunkt auf solchen Arbeiten, in denen Circular dichroismen untersucht wurden. CD: Circular dichroism (Circulardichroismus); LD: Linear dichroism (Lineardichroismus)

Methode	Untersuchter Organismus	Zielsetzung	Quantitative oder qualitative Analyse	Nicht-Invasivität	Quelle
VIS-LD	Mikroalgen, Thylakoide und isolierte Proteinkomplexe	Aufnahme von LD-Spektren in gereckten Polyvinyl-Matrizes	Qualitativer Vergleich mit anderen Methoden zur (Zell-) Ausrichtung für LD-Analysen	Semi-invasiv, da u.a. ganze Zellen vermessen wurden	Biggins & Svejksky, 1980
VIS-CD	Phycobilisomen von <i>F. diplosiphon</i>	Untersuchung von Proteinkomplex-Dissoziierungen	Qualitativ & quantitativ durch Berechnung differentieller CD-Spektren	Invasiv durch Phycobilisomaufreinigung	Rigbi <i>et al.</i> , 1980
VIS-CD	<i>Phyllophora antarctica</i>	Charakterisierung eines neu entdeckten Pigments	Qualitative Analyse der CD-Spektren zum Vergleich mit anderen Pigmenten	Invasiv, da Proteine extrahiert und selektiv aufgereinigt wurden	MacColl <i>et al.</i> , 1996
VIS-CD	Cyanobakterien, Rotalgen und Cryptomonaden	Analyse der Struktur von Biliproteinen	Qualitative Aufklärung der räumlichen Struktur	Invasiv durch Extraktion der Analyte vor ihrer Untersuchung	MacColl <i>et al.</i> , 1999

Methode	Untersucher Organismus	Zielsetzung	Quantitative oder qualitative Analyse	Nicht-Invasivität	Quelle
VIS-LD	<i>Synechococcus elongatus</i>	Untersuchung der intrazellulären β -Carotin-Orientierung	Qualitative Analyse von Carotinoid-Orientierung	Invasiv, da Photosystem-Proteinkomplexe Extrahiert wurden	Bialek-Bylka <i>et al.</i> , 2000
VIS-LD & VIS-CD	<i>Mantoniella squamata</i>	Strukturelle Organisation von Pigmentmolekülen in LHC-Komplexen	Quantitative Aufklärung von Orientierungswinkeln einzelner Pigmente im Photosyntheseparat	Invasiv durch Probennahme und Isolierung von LHC-Komplexen	Goss <i>et al.</i> , 2000
VIS/NIR-CD	LHC I von Purpurbakterien	Einfluss verschiedener Carotinoide auf CD-Spektren	Semi-quantitative Betrachtung der Intensitätsverhältnisse von Banden	Invasiv durch Präparation der LHC I-Komplexe	Georgakopoulou <i>et al.</i> , 2006
VIS-CD	Phytochrome aus transgenen Bakterien	Strukturaufklärung verschiedener Phytochrome	Qualitativ	Invasiv durch Proteinexpression/-extraktion in/aus Bakterien	Rockwell <i>et al.</i> , 2009
VIS-CD	Cyanobakterien und Halobakterien	Aufnahme Polarisations sensitiver Fernerkundungsdaten von fremden Planeten	Qualitative Detektion von pigmentbedingten polarisierten Reflexionssignalen	Komplett nicht-invasiv	Sparks <i>et al.</i> , 2009
VIS-LD & VIS-CD	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> und <i>Cyclotella meneghiniana</i>	Funktionale Analyse von Fucoxanthinen durch LD & CD Messungen in gepresstem Polyacrylamidgel	Semi-quantitativ durch direkten Vergleich von Fucoxanthinleveln unter verschiedenen Lichtbedingungen	Invasiv, da u.a. zwar ganze Zellen vermessen wurden, das verwendete Gel jedoch phytotoxisch ist	Szabó <i>et al.</i> , 2010
VIS-CD	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Untersuchung struktureller & funktioneller Änderungen am Photosystem I	Qualitative Veränderung der CD-Spektren unter Eisenmangel	Invasiv, da isolierte LHC I-Komplexe untersucht wurden	Yadavalli <i>et al.</i> , 2012
UV-CD	Diverse Cyanobakterienstämme	Charakterisierung von zellulären Exopolysacchariden	Qualitative Untersuchung von UV-CD-Spektren bei variablem pH	Invasiv durch Probennahme und Zellabtrennung	Di Pippo <i>et al.</i> , 2013
VIS-CD	Diverse eukaryotische Algenarten	Detektion von Konformationsänderungen von Phytochromen	Qualitativ	Invasiv durch Phytochromextraktion	Rockwell <i>et al.</i> , 2014

Bezüglich der VIS-CD-Spektroskopie könnten an dieser Stelle noch weitere Quellen wie Shubin *et al.* (1993), Engelmann *et al.* (2001), Andrizhiyevskaya *et al.* (2002), Årsköld *et al.* (2003), Morton *et al.* (2015) und andere genannt werden, jedoch beschäftigen sich alle diese Veröffentlichungen mit fixierten⁷ und ausgerichteten ganzen Zellen, aufgereinigten Lichtsammel- oder anderen Proteinkomplexen oder anderen aufgereinigten Molekülen, was in keinsten Weise als nicht-invasiv gelten kann und deshalb hier nicht weiter ausgeführt wird. Systematische Studien welche sich mit den Circular dichroismen von Algenzellen die von Spezies zu Spezies variieren sollten (Garab & Van Amerongen, 2009) beschäftigen, sind bis dato nicht durchgeführt worden.

Neben der polarisationssensitiven Aufnahme von Extinktionssignalen können auch aus Streulichtanteilen in photometrischen Analysen erheblich mehr (Struktur-) Informationen extrahiert werden, wenn auch ihre Polarisations-eigenschaften analysiert werden als alleine ihre Intensität (Tinoco & Keller, 1983). Dies war jedoch in dieser Arbeit nicht praktikabel und soll deshalb im Weiteren nicht erörtert werden. Gleiches gilt für die Aufnahme von (polarisationssensitiven) Fluoreszenzspektren wie beispielsweise von Skandary *et al.* (2015) beschrieben.

2.2.6 NIR-Polarisationsspektroskopie

In diesem Teil werden vor allem bisherige Anwendungen erörtert.

2.2.6.1 Theoretische Grundlagen der NIR-Polarisationsspektroskopie

Um Dopplungen zu vermeiden, sei an dieser Stelle lediglich auf die für den VIS-Bereich herausgearbeiteten Grundlagen aus Abschnitt 2.2.5.1 verwiesen werden, da die zugrunde liegenden Effekte der polarisationsabhängigen differentiellen Wechselwirkungen von elektromagnetischer Strahlung und Materie prinzipiell auch im NIR gültig sind. Einzig unterscheidend ist, dass lediglich polarisationsabhängig Molekülschwingungen anstatt von elektronischen Übergängen detektiert werden, weshalb im Folgenden auch von Vibrationscirculardichroismen (VCD; vibrational circular dichroism) gesprochen wird.

⁷ Hierbei sei zu erwähnen, dass bei der Verwendung von acrylamidhaltigen Gelen die Fixierung selbst die Probe und ihre Eigenschaften (u.a. das zelluläre Membranpotenzial) beeinflussen kann (Garab & Van Amerongen, 2009).

2.2.6.2 Praktische Arbeiten zur NIR-Polarisationsspektroskopie an phototrophen Mikroorganismen

In der folgenden Tabelle 2.8 sind bisher publizierte Arbeiten aufgeführt, in denen VIS-Polarisationsspektroskopische Methoden in der Analyse von photoautotrophen Mikroorganismen zur Anwendung kamen:

Tabelle 2.8: Bisherige Arbeiten zu NIR-polarisationsspektroskopischen Analysen mit dem Schwerpunkt auf solchen Arbeiten, in denen Vibrationscirculardichroismen (VCD) untersucht wurden.

Methode	Untersucher Organismus	Zielsetzung	Quantitative oder qualitative Analyse	Nicht-Invasivität	Quelle
NIR-VCD	Campher	Messung von NIR-VCDs	Qualitativ	Invasiv, da Reinstanz vermessen wurde	Keiderling & Stephens, 1976
IR-VCD	Proteine in wässrigen Lösungen	Machbarkeitsstudie; Detektion von Amid-I-VCD-Banden	Qualitativ	Invasiv, da aufgereinigte Proteine vermessen wurden	Baumruk & Keiderling, 1993
NIR-VCD	Zyklopentan, Zyklohexan u.a.	Messung und theoretische Betrachtung von NIR-VCDs	Qualitative Messung und quantitative theoretische Betrachtung	Invasiv, da Reinstanz vermessen wurde	Abbate <i>et al.</i> , 2000
NIR-/IR-VCD	Campher, α -Pinen u.a.	Machbarkeitsstudie; Aufnahme von VCDs vom NIR- bis zum MIR	Qualitativ	Invasiv, da Reinstanzen vermessen	Cao <i>et al.</i> , 2004
IR-VCD	Proteinfilme	Strukturuntersuchung von Peptiden	Qualitativ	Invasiv und nicht an Kulturen angewendet	Shanmugam & Polavara-pu, 2004
VIS-/NIR-VCD	LHC I von Purpurbakterien	Einfluss verschiedener Carotinoide auf CD-Spektren	Semi-quantitative Betrachtung der Intensitätsverhältnisse von Banden	Invasiv durch Präparation der LHC I-Komplexe	Georgakopoulou <i>et al.</i> , 2006
NIR-/MIR-VCD	Diverse chirale Beispielmoleküle	Machbarkeitsstudie; Messung von VCDs von NIR- bis MIR-Bereich	Qualitativ	Invasiv, da Reinstanzen vermessen wurden	Guo <i>et al.</i> , 2006
NIR-/MIR-VCD	Diverse disaccharide	Aufklärung von Glykosidbindungspositionen	Qualitativ	Invasiv, da Reinstanzen vermessen wurden	Taniguchi & Monde, 2007

Methode	Untersuchter Organismus	Zielsetzung	Quantitative oder qualitative Analyse	Nicht-Invasivität	Quelle
NIR-VCD	Campher, α -Pinen u.a.	Vorhersage und Messung von NIR-VCDs	Qualitativ und quantitativ (vergleich Vorhersage/Messung)	Invasiv, da Reinsubstanzen vermessen wurden	Abbate <i>et al.</i> , 2009
NIR-/MIR-VCD	Proteine in wässrigen Lösungen	Messung von NIR-VCDs	Qualitativ	Invasiv, da aufgereinigte Proteine vermessen wurden	Ma <i>et al.</i> , 2010
NIR-/IR-VCD	Methylactat	Messung von NIR-VCDs	Quantitativ, konzentrationsabhängige Spektren gemessen	Invasiv, da Reinsubstanz vermessen wurde	Abbate <i>et al.</i> , 2012

Wie ersichtlich, ist die Anzahl vorhandener Literaturstellen zu dieser Thematik äußerst limitiert. Eine Anwendung der VCD-Messung ist lediglich im langwelligen IR-Bereich verbreitet, da hier distinkte CD-Peaks erkennbar sind, während im NIR-Bereich lediglich breitbandige differentielle Extinktionen beobachtbar sind. Auch fällt auf, dass vor allem Reinsubstanzen vermessen und charakterisiert werden, bzw. lediglich sehr simple Mixturen (z.B. Protein in Wasser) untersucht werden, wobei dies meist nur qualitativ geschieht. Eine komplexere Anwendung der NIR-CD-Spektroskopie zur nicht-invasiven Detektion und Quantifizierung von Blutzucker wurde von Hokr *et al.* (2016) zwar vorgeschlagen, jedoch (noch) nicht realisiert. Eine Anwendung der NIR-CD-Spektroskopie zur Quantifizierung von zellulären Inhaltsstoffen in photoautotrophen Mikroorganismen ist bisher nicht gegeben.

2.2.7 Raman-Spektroskopie

2.2.7.1 Theoretische Grundlagen der Raman-Spektroskopie

Für eine ausgiebige Erörterung der Raman-Spektroskopie sei auf entsprechende Lehrbücher verwiesen, jedoch soll an dieser Stelle zumindest eine kurze Einführung in diese Analysetechnik gegeben werden. Der folgende Absatz ist dabei größtenteils anhand von Pořízka *et al.* (2014) verfasst.

Wie bereits gesehen, gibt es bei Auftreffen von Photonen auf Materie verschiedene mögliche Wechselwirkungen. Neben der Überführung von Molekülen in höhere elektronische Energiezustände, kann ein Molekül durch Energieabsorption zudem in ener-

giereichere Schwingungszustände überführt werden. Unter normalen Umständen ist es hierfür erforderlich, dass der Energiegehalt eines Photons mit der Energiedifferenz zwischen unterschiedlichen Schwingungszuständen koinzidiert. Demgegenüber kann es auch passieren, dass durch inelastische Streuung⁸ von Photonen Energie auf Stoffe übertragen wird. Hierbei wird ein Molekül durch das Auftreffen eines Photons zunächst auf einen virtuellen Energiezustand angeregt. Dazu ist es nicht erforderlich, dass der Energiegehalt des Photons mit Energiedifferenzen zwischen molekularen Schwingungszuständen koinzidiert, vielmehr ist dieser Effekt über einen breiten Wellenlängenbereich beobachtbar. Das Molekül fällt hiernach auf ein im Vergleich zum Ursprungszustand erhöhtes Energieniveau herab, wobei ein Photon emittiert wird. Dieses Photon hat im Vergleich zum „Ursprungsphoton“, welches das Molekül angeregt hat, einen verringerten Energiegehalt um exakt jenen Betrag, der auf das Molekül übertragen wurde. Somit ist als Raman-Signal ein im Vergleich zum Ausgangszustand energieärmeres Photon detektierbar. Da dieser Mechanismus der inelastischen Streuung bei derselben Anregungswellenlänge an verschiedenen Molekülbindungen auftritt, ergibt sich als finales Messsignal ein Spektrum emittierter Photonen, welche sich um definierte Energiegehalte (die auf das Zielmolekül übertragen wurden) von jenen der Ursprungsstrahlung unterscheiden. Da dieser Effekt bei allen Anregungswellenlängen beobachtbar ist, würde sich bei Anregung von Molekülen mit polychromatischer Strahlung somit ein Raman-Spektrum für jede einzelne Anregungswellenlänge ergeben. Diese würden sich derart stark überlappen, dass sich keine einzelnen Banden oder Peaks separieren ließen. Aus diesem Grund geschieht die Anregung mit monochromatischen Lichtquellen. Hierdurch ergibt sich eine definierte Anregungswellenlänge, zu welcher stets die relativen Verschiebungen der Reemissionspeaks angegeben werden. Bei geeigneter Abszissenachsenskalierung, welche zumeist als Kehrwert der Wellenlänge gewählt und in Wellenzahlen pro Zentimeter angegeben wird, werden somit Spektren, die bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen aufgenommen wurden, direkt vergleichbar.

⁸ Zur Vermeidung von Unklarheiten:

Elastische Streuung: Absorption eines Photons und direkte Re-Emission eines anderen Photons derselben Wellenlänge.

Inelastische Streuung: Absorption eines Photons und Re-Emission eines anderen Photons längerer Wellenlänge (= geringerer Energie) wobei die Energiedifferenz als Schwingungsenergie auf das Molekül übertragen wurde.

Hierbei ist die Intensität der Raman-Spektren invers proportional von der Anregungswellenlänge abhängig, so dass kleinere Anregungswellenlängen zu höheren Signalintensitäten führen. Jedoch ist zu beachten, dass gerade Anregungen im UV-Bereich aufgrund der hohen Energiedichten der eingesetzten Anregungslaser zur Zerstörung von Probenmaterialien führen können (Yoshino *et al.*, 2015). Generell haben Raman-Spektren jedoch aufgrund der seltenen Interaktion geringe Intensitäten, da nur circa jedes millionste Photon der einfallenden Strahlung inelastisch gestreut wird.

Hinzu kommt, dass eventuell auftretende Fluoreszenzsignale um sechs bis zehn Zehnerpotenzen intensiver sind als Raman-Peaks, was gerade bei Anregung im sichtbaren Spektralbereich die Aufnahme von sauberen Raman-Spektren erschwert (Schrader, 1997a). Eine Probenanregung im nah-infraroten Spektralbereich kann hierbei Abhilfe schaffen und auch die Aufnahmen von sauberen Spektren in fluoreszenzaffinen Proben ermöglichen (Schrader, 1997a).

Besonders reizvoll an Raman-spektroskopischen Messungen ist die Tatsache, dass diese auch durch Verpackungsmaterialien wie Glas oder Plastik hindurch erfolgen können und somit nicht-invasiv Proben analysiert werden können. Da Wasser nur ein schwacher Raman-Strahler ist, sind zudem Untersuchungen an wässrigen Lösungen und Suspensionen möglich (Schrader, 1997b).

Für weitergehende Erörterungen der Theorie sowie instrumentellen Grundlagen sei auf Vandenabeele (2013), für generelle Anwendungsmöglichkeiten der Raman-Spektroskopie sei auf die Werke von Bernhard Schrader (1997a, 1997b) und für neuere technische Entwicklungen und deren (zumeist nicht quantitative) Anwendungen in der Phycologie auf Parab & Tomar (2012) verwiesen. Wie von Pořízka *et al.* (2014) konstatiert, handelt es sich bei der Nutzung von Raman-spektroskopischen Methoden für die Untersuchung von Mikroalgen und Cyanobakterien um ein eher neues Forschungsgebiet, so dass vor allem in den letzten Jahren Arbeiten zu der Thematik veröffentlicht wurden, welche zudem über ein breites Spektrum von Fachzeitschriften verstreut sind.

2.2.7.2 Praktische Arbeiten zur Raman-Spektroskopie an phototrophen Mikroorganismen

In Tabelle 2.9 sind jene Arbeiten aufgeführt, welche sich mit der quantitativen Untersuchung von phototrophen Organismen mittels Raman-Spektroskopie beschäftigen.

Tabelle 2.9: Bisherige Arbeiten zur Raman-spektroskopischen Analyse phototropher Mikroorganismen mit dem Schwerpunkt auf solchen Arbeiten, in denen quantitative Analysen erfolgten (!)

Methode	$\lambda_{Anreg.}$ (nm)	Untersuchter Organismus	Zielsetzung	Zielanalyt	Quantitative Analyse	Nicht invasiv	Besonderes	Quelle
Polarisierte Resonanz-Raman-Spektroskopie	488 oder 514,5	<i>Euglena gracilis</i> Z, <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Bestimmung der räumlichen Orientierung von Carotinoiden im Augenfleck verschiedener Algenarten	Carotinoide	Semi, da nur relative Intensitäten einzelner Peaks zwischen verschiedenen Spektren zu Mappingzwecken betrachtet wurden	Nein, da die Probe auf einem Träger fixiert wurde	-	Kubo et al., 2000
UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie	251	<i>Pseudonitzschia multiseries</i>	Nicht-invasive Quantifizierung von Domoinsäure in Phytoplankton	Domoinsäure	Ja, da bis hinab zu 3,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Domoinsäure direkt in der Kultur nachgewiesen wurde. Dies war möglich aufgrund der starken Resonanzanregung der Domoinsäure bei 251 nm	Ja, da mittels Durchflussküvette im laufenden Betrieb gemessen wurde	UV-Anregung führt zu Resonanzverhalten des Zialanalyts während andere Zellinhaltsstoffe nicht nennenswert angeregt werden	Wu et al., 2000
Raman-Mikrospektroskopie	780	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Quantitative Bewertung des Einflusses verschiedener Vorbehandlungen von Raman-Spektren auf die Vorhersage des Nährstoffstatus von Algenzellen mittels PLS	Kein spezifischer	Semi, da nur dichotom zwischen +1 (kein Stickstoffmangel) und 0 (Stickstoffmangel) unterschieden wurde	Nein, da die Zellen auf Quarzschalen immobilisiert wurden	Ableitungen und Streulichtkorrekturen als beste Vorbehandlungen von Raman-Spektren in Kombination mit PLS ermittelt	Heraud et al., 2006
Raman-Mikrospektroskopie	782	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Vorhersage des Nährstoffversorgungstatus einzelner Algenzellen mittels Raman-Mikrospektroskopie	Carotinoide, Chlorophylle	Semi, da zum einen nur Verhältnisse einzelner peaks innerhalb derselben Spektren betrachtet und zum anderen nur dichotom zwischen Normalen und Mangel-Anzuchtbedingungen unterschieden wurde	Nein, da einzelne Zellen immobilisiert wurden	Carotinoid- und Chlorophyllgehalte bzw. deren Raman-signale zeigten sich als direkt mit dem Nährstoffstatus einzelneellen korreliert	Heraud et al., 2007
Konfokale Raman-Mikrospektroskopie	532	<i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Neochloris oleoabundans</i>	Fettsäuremapping in einzelnen Zellen und zeitliche Betrachtung des Fluoreszenzverhaltens der untersuchten Zellen	Fettsäuren	Semi, da nur relative Intensitäten einzelner Peaks zwischen verschiedenen Spektren zu Mappingzwecken betrachtet wurden	Nein, da Zellen fixiert und sehr hohe Anregungsenergien genutzt wurden	Ein rolling circle Filter wurde zur Eliminierung von Fluoreszenz-Untergrundsignalen angewendet	Huang et al., 2010

Tabelle 2.9 (Forts.): Bisherige Arbeiten zur Raman-spektroskopischen Analyse phototropher Mikroorganismen mit dem Schwerpunkt auf solchen Arbeiten, in denen quantitative Analysen erfolgten (II)

Methode	$\lambda_{\text{Anreg.}}$ (nm)	Untersucher Organismus	Zielsetzung	Ziel- analyt	Quantitative Analyse	Nicht invasiv	Besonderes	Quelle
Fourier- Transformations-Raman- Mikrospektro- skopie	1064	<i>Nostoc</i> sp.	Raman-spektroskopische Bestimmung der Veränder- ungen von Pigmentgehalten unter UV-Einfluss	Carotino- ide, Scyto- nemin	Semi, da nur die relative Höhe der Carotinoidpeaks zwischen ver- schiedenen Spektren betrachtet wurde	Nein	Die Untersuchung wurde an <i>Nostoc</i> sp. durchgeführt	Wang et al., 2010
Raman- Mikrospektro- skopie	785	<i>Botryococcus sudeticus</i> Lem- mermann, <i>Chlamydomo- nas</i> sp., <i>Trachy- discus minutus</i>	<i>In-vivo</i> -Bestimmung des Sättigungsgrades von intra- zellulären Fettsäuren	Fettsäu- ren	Semi, da nur relative Peakhöhen innerhalb einzelner Spektren ausgewertet wurden	Nein, da die Zellen in Agarose fixiert wurden	-	Samek et al., 2010
Konfokale Laserfixie- rungs-Raman- Mikrospektro- skopie	785	<i>Botryococcus braunii</i> , <i>Neo- chloris oleo- abundans</i> , <i>Chlamydomo- nas reinhardtii</i>	Quantitative Bestimmung des Sättigungsgrades von Lipiden	Fettsäu- ren	Semi, da nur relative Intensitäten einzelner Peaks zwischen ver- schiedenen Spektren betrachtet wurden	Semi, da einzelne Zellen eingefangen wurden aber trotz- dem komplett vital blieben	Anhand der relativen Intensitä- ten einzelner Peaks zwischen verschiedenen Spektren wurde der Sättigungsgrad von intrazel- lulären Fettsäuren bestimmt und diese identifiziert. Optische Pinzetten wurde zur Fixierung einzelner Zellen angewendet	Wu et al., 2011
Faserkopf- gestützte Raman- Spektroskopie	785	<i>Auxenochlorel- la protothecoi- des</i>	Nutzung von Immersionsmess- kopf und support vector re- gression zur In-situ- Bestimmung von verschiede- nen Zielgrößen aus Raman- Spektren	Biomass- e-, Glucose-, Lipidgeh- alte	Ja, da alle Parameter mit folgenden RMSEPs <i>in situ</i> quantifiziert wurden: Biomasse: 3.51 g l^{-1} ($R^2 = 0.982$) Ölgehalt: $3.63 \% (w/w)$ ($R^2 = 0.860$) Glucose: 4.31 g l^{-1} ($R^2 = 0.887$)	Ja, da ein Immersi- onsmesskopf für Messungen im laufenden Reaktor- betrieb verwendet wurde	Komplett <i>in-situ</i> - spektroskopisches Versuchs- setup mit dem diverse Para- meter direkt im Reaktor vermessen werden konnten	Nadadoor et al., 2012
<i>In-vivo</i> - Raman- Mikrospektro- skopie	785	<i>Trachydiscus minutus</i>	Nicht-invasive Sortierung von einzelnen lebendigen Algen- zellen anhand von Raman- Mikrospektroskopie in mikro- fluidischen Systemen	β - Carotin, Fettsäu- ren	Semi, da lediglich die relative Intensität eines Carotinoidpeaks zwischen verschiedenen Spektren bestimmt wurde	Nein, da die Algen- zellen in Agarose immobilisiert wurden	Volumina von intrazellulären Lipidakkumulationen wurden bis auf $< 2 \mu\text{m}^3$ genau indirekt anhand von Carotinoidpeaks in Spektren der lipidhaltigen Zellregion bestimmt	Pilát et al., 2012a

Tabelle 2.9 (Forts.): Bisherige Arbeiten zur Raman-spektroskopischen Analyse phototropher Mikroorganismen mit dem Schwerpunkt auf solchen Arbeiten, in denen quantitative Analysen erfolgten (III)

Methode	$\lambda_{\text{Anreg.}}$ (nm)	Untersucher Organismus	Zielsetzung	Ziel- analyt	Quantitative Analyse	Nicht invasiv	Besonderes	Quelle
In-vivo- Raman- Mikrospektro- skopie	785	<i>Trachydiscus minutus</i>	Entwicklung einer Methode, um β -Carotin- Konzentrationen in Fettku- geln innerhalb von Algenzel- len zu bestimmen	β - Carotin, Fettsäu- ren	Ja, da Carotinoidegehalte bis auf < 1 g l ⁻¹ genau bestimmt wurden	Nein, da die Algen- zellen in Agarose immobilisiert wurden	Es wurden Carotinoide (wel- che in Fettkugeln gelöst sind) quantifiziert und festgelegt, dass hohe Carotinoidegehalte einerem Akkumulationen mit einer erhöhten Gesamtlipid- gehalt der gesamten Zelle einhergehen	Plát et al., 2012b
Kohärente Anti-Stokes- Raman- Mikrospektro- skopie	915 & 700 bis 780 nm	<i>Nostoc com- mune, Nostoc sp., Chlorella sp.</i>	Carotinoïdmapping in leben- den Mikroalgen- und Cyanobakterienzellen	Carotino- ide	Semi, da nur relative Intensitäten einzelner Peaks zwischen ver- schiedenen Spektren zu Mapping- zwecken betrachtet wurden	Nein, da Zellen fixiert wurden	Die Untersuchung wurde an <i>Nostoc</i> sp. und <i>Nostoc com- mune</i> durchgeführt	Dement- jev et al., 2013
Raman- Mikrospektro- skopie	532	<i>Haematococ- cus pluvialis</i>	Untersuchung der Cystenbil- dung in <i>H. pluvialis</i> mittels Kombination von Massen- spektroskopie mit Raman- und Fluoreszenzmapping	ADP/ATP, Chloro- phyll, Aста- nthin	Semi, da nur relative Intensitäten einzelner Peaks zwischen ver- schiedenen Spektren betrachtet wurden	Nein, da kleine Tropfen fixiert wurden	Kombination von Raman- Messungen und Massenspek- trometrie zur Gewinnung umfangreicherer metaboli- scher Erkenntnisse	Fagerer et al., 2013
Anregungsfre- quenz- Versetzungs- Raman- Differenz- spektroskopie	785	<i>Porphyridium purpureum</i>	Nicht-invasive Echtzeit- Bestimmung von Exopolysac- charidkonzentrationen in Photobioreaktoren	Exopoly- sacchari- de	Ja, da Polysaccharide im Anzucht- medium quantitativ erfasst wur- den. Für aufgereinigten Überstand ergab eine lineare Regression einen RMSEP von 0,07 g l ⁻¹ . Messungen direkt in der Algenkul- tur in Kombination mit support vector machine Regressionen ergaben einen PRESS von 0,031 g l ⁻¹	Ja, da mittels Durchflussküvette im laufenden Reaktorbetrieb gemessen wurde	Eine <i>In-situ</i> -Polysaccharid- quantifizierung im laufenden Reaktorbetrieb ohne Fluores- zenzproblematik war möglich. Die Wahl der Regressionsme- thode (support vector machi- ne vs. partial least squares) hatte entscheidenden Einfluss auf die Vorhersagegüte	Noack et al., 2013

Tabelle 2.9 (Forts.): Bisherige Arbeiten zur Raman-spektroskopischen Analyse phototropher Mikroorganismen mit dem Schwerpunkt auf solchen Arbeiten, in denen quantitative Analysen erfolgten (IV)

Methode	$\lambda_{\text{Anreg.}}$ (nm)	Untersuchter Organismus	Zielsetzung	Ziel-analyt	Quantitative Analyse	Nicht invasiv	Besonderes	Quelle
(Anscheinend) Faser-gestützte Kuvettenmessung	532	<i>Chlorella protothecoides</i>	Echtzeitbestimmung von Glucosekonzentrationen der Kultursuspension in Photobioreaktoren	Glucose	Ja, da Glucosekonzentrationen von 17 bis 40 g ml ⁻¹ mit einem PLS-Kreuzvalidierungsfehler von von 1,37 g ml ⁻¹ bestimmt wurden	Nein, da zwar Proben genommen wurden, das Verfahren jedoch auch <i>in situ</i> funktionieren sollte	Ein rolling circle Filter wurde vor der PLS angewendet. Die Glucosekonzentration im Medium wurde ohne vorherige Aufreinigung bestimmt	Oh <i>et al.</i> , 2013
Fourier-Transformations-Raman-Mikroskopie	1064	<i>Caulerpa taxifolia</i>	Qualitative und quantitative Untersuchung der metabolischen Vorgänge bei der Bildung von Wundverschlüssen in <i>Caulerpa taxifolia</i> mittels ortsaufgelöster Raman-Mikroskopie	Caulyterpen und dessen derivative	Semi, da nur relative Intensitäten einzelner Peaks zwischen verschiedenen Spektren betrachtet wurden	Nein, da der Organismus fixiert wurde	Im intrazellulären Metabolismus seltene Dreifachbindungen von Caulyterpen wurden ortsaufgelöst selektiv nachverfolgt, wodurch ein einzelner Metabolit im Cytoplasma quasi "isoliert" vermessen werden konnte	Weissflog <i>et al.</i> , 2013
Resonanz-Raman-Mikroskopie (Setup bis etwas unklar!)	Div. von 413,7 bis 570	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	Differenzierung von intrazellulären Carotinoiden und Bestimmung ihrer Konformation in Abhängigkeit von verschiedenen Kulturbedingungen	Diadinoxanthin, Diatoxanthin	Semi, da nur relative Intensitäten einzelner Peaks zwischen verschiedenen Spektren betrachtet wurden	Nein, da die Zellen in flüssigem Stickstoff versenkt und immobilisiert wurden	Intrazelluläre Carotinoide-halte wurden relativ zu Chlorophyllgehalten bestimmt	Alexandre <i>et al.</i> , 2014
Raman-Mikroskopie	1064 oder 785	<i>Dunaliella salina</i>	Kombination von PAM- und Raman-Messungen zur Analyse von einzelnen Algen	Lipide	Semi, da nur relative Intensitäten einzelner Peaks zwischen verschiedenen Spektren betrachtet wurden	Systembedingt jein, da per cell sortierte Zellen manipuliert wurden, die Messung an sich jedoch berührungslos erfolgte	Qualitative Informationen zu Kettenlänge, Sättigungsgrad und Schmelztemperatur intrazellulärer Fettsäuren konnten aus den Spektren abgeleitet werden. Chlorophyllfluoreszenz- und Raman-Messungen wurden kombiniert	Davis <i>et al.</i> , 2014 ¹

¹ Es gibt viele weitere Quellen, die sich wie Davis *et al.* (2014) mit Untersuchungen an Fettsäuren beschäftigen, jedoch werden hier nur Verhältnisse von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren bestimmt und keine absoluten Quantifizierungen vorgenommen, weshalb sie hier nicht weiter aufgeführt werden.

Tabelle 2.9 (Forts.): Bisherige Arbeiten zur Raman-spektroskopischen Analyse phototropher Mikroorganismen mit dem Schwerpunkt auf solchen Arbeiten, in denen quantitative Analysen erfolgten (V)

Methode	$\lambda_{\text{Anreg.}}$ (nm)	Untersuchter Organismus	Zielsetzung	Ziel-analyt	Quantitative Analyse	Nicht invasiv	Besonderes	Quelle
Konfokale Raman-Mikrospektroskopie	532	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Vorhersage intrazellulärer Stärkegehalte anhand von Raman-Spektren	Stärke	Ja, da intrazelluläre Stärke (anscheinend bis auf wenige Gewichtsprozent genau) von 2,5 bis 46,3 Gewichtsprozent anhand eines einzelnen Raman-Peaks bestimmt wurde	Nein, da die Zellen abzentriert und in Kapillaren eines <i>cell sorters</i> vermessen wurden	Es wurde für verschiedene Algenarten jeweils eine beinahe perfekt lineare Korrelation zwischen dem intrazellulären Stärkegehalt und der Intensität des Raman-Peaks bei 478 cm^{-1} gefunden	Ji <i>et al.</i> , 2014
Raman-Mikrospektroskopie	488	<i>Diatomeen</i> , <i>Prymnesiophyceae</i> , <i>Makroalgen</i>	Quantitative Bestimmung von Carotinoiden in einzelnen Zellen	Carotinoide	Ja, da der Fucoxanthingehalt pro Zelle mit einer Genauigkeit im Bereich von < 1 μM nach vorheriger Systemkalibrierung mit Stoffstandards vorhergesagt wurde	Nein, da einzelne Zellen isoliert und vermessen wurden	Es wurde eine hohe Sensitivität durch resonante Anregung erreicht, wodurch die geringe Nachweisgrenze erreicht wurde	Barletta <i>et al.</i> , 2015
Kohärente Anti-Stokes-Raman-Mikrospektroskopie	1064 & 810,1 bis 821,5	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Ortsaufgelöste Analyse der Bildung von intrazellulären Lipidtröpfchen unter diversen Kulturbedingungen und Messzeitpunkten	Fettsäuren	Ja, da die Größe einzelner Lipidtröpfchen (= Lipidgehalt) pro Zelle im μm^3 -Maßstab bestimmt wurde, bzw. nach Verrechnung mit Zellvolumina im pg-Bereich angegeben werden konnte	Nein, da Zellen komplett immobilisiert und auch durch Input-Laser geschädigt wurden	Es fand eine dreidimensionale Auswertung der konfokal ermittelten ortsaufgelösten Fettsäureverteilung statt und Lipidtröpfchen wurden räumlich dargestellt	Cavonius <i>et al.</i> , 2015
Raman-Mikrospektroskopie	1064 & 514,5	<i>Cylindrocapsa raciborskii</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i>	Detektion von organisch-spezifischen Polyenen (Carotinoide) unter Stressbedingungen (UV-Strahlung)	Peridinin	Nein, da nur eine reine Identifikation von Peridinin stattfand und keine Quantifizierung desselben	Ja, da einzelne Zellen isoliert vermessen wurden	Durch Anregung bei 1064 nm ergaben sich nur geringe Probleme mit Chlorophyllfluoreszenz bei gleichzeitig guter Qualität der Raman-Spektren	De Oliveira <i>et al.</i> , 2015
Konfokale Raman-Mikrospektroskopie	532 & 785	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Mutanten von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Screening der Fettsäuresammensetzung verschiedener Mutanten	Fettsäuren	Semi, da nur relative Peakhöhen innerhalb der Spektren ausgewertet wurden	Nein, da isolierte Zellen untersucht wurden, welche per Fotobleaching um Fluoreszenz bereinigt wurden	Eine qualitative Unterscheidung des Sättigungsgrades von intrazellulären Fettsäuren sowie von deren Kettenlänge war möglich	Sharma <i>et al.</i> , 2015

Tabelle 2.9 (Forts.): Bisherige Arbeiten zur Raman-spektroskopischen Analyse phototropher Mikroorganismen mit dem Schwerpunkt auf solchen Arbeiten, in denen quantitative Analysen erfolgten (VI)

Methode	$\lambda_{Anreg.}$ (nm)	Untersucher Organismus	Zielsetzung	Ziel-analyt	Quantitative Analyse	Nicht invasiv	Besonderes	Quelle
Frequenzmodulierte stimulierte Raman-Mikrospektroskopie	1064 & 816,4	<i>Botryococcus braunii</i>	Machbarkeitsstudie von Frequenz- anstatt Amplitudenmodulation in stimulierter Raman-Mikrospektroskopie	Fettsäuren/Lipid tropfen	Nein, da es nur eine Machbarkeitsstudie war	Nein, da Zellen zwischen Objektträgern fixiert	Durch Frequenzmodulation des Lasersystems waren Fluoreszenzfreie Aufnahmen möglich. Insgesamt ein vielversprechender Ansatz	Wang et al., 2015
Konfokale Raman-Mikrospektroskopie	514,5	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Indirekte Identifikation und Quantifizierung von Herbiziden mittels Raman-Spektren von Mikroalgen, die in Herbiziden ausgesetzt waren	Pigmente	Ja, da sowohl die Art des applizierten Herbizids als auch dessen eingesetzte Konzentration zu 90 % korrekt klassifiziert wurde	Nein, da Zellen in Agarose fixiert und mikroskopiert wurden	Stoffe können indirekt identifiziert und quantifiziert werden wenn stabile metabolische Zusammenhänge zwischen Stoff (-konzentration) und Phänotyp bestehen	Shao et al., 2015b; 2016a
Kohärente Anti-Stokes-Raman-Mikrospektroskopie	785	<i>Monoraphidium neglectum</i>	Ortsaufgelöste <i>in vivo</i> Analyse der Lipidproduktion bzw. -akkumulation in Algen	Fettsäuren	Ja, da der Lipidgehalt pro Zelle in (mit einer Genauigkeit von ca. 2 Gewichtsprozent aus differentialen Raman-Intensitätskarten bestimmt werden konnte	Nein, da die Zellen vor Mikroskopie aufkonzentriert und eingefroren wurden	Durch Anwendung des CARS-Systems gab es nur extrem geringe Fluoreszenzeffekte	Jaeger et al., 2016
Konfokale Raman-Mikrospektroskopie	532, 785 oder 532	<i>Desmodesmus quadricauda</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>	<i>In-situ-mapping</i> verschiedener Inhaltsstoffe in Mikroalgen	Pigmente und nicht fluoreszierende Stoffe	Semi, da nur relative Intensitäten einzelner Peaks zwischen verschiedenen Spektren zu Mappingzwecken betrachtet wurden	Nein, da Pigmente weggebrannt wurden	Verschiedene Arten von Zellinhaltsstoffen (fluoreszierend vs. nicht fluoreszent) waren mit einem einzigen Versuchsprotokoll detektierbar	Moudříková et al., 2016
Nah-Infrarot Raman-Mikrospektroskopie	1064	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	Aufnahme fluoreszenzfreier Spektren ohne Schädigung der zu untersuchenden Organismen	Pigmente	Nein, eher qualitative Vorstellung von Spektren	Nein, da Zellen fixiert wurden	Technik, die potenziell auch für <i>In-situ</i> -Anwendungen interessant ist	Ando et al., 2011
Polarisations-sensitive Raman-Spektroskopie	Egal	Egal	Theoretische Vorstellung einer Methode zur enantioselektiven Aufnahme von Raman-Spektren an chiralen Stoffen	Chirale Moleküle generell	Ja, möglich	Ja/Nein je nach Setup des Versuchsaufbaus	Universell anwendbar für Raman-Spektroskopie an chiralen Molekülen	Kiefer & Noack, 2015

Im Vergleich zu frühen Arbeiten wie beispielsweise jenen von Brahma *et al.* (1983), Szalontai *et al.* (1985), Baek *et al.* (1989) oder auch solchen neueren Datums wie z.B. jener von Wu *et al.* (1998), in denen vor allem die qualitative Erfassung von Raman-Spektren im Fokus standen, gewinnt die quantitative Auswertung von Raman-Spektren immer größere Aufmerksamkeit. Dies liegt neben der Entwicklung neuartiger Techniken und verbesserten Messaufbauten vor allem in der intersziplinären Anwendung der Raman-Spektroskopie, beispielsweise zur nicht-invasiven Analyse von Mikroorganismen und konstanten Weiterentwicklungen um Fluoreszenzeffekte, Probedegradation und weitere Probleme zu minimieren.

Wie oben aufgeführt, gibt es inzwischen viele semi-quantitative Arbeiten, welche sich mit der orts aufgelösten Erfassung und Darstellung von Metaboliten beschäftigen, wobei vor allem Intensitätsdifferenzen innerhalb von einzelnen und zwischen verschiedenen Spektren erfasst werden. Diese Arbeiten sind selten auf absolute Quantifizierungen ausgelegt, jedoch zeigen sie bereits, dass auch teilweise gering konzentrierte Metabolite *in vivo* erfassbar sind. Durch messtechnische Kniffe wie Anti-Stokes-Raman-Spektroskopie oder mathematische Verfahren zur Grundlinienkorrektur sind auch Fluoreszenzeffekte, welche sehr viel höhere Signalintensitäten als die Raman-Spektren aufweisen und deren Auswertung stark erschweren können, beherrschbar geworden (siehe z.B. Oh *et al.*, 2013; Samek *et al.*, 2010). Dies ist gerade in der Untersuchung von pigmentierten Mikroorganismen wichtig, da intrazelluläre Chlorophylle und Carotinoide sehr starke Fluoreszenzsignale hervorrufen können. Auch die Anwendung von NIR-Anregungsstrahlung hilft, diese Problematik zu umgehen, wobei hier als direkter Nachteil die geringere Messempfindlichkeit zu Buche schlägt.

Die meisten der oben aufgeführten Arbeiten waren dabei meist invasiver Natur, da einzelne Zellen mittels Raman-Mikrospektroskopie vermessen wurden. Ansätze wie die Nutzung von optischen Pinzetten machen eine Anwendung im (extrem langsamen) Durchflussprinzip zumindest theoretisch möglich. Die erfolgreiche Anwendung von Resonanz-Raman-spektroskopischen Messungen bei konstantem Durchfluss und Probenanregung im UV-Bereich zeigt, dass auch semi-invasive *In-vivo*-Quantifizierungen möglich sind.

Dabei können zum einen über die Auswertung von metabolitspezifischen (einzelnen) peaks in Raman-Spektren direkte Aussagen über deren Konzentrationen getroffen

werden oder zum anderen auch indirekte Stoffquantifizierungen über mit dem Zielmetabolit korrelierte weitere Stoffe erfolgen.

Allen aufgeführten Arbeiten mit Ausnahme jener von Nadadoor *et al.* (2012) ist jedoch gemein, dass zerstörungsfreie *In-situ*-Messungen von Raman-Spektren ganzer Kulturen direkt in geschlossenen Anzuchtssystemen eher die Ausnahme sind. Letztgenannte Autoren konnten mittels einer ins Anzuchtssystem verbrachten Messsonde Raman-Spektren direkt im laufenden Betrieb aufnehmen. Dieser Ansatz wurde auch von Koch *et al.* (2017b) verwendet. In dieser Arbeit wurden fasergestützt Raman Spektren innerhalb von Kultursuspensionen der Grünalge *Dunaliella salina* aufgenommen quantitative Analysen der Carotinoidbandenlagen und -intensitäten vorgenommen. Ziel war die Untersuchung von Kinetiken des Violaxanthinzyklus bei Adaption an variierende Lichtverhältnisse. Hierbei wurden Echtzeitmessungen im laufenden Versuchsreaktor durchgeführt, wodurch *In-situ*-Untersuchungen zellulärer Reaktionen möglich waren.

Zwar sind solche Ansätze für Langzeituntersuchungen oder Prozesssteuerungen vielversprechend, aber auch bei den zuletzt vorgestellten Versuchsaufbauten handelt es sich nicht um Ansätze, die die Untersuchung vieler Proben ermöglichen, so wie es für Screeninganwendungen nötig ist.

3 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es mit Hilfe ausgewählter und nachfolgend spezifizierter optischer Analyseverfahren in geschlossenen Photobioreaktoren Wachstums- und Inhaltsstoffparameter von Mikroorganismen zu detektieren. Hierzu soll ein geschlossener Photobioreaktor zur Kultivierung photoautotropher Mikroorganismen konzipiert und entwickelt werden. Mit Hilfe dieses Prototypsystems sollen dann die verschiedenen optischen Verfahren VIS- und NIR-Extinktionsspektroskopie, Polarisationspektroskopie, Fluoreszenzanalysen sowie Ramanspektroskopie und orts aufgelöste 3D-Verfahren auf ihre Anwendbarkeit am Beispiel der *In-situ*-Analytik von PHB in *Nostoc Muscorum* getestet, wahlweise adaptiert und reaktorspezifisch bewertet werden.

4 Material & Methoden

4.1 Entwickelter Einwegreaktor

Als Ausgangsmaterialien für den entwickelten Photobioreaktor (PBR) sollten in jeden Fall kostengünstige Einwegmaterialien dienen. Diese Anforderung, sowie im Vorfeld der Materialauswahl angestellte Überlegungen zur optimalen Form des Reaktorbehälters führten zur Auswahl von Polymerverbänden, welche für den Nahrungsmittelsektor produziert werden. Des Weiteren sollten die Reaktoren als geschlossenes System ausgelegt sein, so dass zudem ein besonderes Augenmerk auf das Verschlusssystem und die Charakterisierung der sich daraus ergebenden Reaktoreigenschaften gelegt wurde.

4.1.1 Verwendete Einweg-Polymermaterialien

Als Grundgerüst dienten Plastikbecher aus Polypropylen (PP), Modell „Dressingbecher, klar“, welche unter der Artikel-Nummer 335-042 von der Firma W. Peter Schäfer in Hannover bezogen wurden. Die Becher sind umgedrehte Kegelstümpfe mit einem Gesamtvolumen von 80 ml und sind in Abbildung 4.1 gezeigt. Die Gefäße sind für den Kontakt mit Lebensmitteln explizit zugelassen, was unter anderem sicherstellt, dass keine toxischen Stoffe aus dem Polymer in die Versuchskulturen migrieren.

Aufgrund der produktionsbedingten Reinheit, wurden die Becher vor ihrer Verwendung nicht sterilisiert, es wurde jedoch auf eine keimarme Arbeitsumgebung bei der Bereitstellung sowie während des Befüllvorgangs Wert gelegt. Um dies zu erreichen fand das Befüllen der Becher stets unter einer Sterilbank statt.

Um eine Durchmischung der Algenkulturen während der Versuche zu gewährleisten, wurden stets lediglich 50 ml Algensuspension in einem Becher kultiviert. Die so über der Flüssigphase vorhandene Gasschicht, hatte bei einem Restvolumen von 30 ml eine ausreichende Schichtdicke, um ein Hochsteigen der Suspensionen an den Becherwänden, bedingt durch die (bei der Anzucht auf Rotationsschüttlern) entstehenden Zentrifugalkräfte zu ermöglichen, ohne dass ein Kontakt der Flüssigphase zur Reaktoroberseite entstand.



Abbildung 4.1: Als Reaktorgefäß verwendete Polypropylen-Einwegbecher

Die Becher sollten im Folgenden versiegelt werden, wofür Siegfelien aus dem Nahrungsmittel-Verpackungsbereich getestet wurden. Die zum Verschließen der Reaktoren verwendeten Siegfelien sowie ihre wichtigsten Materialeigenschaften sind in Tabelle 4.10 dargestellt.

Tabelle 4.10: Ausgewählte Materialeigenschaften der zum Verschließen der Einwegreaktoren verwendeten Polymerfolien. Soweit nicht anders gekennzeichnet sind alle Angaben den technischen Datenblättern der Folien entnommen

Folie	Hersteller	Material	Dicke (µm)	Gas-Permeationsraten (cm ³ m ⁻² d ⁻¹ bar ⁻¹)		
				O ₂	CO ₂	H ₂ O
Vario-Seal HB 64 PP AF	Variovac PS SystemPack GmbH	PP ¹ /PA ² / PET ³	64	60 ^a	180 ^a	< 3 ^a
Flachfolie OPP/PEM 2/50	Südpack Verpa- ckungen GmbH & Co. KG	OPP ⁴ / PEM ⁵	52	1.000 (bei 23 °C & 35 % r.F.)	k.A.	< 4 (bei 23 °C & 85 % r.F.)
MRX 2145	Sealed Air Corp.	PE ⁶	13	11.500 (bei 23 °C & 0 % r.F.)	28.500 (bei 38 °C & 100 % r.F.)	26 (bei 23 °C & 0 % r.F.)
Vario-Seal Mikroperforiert	Maag GmbH	PET ³ /PE ⁶	52	k.A.	k.A.	k.A.
Adhäsions-folie	Carl Roth GmbH & Co. KG	LDPE ⁷	14	k.A.	k.A.	k.A.

¹ Polypropylen; ² Polyamid; ³ Polyethylenterephthalat; ⁴ Orientiertes Polypropylen; ⁵ Polyethylenmethacrylat; ⁶ Polyethylen; ⁷ Polyethylen geringer Dichte

^a Angaben gelten für eine vergleichbare Siegfelie der Firma Allvac Folien GmbH mit Hochbarriere mit einer Schichtdicke von 75 µm unter unbekanntenen Messbedingungen

Insbesondere unter den Gesichtspunkten

- hohe CO₂-Durchlässigkeit
- hohe O₂-Durchlässigkeit
- geringe Wasserdampfdurchlässigkeit sowie
- gute Siegelbarkeit gegen Polypropylen

wurden nachfolgend geeignete Folien ausgewählt.

Neben den verschiedenen, durch Verschweißen, fest mit den Bechern verbindbaren Folienmaterialien wurden zudem Polymerdeckel als Verschluss getestet. Diese Deckel wurden wie die Becher von der Firma W. Peter Schäfer als „Runddeckel, klar“ unter der Artikelnummer 337-061 bezogen.

4.1.2 Versiegelung der Einwegreaktoren

Das Verschließen der Becher wurde mittels eines Handsiegelgerätes, Modell Silius basic der Firma Variovac PS Systempack GmbH realisiert. Um eine reproduzierbare Versiegelung zu ermöglichen wurde ein Siegelrahmen aus Holz gefräst (siehe Abbildung 4.2) in welchen die Becher eingelassen, befüllt und letztlich versiegelt wurden.



Abbildung 4.2: Zum Verschließen der Reaktoren verwendete Geräte. Links: Handsiegelgerät Silius Basic; Rechts: Konstruierter Siegelrahmen zur Aufnahme der Becher während des Siegelvorgangs

Der konstruierte Siegelrahmen erlaubt das gleichzeitige Verschließen von bis zu 9 Reaktoren, wodurch ein hoher Probendurchsatz während des Siegelvorgangs ermöglicht wird. Als Temperaturbereich für die Versiegelung wurden je nach Folie 150 bis 180 °C gewählt, wobei die Siegeldauer je nach Folie von 2 bis 7 Sekunden reichte.

4.1.3 Gaswechsel-Messungen

Da nicht für alle verwendeten Siegelmaterialien verlässliche Literaturangaben bezüglich der zu erwartenden Gasdurchlässigkeiten zu ermitteln waren und diese Daten für einen Verschluss der Becher mittels Plastikdeckeln ebenfalls nicht zu ermitteln waren, wurde der geschlossene Bioreaktor als System einer weiteren Untersuchung unterzogen. Hierfür wurden die verwendeten Verschlussmaterialien Gaswechselfmessungen unterzogen, die eine Aussage über den im versiegelten Reaktor zu erwartbaren Gasaustausch geben sollten. Die Messungen wurden mit CO₂ als Tracergas durchgeführt, wobei der in Abbildung 4.3 dargestellte Versuchsaufbau verwendet wurde.

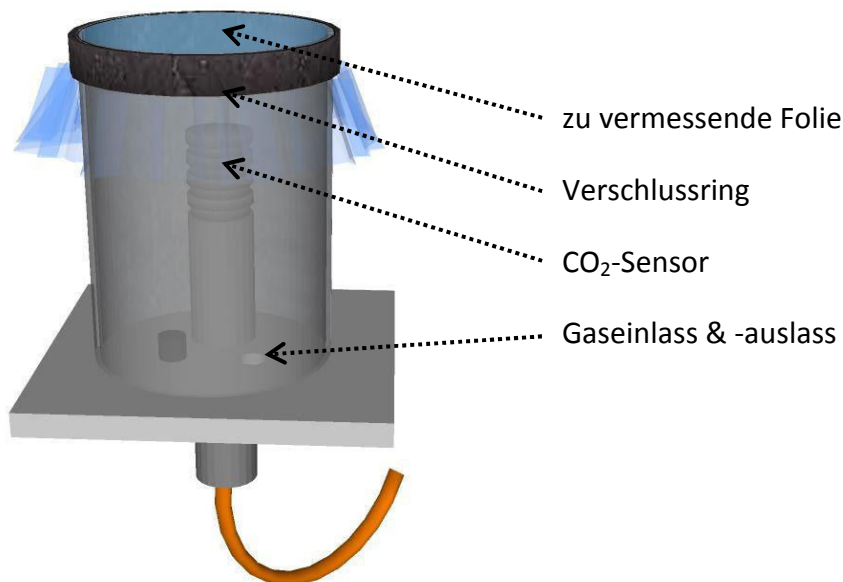


Abbildung 4.3: Zur Bestimmung der Gas-Permeabilität der eingesetzten Verschlussmaterialien verwendeter Versuchsaufbau.

Als Messvolumen diente ein Metallzylinder, welcher den gleichen Durchmesser aufwies wie die verwendeten Plastikbecher. Auf diese Art und Weise konnte der im Messsystem erfolgte Gasaustausch direkt auf das Bioreaktorsystem umgerechnet werden, da lediglich die Folienfläche der Deckmaterialien für den Gasaustausch entscheidend war. Der Metallzylinder wurde auf einer Bodenfläche gasdicht verklebt. In dieser Bodenfläche befanden sich Löcher für die Zufuhr des Tracergases sowie einen Druckausgleich während der Flutung mit Tracergas. Zudem wurde ein GMP222-CO₂-Diffusionssensor der Firma Vaisala (Vaisala GmbH, Bonn) im Messvolumen montiert um die zeitliche Entwicklung der CO₂-Konzentration im Versuchsaufbau zu erfassen.

Auf der offenen Oberseite wurden die jeweils zu vermessenden Materialien plan aufgelegt und mit drei Verschlussringen gasdicht befestigt.

Im Zuge einer Permeabilitätsmessung wurde im Anschluss das gesamte Messvolumen mit CO₂ mit einer Konzentration von 1500 ppm geflutet. Neben der CO₂-Konzentration im Messzylinder wurde auch die Außen-CO₂-Konzentration erfasst, da aus den Differenzen der Messungen die letztendlichen Gaswechselzahlen berechnet wurden. Die Berechnung der Gaswechselzahl erfolgte nach Nederhoff *et al.* (1985), nach Formel (1)

$$Z = \frac{1}{t_1 - t_0} \cdot \ln \left(\frac{C_{i_{t_0}} - C_{a_{t_0}}}{C_{i_{t_1}} - C_{a_{t_1}}} \right) \quad (1)$$

mit

Z: Gaswechselzahl [1 h⁻¹]

t₀: Beginn der Messung [h]

t₁: Ende der Messung [h]

C_i: CO₂-Innenkonzentration im Messzylinder [ppm]

C_a: CO₂-Außenkonzentration im Versuchsraum [ppm]

Zur Korrektur der gemessenen CO₂-Abklingkurven im Hinblick auf systemspezifische Einflüsse wurde der Grund-Gaswechsel des Systems bestimmt indem statt einer Folienprobe ein gasundurchlässiges Polymerelement gasdicht auf die Probenöffnung gespannt wurde und von den jeweiligen Ergebnissen der einzelnen Folienmessungen subtrahiert. Die letztlich bestimmte Gaswechselzahl Z gibt Aufschluss darüber, wie lange es dauert, bis das gesamte Gasvolumen im Bioreaktor, welches über der Flüssigphase vorhanden ist, ein Mal komplett ausgetauscht wird.

4.1.4 Bestimmung der Wachstumskapazität des entwickelten Einwegreaktors

Um zu überprüfen, inwieweit die ausgewählten Materialien bzw. der entwickelte PBR für die Anzucht von Mikroalgen und Cyanobakterien geeignet sind/ist, wurden Wachstumsversuche im geschlossenen System durchgeführt. Hierbei galt es, die maximal kultivierbaren Zelldichten zu ermitteln, diese mit Erlenmeyerkolben als Referenzsystem zu vergleichen und festzustellen, inwiefern Reaktionen verschiedener Organismen im geschlossenen PBR mit jenen im Referenzsystem vergleichbar sind.

In diesem Versuch wurde *Chlorella vulgaris* verwendet. Die Algen wurden in Düngermedium (1 % v/v Max Bahr Universal Blumendünger in voll-entsalztem Wasser) bei einem hell/dunkel-Zyklus von 16/8 Stunden und einer mittleren Photonenstromdichte von $138 \pm 13 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ kultiviert. Als Lichtquelle wurden Osram-Leuchtstoffröhren des Typs Lumilux warm white verwendet. Die Kulturen wurden bei $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ und 75 Umdrehungen pro Minute auf einem Horizontalschüttler (Modell SM25, Fa. Edmund Bühler, Hechingen) angezogen. Als Referenzsystem dienten in diesem Versuch Erlenmeyerkolben, welche analog zu den PBR mit einem Kulturvolumen von 50 ml befüllt wurden. Die Dichtebestimmung der Referenzkulturen erfolgte nach Entnahme von 1 ml Probenvolumen mittels Extinktionsmessungen bei 850 nm, wobei die entnommenen Volumina den Kulturen nach erfolgter Dichtebestimmung wieder zugeführt wurden. Die Kulturen im PBR wurden mit verschiedenen Folien versiegelt und durchgängig geschlossen kultiviert, so dass die Ermittlung der Zelldichten direkt im PBR mittels des in Abschnitt 5.2.1 beschriebenen Systems durchgeführt wurden.

Die tatsächlich im System mögliche Wachstumskapazität wurde nachfolgend für die verschiedenen Siegelfolien bestimmt, ebenso wie die maximalen Wachstumsraten und Zeitpunkte statistisch signifikanter Divergenz des Wachstumsverhaltens von verschiedenen Varianten zur Erlenmeyerkolben-Kontrolle. Um diese Werte zu ermitteln, wurden durch die gemessenen Rohdaten sigmoidale Kurvenverläufe gefittet, anhand derer die statistische Auswertung der Versuche stattfand.

Da *Chlorella* bei unbegrenzter Ressourcenverfügbarkeit ein exponentielles Wachstum zeigt, dieses Wachstum sich jedoch verringert, je stärker individuelle Faktoren (in diesem Fall die CO_2 -Versorgung im System) limitierend wirken, wurde zur Wachstumsbeschreibung eine Differentialgleichung (2) zur Beschreibung logistischer Wachstumsvorgänge der Form

$$Y'(t) = \mu \cdot Y(t) \cdot (K - Y(t)) \quad (2)$$

mit $Y'(t)$ als zeitlicher Veränderung der Zellzahl, μ als Faktor, $Y(t)$ als Zellzahl zum Zeitpunkt t und K als Kapazität des Systems gewählt.

Diese Differenzialgleichung setzt sich aus drei Teilen zusammen:

- ein Teil $[Y(t)]$, der das Wachstum im Kulturverlauf in Abhängigkeit der bereits vorherrschenden Zelldichte beschreibt
- ein konstanter Wachstumsfaktor $[\mu]$, der die geometrische Veränderung im Zuwachs einzelner Zellen (und somit kombiniert deren Teilungs- und Absterberaten) beschreibt
- ein Teil $[K-Y(t)]$, der die Abnahme des Zellzuwachses bei Annäherung an die Kapazität des Systems beschreibt.

Eine Auflösung dieser Differentialgleichung nach $Y(t)$, die sigmoide Funktion (3), anhand derer die Kurvenfits durchgeführt wurden, ist

$$Y(t) = Y_0 + \frac{K}{1 + e^{\left(\frac{-(t-t_w)}{\mu}\right)}} \quad (3)$$

mit

- $Y(t)$: Algenpopulation zum Zeitpunkt t [Zellen · ml⁻¹]
- Y_0 : Startpopulation [Zellen · ml⁻¹]
- K : Kapazität des Systems [Zellen · ml⁻¹]
- μ : Wachstumsfaktor [Tag⁻¹]
- t : Messzeitpunkt [Tag]
- t_w : Wendepunkt [Tag]

Das Fitting der Funktionen wurde mittels des in Gnuplot (gnuplot.info) implementierten Levenberg-Marquard-Algorithmus durchgeführt, welcher zur iterativen Lösung nichtlinearer Probleme auf Basis der Methode der kleinsten (Fehler-) Quadrate basiert.

4.2 Kulturführung und PHB Produktion

Als Versuchsobjekte dienen in allen Versuchen einzelne oder mehrere der in Tabelle 4.1 genannten Organismen.

Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten Versuchsorganismen

Organismus	SAG ¹ -Stammnummer	Anzuchtmedium	In dieser Arbeit im Folgenden verwendeter Kurzname
<i>Chlorella vulgaris</i>	211-11b	Düngermedium	<i>Chlorella</i>
<i>Nostoc muscorum</i>	1453-12b	ES-Medium / BG11-Medium	<i>Nostoc</i>

¹ SAG: Sammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen

Wenn im folgenden Teil lediglich der Kurzname eines Organismus genannt ist, so wurde stets der o.g. Organismus verwendet.

Generell wurde in allen durchgeführten Versuchen ein 16/8 Stunden hell/dunkel-Zyklus als Beleuchtungseinstellung verwendet. Die jeweiligen Temperaturen und Lichtintensitäten, sowie die in den einzelnen Versuchen verwendeten Medienvarianten sind in den detaillierten Versuchsbeschreibungen im Folgenden separat aufgeführt. Die im Folgenden beschriebenen Parameter beziehen sich auf die verwendeten Kulturen von *Nostoc muscorum*, welche im Zuge der Erstellung der PLS-Regressionsmodelle verwendet wurden. Alle Stammkulturen wurden in Erlenmeyerkolben auf einem Rotationsschüttler bei ca. 75 rpm unter einem 16/8-Stunden hell/dunkel-Zyklus angezogen. Hierbei betrug die Temperatur im Versuchsraum 26 ± 2 °C, bei einer mittleren Lichtintensität von $90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Als Lichtquelle dienten Leuchtstoffröhren des Typs Lumilux warm white sowie cool daylight (Firma Osram, München) im Verhältnis 50:50. In regelmäßigen Abständen wurden die Kulturen umgesetzt um stets Versuchskulturen ansetzen zu können, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Kultivierung geschah in ES-Medium (Medienrezepte abrufbar unter: <https://www.uni-goettingen.de/de/list-of-media-and-recipes/186449.html>), wobei je nach Versuchsvariante gewisse Mangelvarianten hergestellt wurden bzw. BG11-Medium für Cyanobakterien in weiteren Varianten zum Einsatz kam. Die in den verschiedenen Versuchsdurchläufen verwendeten Medien sowie die Zeitpunkte der Probenahme an denen jeweils auch die optischen Analysen an den Kulturen durchgeführt wurden, sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Tabelle 4.2: In den verschiedenen unabhängigen Versuchsdurchläufen genutzte Kulturbedingungen. Alle Varianten wurden (in allen Versuchen) mindestens in fünffacher Probenwiederholung angesetzt, wodurch sich die angegebenen Anzahlen der Gesamtproben ergaben. Für die Medienvarianten ohne Phosphat wurde K_2HPO_4 im Medium weggelassen, für die Stickstoffmangelvarianten betraf dies KNO_3

Versuchslauf	Medienvarianten	Messzeitpunkte	Probenanzahl (gesamt)
1	- ES-Medium - ES ohne Phosphat - ES ohne Stickstoff - ES mit Zugabe von je 2 % w/v Glucose und Natriumacetat	Jeweils nach 2, 4, 6, 8, 10 Tagen	100
2	- ES-Medium - ES ohne Stickstoff - ES mit Zugabe von je 2 % w/v Glucose und Natriumacetat	Nach 10 Tagen	85
3	- ES-Medium - ES ohne Stickstoff - ES ohne Stickstoff mit Zugabe von je 1 % w/v Glucose & Natriumacetat	Nach 21 Tagen	73
4	- ES-Medium („ES“) - BG11-Medium („BG11“) - BG11 ohne Stickstoff sowie Phosphat mit Zugabe von je 1 % w/v Glucose & Natriumacetat („BGM“)	Jeweils nach 7, 14, 21, 28 Tagen	70

Durch die eingestellten Kulturbedingungen sollte in den spektroskopisch zu untersuchenden Proben eine gewisse Bandbreite an intrazellulär vorhandenem PHB erzeugt werden. Durch die Verwendung verschiedener Anzuchtmedien, welche sich in ihrer Zusammensetzung unterschieden, wurden die in Tabelle 4.3 aufgeführten PHB-Gehalte erzielt, wobei die per Referenzanalytik bestimmten PHB-Konzentrationen auf das Trockengewicht der *Nostoc*-Kulturen bezogen wurden. Für die Erstellung der Regressionsmodelle wurde mit absoluten PHB-Gehalten pro Reaktor gerechnet, indem die erzielten *Nostoc*-Trockenmassen bei Versuchsende mit den per Referenzanalytik bestimmten prozentualen PHB-Gehalten verrechnet wurden.

Durch die eingesetzten (Mangel-) Medien konnte die gewünschte Spannweite an PHB-haltigen Proben erzeugt werden. Die minimalen PHB-Gehalte lagen in allen Versuchen bei ca. 4 % des Trockengewichts und ließen sich durch die simultane Applikation von Stickstoffmangel und Glucose- & Natriumacetatzugabe auf knapp 22 % steigern.

Auch die im Kulturverlauf erreichten Trockengewichte der Kulturen deckten einen weiten Bereich von 16 bis 1500 mg · l⁻¹ ab.

Tabelle 4.3: Bandbreite der intrazellulär vorhandenen PHB-Gehalte in den zur Regression spektral gemessenen Kulturen von *Nostoc muscorum* sowie der erreichten Trockengewichte im Kulturverlauf.

Versuch	Medienvarianten	Relative PHB-Gehalte der Kulturen (% der Trockenmasse)	Erreichte Trockengewichte (mg · l ⁻¹)
1	- ES-Vollmedium - ES ohne Phosphat - ES ohne Stickstoff - ES mit Zugabe von je 2 % w/v Glucose und Natriumacetat	4,91 - 15,34	36 - 576
2	- ES-Vollmedium - ES ohne Stickstoff - ES mit Zugabe von je 2 % w/v Glucose und Natriumacetat	4,12 - 15,15	86 - 1552
3	- ES-Vollmedium - BG11-Medium - BG11 ohne Stickstoff sowie Phosphat mit Zugabe von je 1 % w/v Glucose & Natriumacetat	3,7 - 21,94	38 - 186
4	- ES-Vollmedium - ES ohne Stickstoff - ES ohne Stickstoff mit Zugabe von je 1 % w/v Glucose und Natriumacetat	8,14 - 20,47	16 - 194

Um die im späteren Ergebnisteil aufgeführten Regressionsmodelle, sowie die ihnen zugrunde liegenden Veränderungen innerhalb der Versuchskulturen mit einem visuellen Eindruck zu unterlegen, sind in Abbildung 4.4 Bilder von *Nostoc*-Kulturen dargestellt, welche im dritten Versuchslauf (dessen Ergebnisse beispielhaft in weiteren Teilen dieser Arbeit wieder auftauchen) nach einer Kulturdauer von 3 Wochen aufgenommen wurden.

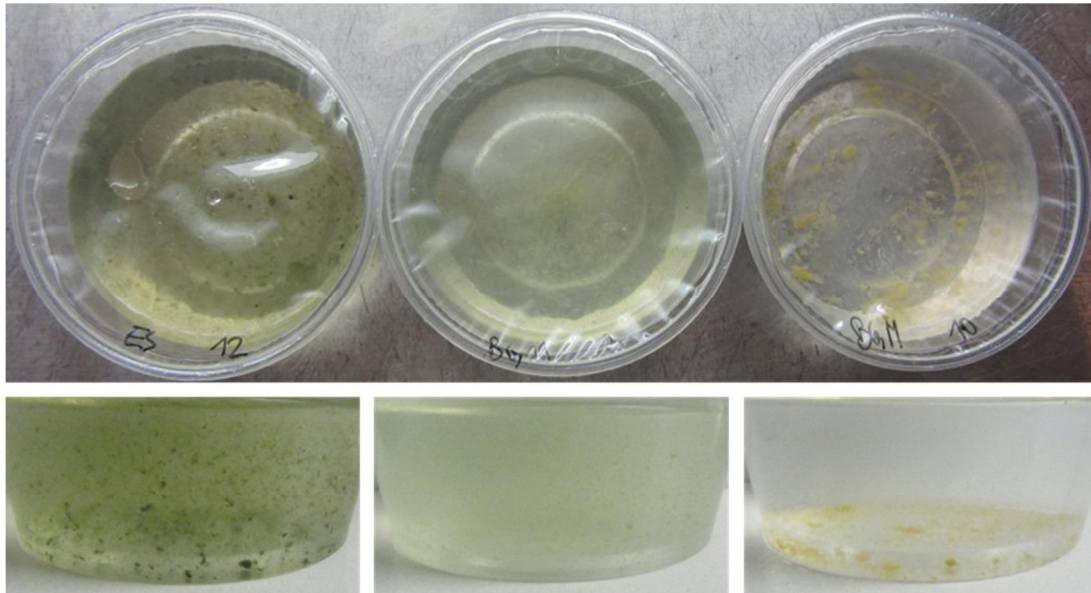


Abbildung 4.4: Bilder verschiedener Kulturen von *N. muscorum*. Gezeigt sind im oberen Bildteil Aufsichten der verschlossenen Reaktoren, im unteren Bildteil seitliche Detailansichten der Reaktorgefäße. Die Kulturen wurden in ES-Vollmedium, BG11-Vollmedium sowie BG11-Mangelmedium (jeweils von links nach rechts) für eine Dauer von drei Wochen kultiviert.

Wie zu sehen, neigten die in ES-Medium angezogenen Kulturen vermehrt zur Aggregation, während die in BG11-Medium kultivierten einen eher homogenen Eindruck machten. Die im rechten Bildteil sichtbaren Mangel-Kulturen erschienen, ebenso wie die ES-Vollmedium-Proben, relativ verklumpt und wiesen zudem eine starke Gelbfärbung auf.

Die erreichten PHB-Grundgehalte von durchschnittlich 7-8 % der Trockenmasse, welche in ungestressten Kulturen gemessen wurden, decken sich hierbei mit den von Bhati *et al.* (2010) publizierten Ergebnissen. Auch die Steigerung der intrazellulären PHB-Gehalte unter Stickstoff- bzw. Phosphatmangelbedingungen auf Werte bis weit über 15 % des Trockengewichtes deckt sich mit den von Sharma & Mallick (2005a, 2005b) genannten Daten. Abschließend ist zu erwähnen, dass die Zugabe von Glucose und Natriumacetat als Kohlenstoffquelle, bei gleichzeitig herrschenden Phosphat- bzw. Stickstoffmangelbedingungen zu der von Haase *et al.* (2012) beschriebenen Steigerung der PHB-Gehalte führte. Die teilweise mit geringen PHB-Gehalten einhergehenden sehr hohen Biomassegehalte sind durch die erwähnte Gabe von Kohlenstoffquellen bei ansonsten optimalen Kulturbedingungen zu erklären und decken sich mit den von Sharma & Mallick (2005a) genannten relativ geringen prozentualen PHB-Gehalten in exponentiell wachsenden Kulturen von *Nostoc muscorum*.

4.3 PHB-Referenzanalytik

Alle spektrometrischen Bestimmungen der intrazellulären PHB-Gehalte wurden jeweils gegen eine Referenzanalytik durchgeführt. Dies diente dazu, die chemometrisch bestimmten PHB-Gehalte den tatsächlich in den Kulturen existenten PHB-Mengen gegenüberstellen zu können.

Als Referenzanalytik diente die von Haase *et al.* (2012) beschriebene Methode, wobei die PHB-Extraktion nach De Gelder *et al.* (2008) mit dem photometrischen PHB-Nachweis (nach Umwandlung desselben in Crotonsäure), durchgeführt nach Law und Slepecky (1961), kombiniert wurde. Hierfür wurden die Kulturen zunächst bei 5000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet bei 80 °C für 48 Stunden getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden nachfolgend gewogen und manuell mittels Glasstäben bestmöglich gemörsert. Anschließend wurden 5 bis 10 mg Probenmaterial im Wasserbad bei 99 °C in 5 ml 96 prozentiger Schwefelsäure (Merck KGaA, Darmstadt) für 60 Minuten aufgekocht. Dieser Schritt diente neben dem Zellaufschluss der Umwandlung des PHB in Crotonsäure. Nach der Säurebehandlung wurden alle Proben im Verhältnis 1:50 mit reiner Schwefelsäure verdünnt und gegen Schwefelsäure als Blank bei 235 nm photometrisch vermessen. Die Berechnung der PHB-Gehalte aus den bei 235 nm gemessenen Extinktionswerten erfolgte mittels Kalibrierkurven, welche aus reinem PHB (Merck KGaA, Darmstadt) erstellt wurden wobei die Kalibrierproben analog zu den cyanobakteriellen Pellets in Säure aufgekocht und vermessen wurden.

Einzig problematisch waren in Vorversuchen aufgetretene Schwierigkeiten bei der Homogenisierung des Probenmaterials, welche nötig war um einen komplette Säureaufschluss der Zellpellets zu ermöglichen. Diese Problematik erwies sich jedoch durch einen sauberen und reproduzierbaren Workflow als vermeidbar, weshalb an dieser Stelle die Notwendigkeit einer stets gleichen Probenbehandlung betont werden soll.

4.4 Optische *In-situ*-Analysen

Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die vergleichende Erprobung bzw. Anwendung verschiedenster optischer Methoden sein, mit deren Hilfe eine umfassende Charakterisierung unterschiedlicher Kulturparameter realisiert werden sollte. Da im Zuge der durchgeführten Versuche vielseitige Techniken eingesetzt wurden, werden im Folgenden alle verwendeten und entworfenen Versuchsssetups und -parameter beschrieben.

Um jedoch unnötige Dopplungen zu vermeiden, seien an dieser Stelle zunächst jene Versuchsmaterialien und -methoden beschrieben, die für mehrere Spektroskopietechniken relevant waren:

Extinktionsmessungen

Dezidiert hervorzuheben sei an dieser Stelle, dass es sich bei vielen spektroskopischen „Absorptionsmessungen“ oftmals nicht wirklich um reine Absorptionen handelt. Insofern die durch eine Probe gestreute Strahlung nicht explizit dem Detektor des Messsystems zugeleitet wird, sind diese Streulichtverluste ein u.U. essentieller Bestandteil der apparenten Absorption. Die somit aufgenommenen Messpektren sind somit oftmals Extinktionsspektren, in denen Absorptions- und Streulichtverlusteffekte additiv wirken. Es sei deshalb erwähnt, dass auch die in dieser Arbeit gemessenen VIS-Spektren Extinktionsspektren sind. Dabei wurden die Extinktionen (E) nach dem Lambert-Beerschen Gesetz anhand des Quotienten von nach Probendurchtritt gemessener (I_1) zu einfallender Strahlung (I_0) ermittelt. Der allgemeine Zusammenhang ist hierbei:

$$E = \lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right)$$

beziehungsweise

$$E = \varepsilon \cdot k \cdot D$$

wobei die Extinktion auch als Produkt von Schichtdicke der vermessenen Suspension (D), der Konzentration des Zielstoffes (k) sowie des dekadischen Extinktionskoeffizienten (ε) gegeben ist. Letztgenannter kann dabei direkt aus Extinktionsspektren ermittelt werden sofern die Werte aller anderen Formelglieder bekannt sind.

Vergleich von Küvetten- und *In-situ*-Spektren

Aufgrund der äußerst unterschiedlichen Geometrie der geschlossenen Reaktoren im Vergleich mit Küvetten galt es zu klären, inwiefern im Reaktor aufgenommene Spektren mit solchen, die in Küvetten gemessen wurden, direkt vergleichbar sind. Abbildung 4.5 gibt zunächst einen groben Überblick der unterschiedlichen Messaufbauten.

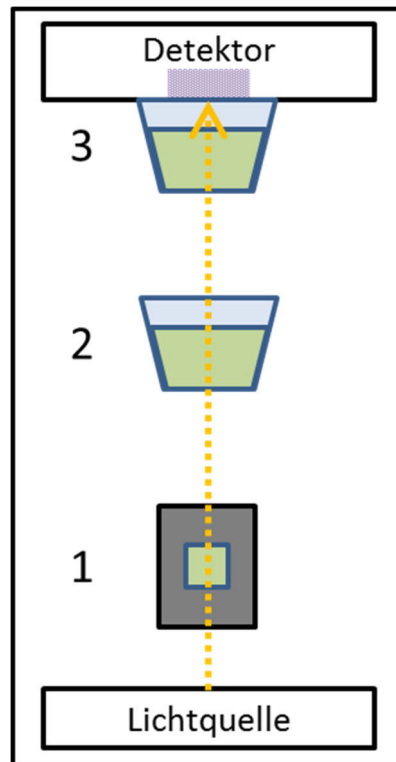


Abbildung 4.5: Übersicht der Probenpositionierung innerhalb des verwendeten Spektrometers bei Durchführung von Extinktionsmessungen in Küvetten (1), in einer Halterung fixierter Reaktorbehälter (2) sowie bei Platzierung der Reaktorgefäße direkt vor der Detektoröffnung (3). In Gelb ist die Richtung des Strahlenganges skizziert.

Hierbei sind drei Probenpositionierungen gezeigt, die separat untersucht wurden.

- Es wurden Messungen in senkrecht stehenden Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemacht,
- Messungen in Reaktoren bei einer Reaktorplatzierung (ca. auf halber Wegstrecke) zwischen Lichtquelle und Detektor,
- sowie Messungen in Reaktoren bei einer Reaktorplatzierung direkt vor der Detektionsintegrationskammer.

In allen drei Positionen und Behältern wurden Extinktionsspektren der Verdünnungen einer Kultur von *Chlorella vulgaris* sowie von grüner Malertusche vermessen.

Reproduzierbarkeit der *In-situ*-VIS-Spektroskopie

Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie verlässlich die Akquise von Spektraldaten im geschlossenen System möglich ist, wurden vergleichende Untersuchungen zur Streuung der Spektraldaten im Vergleich zu Küvettenmessungen als Referenzsystem durchgeführt. Hierzu wurden von *Chlorella* Kulturen jeweils 5 Extinktionsspektren nach jeweiliger Neueinbringung der Proben in das jeweilige Messsystem aufgenommen. Die Extinktionsvarianzen sollten hierbei eine Aussage über erzielbare Messgenauigkeiten liefern. Bei Messungen der geschlossenen Reaktoren wurden zudem vorsätzliche Positionierungsfehler vorgenommen, um die Auswirkung falscher Probenpositionierungen zu erfassen. Diese Spektren sind in den jeweiligen Darstellungen explizit benannt.

PHB-Referenzspektren für verschiedene Wellenlängenbereiche

Um Referenzspektren von PHB zu erfassen, anhand derer stoffspezifische Extinktionsmuster erkannt werden sollten, wurde kristallines PHB in Wasser suspendiert. Die Suspensionen wurden in verschiedenen Wellenlängenbereichen mittels der im Folgenden beschriebenen Methoden vermessen.

4.4.1 NIR-Messungen optischer Dichten

Zur nicht-invasiven Bestimmung von Kulturdichten wurde ein System entworfen, welches im nah-infraroten Spektralbereich arbeitet. Hierbei wurde die Abschwächung einer Strahlungsquelle durch die Kultursuspension gemessen. Als Emittor diente eine engbandige NIR-LED des Typs SFH 4550 (Osram Opto Semiconductors GmbH, Regensburg), welche ihr relatives Emissionsmaximum bei 850 nm besitzt.

Als Detektor wurde eine Photodiode des Typs SFH 203 (Fa. Osram) gewählt, welche ihre maximale Photoempfindlichkeit bei 850 nm besitzt.

Der bei Strahlungseinfall in der Photodiode entstehende Photostrom wurde mittels eines Messwiderstandes in eine proportionale Spannung umgewandelt und nachfolgend aufgezeichnet. Um die Abschwächungssignale mit realen Zellzahlen korrelieren zu können, wurden für jeden zu überwachenden Organismus eigene Kalibrierreihen mittels Zellzahlbestimmungen in einer Thoma-neu-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen) als Referenzsystem erstellt. Hierdurch konnte sodann aus den Spannungssignalen direkt die vorherrschende Zellzahl berechnet wer-

den. Als Regressionsmodell wurde dabei eine Logarithmusfunktion gewählt, um „zu geringe“ Extinktionen bei hohen Zellzahlen, bedingt durch Beschattungseffekte der einzelnen Zellen, einzubeziehen.

4.4.2 Chlorophyllfluoreszenz-Messungen

Alle Fluoreszenzmessungen wurden an einem Open FluorCam FC 800-0/1010-System der Firma Photon System Instruments (Drasov, Tschechische Republik) durchgeführt. Die Intensität der Sättigungspulse wurde auf $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ eingestellt und die des aktinischen Lichts auf jene, welche auch in den Anzuchtversuchen als Beleuchtungsstärke gewählt wurde. Alle Proben wurden vor den Messungen für 30 bis 40 Minuten dunkeladaptiert und die Messungen fanden direkt im geschlossenen Reaktorsystem statt. Abschließend wurde aus den gemessenen Parametern Grundfluoreszenz (F_0) und maximale Fluoreszenz (F_m) nach der Formel $Q_{Y_{\max}} = (F_m - F_0) / F_m$ die maximale Quanteneffizienz ($Q_{Y_{\max}}$) berechnet.

4.4.3 VIS-Spektroskopie

Die Spektrenaufnahme im sichtbaren Spektralbereich erfolgte mit einem USB4000-Spektrometer der Firma Ocean Optics GmbH (Ostfildern-Nellingen), welche mittels Glasfasern mit einem Durchmesser von $400 \mu\text{m}$ an eine Mikropack Halogenlampe (Modell HL-2000-FHSA; Fa. Ocean Optics GmbH) angeschlossen wurde. Hierbei konnten aufgrund der teilweise sehr hohen Absorptionen durch die zellulären Pigmente keine Schichtdicken größer als 2 cm verlässlich vermessen werden, wodurch lediglich zwei Versuchssetups realisiert wurden:

1. Messungen in Quarzküvetten (welche als Referenzaufbau dienten, in denen eine Beeinflussung der Regressionsergebnisse durch den Reaktor an sich ausgeschlossen werden konnte) mit einer Schichtdicke von 1 cm
2. Messungen im geschlossenen Reaktor bei vertikalem Strahlengang (welche vor allem ein Absinken der Zellen während des Messvorgangs ausgleichen sollten, da stets auch die abgesunkenen Zellen im Strahlengang verblieben) mit einer Schichtdicke von 1,7 cm

Eine schematische Darstellung der Versuchsaufbauten ist in Abbildung 4.6 gegeben, weitere Details sind im Ergebnisteil dieser Arbeit aufgeführt.

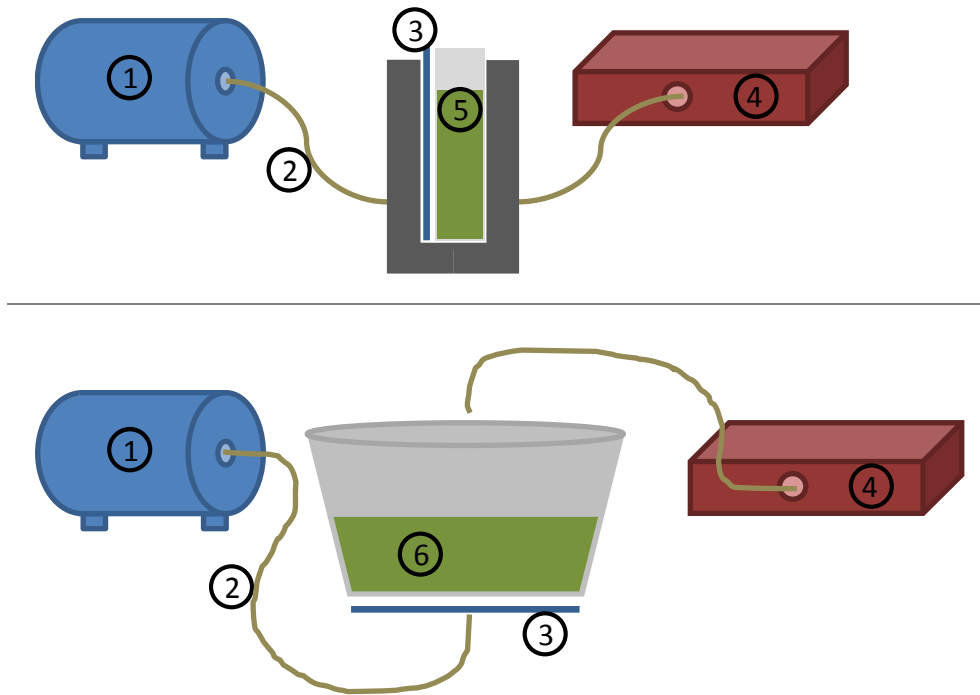


Abbildung 4.6: Schematische Versuchsaufbauten der spektroskopischen Messungen im VIS-Bereich mittels USB4000 Spektrometer. Oben: Messungen in Quarzküvetten; Unten: Messungen im Photobioreaktor. 1: Unpolarisierte Lichtquelle, 2: Lichtleiter, 3: optional installierter zirkularer Polarisationsfilter, 4: Spektrometer, 5: Quarzküvette mit Cyanobakteriensuspension, 6: Einweg-Photobioreaktor mit Cyanobakteriensuspension

Die in dieser Darstellung gezeigten Polarisationsfilter wurden in diesem Versuchsteil nicht genutzt, fanden jedoch Verwendung im polarisationsspektroskopischen Versuchsteil. Alle VIS-Extinktionsspektren wurden mit einer Auflösung von 3 Messpunkten pro Nanometer bei einer Integrationszeit von 0,1 Sekunden aufgenommen, wobei für jede Probe 10 Einzelspektren aufgenommen und gemittelt wurden. Vor der chemometrischen Auswertung wurden alle VIS-Spektren über 5 Nanometer geglättet, um hochfrequente Rauschteile in den Spektren zu minimieren.

4.4.4 NIR-Spektroskopie

Alle Messungen im NIR-Bereich fanden in einem geschlossenen Lambda 900 Spektralphotometer der Firma Perkin Elmer (Besweiler, Deutschland) statt. Als Versuchorganismen wurden *Nostoc muscorum* Kulturen in drei Versuchsaufbauten vermessen:

1. Messungen in Glasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm (Referenz)
2. Messungen bei horizontalem Strahlengang vermessen mit um 90° gekippten Reaktoren, wodurch die effektive Schichtdicke der Kultursuspension 3,8 cm betrug.

3. Messungen direkt im PBR bei vertikalem Strahlengang des Messlichtes, während die Reaktorbehälter horizontal ausgerichtet waren, so dass sich für die Flüssigphase eine Dicke von 1,7 cm ergab

Die Versuchsaufbauten sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

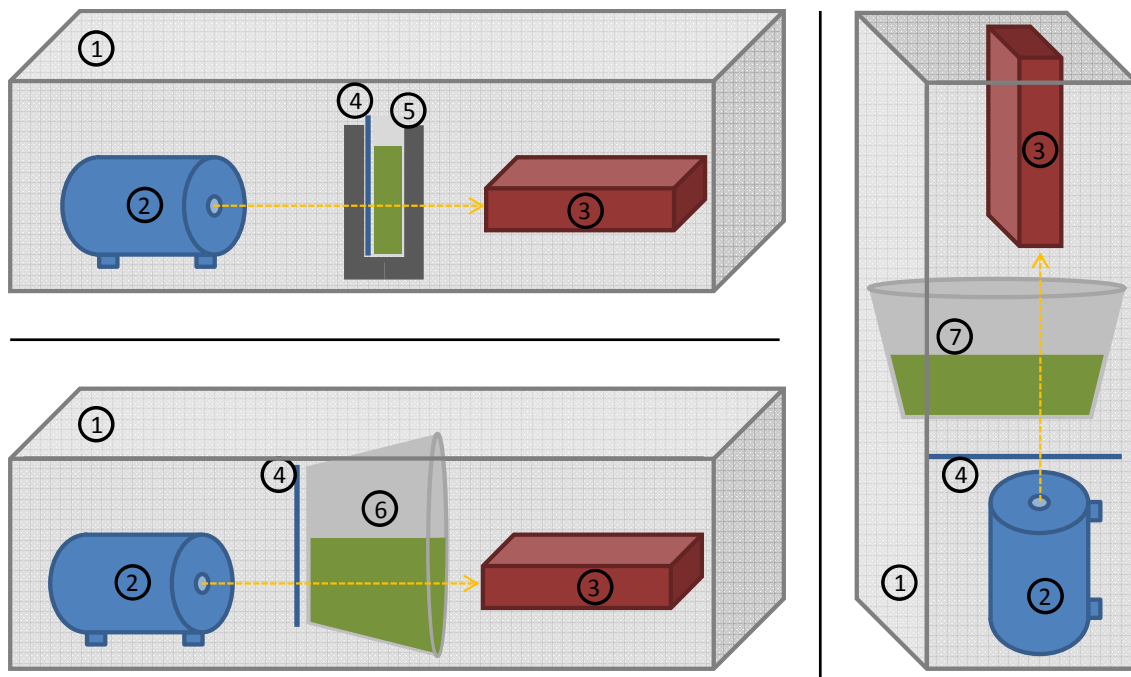


Abbildung 4.7 Schematische Versuchsaufbauten der spektroskopischen Messungen im NIR-Bereich mittels Lambda 900 Spektrometer. Links oben: Messungen in Quarzküvetten; Links unten: Messungen im Photobioreaktor bei horizontalem Strahlengang; Rechts: Messungen im Photobioreaktor bei vertikalem Strahlengang. 1: Gehäuse, 2: unpolarisierte Lichtquelle, 3: Detektor, 4: optional installierter zirkularer Polarisationsfilter (siehe nachfolgendes Kapitel „Polarisationsspektroskopie“), 5: Glasküvette mit Cyanobakteriensuspension, 6: Einweg-Photobioreaktor mit Cyanobakteriensuspension mit einer Schichtdicke von 3,8 cm, 7: Einweg-Photobioreaktor mit Cyanobakteriensuspension mit einer Schichtdicke von 2 cm.

Um die Reaktorgefäße auch im vertikalen Strahlengang vermessen zu können wurde ein System entworfen, mit dem es möglich war, das gesamte Spektrometer schnell und reversibel auf die Seite zu kippen. Zudem wurde eine Becherhalterung integriert, welche das Verbringen der Proben in den Strahlengang ermöglichte.

Die Spektren wurden mit einer Auflösung von 2 nm je Messschritt im single beam Modus aufgenommen für einen Bereich von 900 bis 1300 Nanometern, wobei die Integrationszeit je Messpunkt bei 0,1 Sekunden lag.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die Messstrahlung des verwendeten Spektrometers stets linear polarisiert war, weshalb keine „unpolarisierte“ Messstrahlung per se

nutzbar war. Da die Reaktormaterialien kaum dichroitisch waren, traf somit ohne weitere Polarisationsmodulation linear polarisierte Strahlung auf die Proben. Durch die Tatsache, dass die Organismen innerhalb der Kultursuspensionen jedoch chaotisch ausgerichtet vorlagen und keine bevorzugte Polarisationssebene der Zelleigenschaften gegeben war, kann die letztlich zur Analyse der Kultursuspension genutzte Anregungsstrahlung im Folgenden als äquivalent zu unpolarisierter Strahlung angesehen werden.

4.4.5 VIS-Polarisationspektroskopie

Da bedingt durch induzierten Nährstoffmangel und Alterungsprozesse innerhalb der Versuchskulturen Veränderungen im Pigmentapparat der Zellen zu erwarten waren, wurden unter anderem Versuche im sichtbaren Spektralbereich (VIS) durchgeführt.

Als Lichtquelle wurde eine unpolarisiertes Licht aussendende Halogenlampe des Typs Halogen HL-2000-FHSA (Firma Ocean Optics GmbH) verwendet, welche mittels der in Tabelle 4.4 aufgeführten Polfilter zirkularisiert wurde.

Tabelle 4.4: Übersicht der für den sichtbaren Spektralbereich verwendeten Polarisationsfilter

Filter	Polarisationsverhalten	Material	Wellenlängenbereich (nm)	Transmission (%)	Hersteller
SCP 42HD-LH	zirkular linksdrehend	Plastik	400 – 700	45	Polfilter24
SCP 42HD-RH	zirkular rechtsdrehend	Plastik	400 – 700	45	Polfilter24

Als Detektor diente ein USB4000-Spektrometer der Firma Ocean Optics. Eine Skizze des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 4.6 gegeben, wobei in diesem Versuchsteil die eingezeichneten Polarisationsfilter verwendet wurden.

Alle VIS-Polarisationspektren wurden mit einer Auflösung von 3 Messpunkten pro Nanometer bei einer Integrationszeit von 0,1 Sekunden aufgenommen, wobei für jede Probe 10 Einzelspektren aufgenommen und gemittelt wurden. Vor der chemometrischen Auswertung fand keine Glättung der Spektraldaten statt, lediglich die im Ergebnisteil beispielhaft gezeigten VIS-Spektren wurden vor der Darstellung über 3 Nanometer geglättet, um hochfrequente Rauschanteile in den Spektren zu minimieren und eine bessere visuelle Einordnung zu ermöglichen.

Zur Berechnung der Circular dichroismen wurden in dieser Arbeit stets Differenzspektren der linksdrehenden minus der rechtsdrehenden Extinktionswerte durch Subtraktion der jeweiligen Extinktionsintensitäten gebildet.

Die oben genannten Filter wurden auch verwendet, um das Verhalten der Polymermaterialien unter Kreuzpolarisation zu ermitteln. Hierzu wurden gekreuzte Polarisationsfilter übereinandergelgt, so dass kein Licht transmittiert wurde. Nachfolgend wurden die in dieser Arbeit verwendeten Polymermaterialien sowie weitere Referenzproben (z.B. Glas) zwischen die Filter verbracht, Bildaufnahmen gemacht um anhand der auftretenden interferenzbedingten Farbmuster Aussagen über das polarisationsmodulierende Verhalten der Materialien zu erhalten. Hierbei sei erwähnt, dass das Ausmaß der beobachteten Doppelbrechung wellenlängenabhängig ist und die in dieser Arbeit ermittelten Polarisationszustände lediglich eine grobe Näherung über den gesamten Spektralbereich darstellen.

4.4.6 NIR-Polarisationsspektroskopie

Im nah-infraroten Spektralbereich (NIR) waren vor allem signifikante spektrale Signaturen bedingt durch Obertonschwingungen von CH-Bindungen (850 – 1000 nm sowie 1100 – 1300 nm) und OH-Bindungen (1000 – 1200 nm) zu erwarten (Abbate *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurde als Polarisationsmodulator eine achromatische $\lambda/4$ -Verzögerungsplatte aus Quarz-Kristall (mit MgF_2) der Firma Edmund Optics (Karlsruhe, Deutschland) verwendet, welche aus linear polarisiertem Licht je nach Versuchsaufbau zirkular rechts-, bzw. linksdrehend polarisiertes Licht erzeugt. Das wellenlängenabhängige Verzögerungsverhalten ist in Abbildung 4.8 dargestellt.

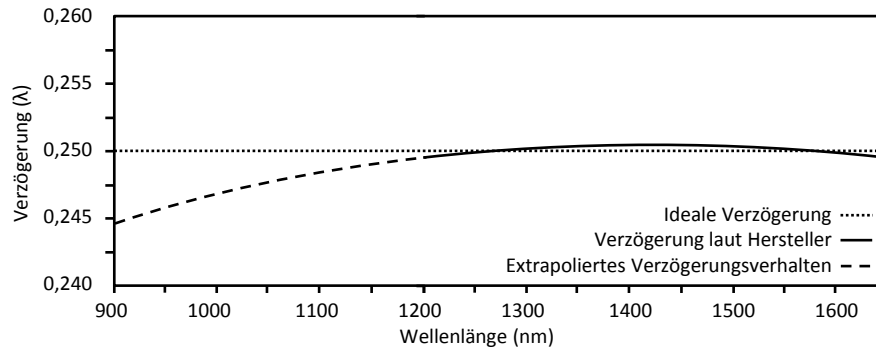


Abbildung 4.8: Wellenlängenabhängiges Verzögerungsverhalten der langsamen optischen Achse der verwendeten $\lambda/4$ -Verzögerungsplatte nach Herstellerspezifikation (—), extrapoliertes Verzögerungsverhalten nach eigenen Überlegungen (---) und theoretisch optimale achromatische Verzögerung (····). Es sei darauf hingewiesen, dass die gezeigte Extrapolation lediglich ein vermutetes Verzögerungsverhalten im Wellenlängenbereich von 900 bis 1200 darstellt, welches tatsächlich von der gezeichneten Verlaufskurve differieren kann! (Quelle: Eigene Darstellung, adaptiert nach <https://www.edmund-optics.de/optics/polarizers/waveplates-retarders/25.4mm-dia-1200-1650nm-lambda4-achromatic-waveplate/#resources>; Zugriff am 27.04.2017)

Aufgrund der Verwendung von zwei verschiedenen Kristallmaterialien besitzt diese achromatische Verzögerungsplatte eine (in engen Grenzen) relativ konstante Phasenverschiebung unabhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lichts, so dass ein breiter Messbereich genutzt werden kann. Da das Verzögerungsverhalten im Bereich unterhalb von 1200 nm jedoch nicht exakt bekannt war und lediglich abgeschätzt werden konnte sowie aufgrund der extrem hohen Absorption von Wasser oberhalb von 1400 nm, wurden lediglich Messungen im Bereich von 900 bis 1300 nm durchgeführt. Die Messungen wurden in einem Lambda 900 Spektralphotometer der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Das werksseitig vertikal linear polarisierte Licht wurde mittels der o.g. Verzögerungsplatte zirkularisiert. Die Messungen wurden mit einer Auflösung von 2 nm durchgeführt bei einer Integrationszeit von 0,1 Sekunden. Die verwendeten Versuchsaufbauten sind schematisch in Abbildung 4.7 dargestellt, wobei die aufgeführten Polfilter in diesem Versuchsteil Verwendung fanden.

Zur Berechnung der Circular dichroismen wurden in dieser Arbeit stets Differenzspektren der linksdrehenden minus der rechtsdrehenden Extinktionswerte durch Subtraktion der jeweiligen Extinktionsintensitäten gebildet.

4.4.7 Raman-Spektroskopie

Mittels Raman-Spektroskopie können sehr spezifisch Substanzen anhand ihrer spektralen Signaturen detektiert und mit geeigneten Versuchsaufbauten sogar quantifiziert wer-

den. Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Versuchsansätze gewählt, um diese Art der Spektroskopie zu nutzen.

4.4.7.1 Konfokale Raman-Mikrospektroskopie

Um Referenzspektren von reinem PHB aufzunehmen, wurden zunächst Versuche an einem konfokalen Mikroskop durchgeführt, an welches ein Raman-Spektrometer gekoppelt war. Diese Versuche wurden im Institut für Biophysik der Leibniz Universität Hannover durchgeführt, wobei als Mikroskop ein CRM200 der Firma WITec GmbH (Ulm) genutzt wurde, welches an ein Acton 308-SP-Spektrometer der Firma Princeton Instruments (Acton, USA) gekoppelt war. Als Lichtquelle diente ein frequenzverdoppelter Nd-YAG-Laser und die Laser-Anregungswellenlänge betrug 532 nm, bei einer Strahlintensität von ca. 37 mW. Zur Fokussierung wurde ein 20x CFI Fluor Objektiv der Firma Nikon GmbH (Düsseldorf) bei einer Integrationszeit von 0,5 Sekunden verwendet. Als Detektor diente eine DU401-BV CCD-Kamera der Firma Andor plc. (Belfast, UK), welcher auf -70 °C heruntergekühlt wurde.

4.4.7.2 VIS-Raman-Spektroskopie

Nach der Aufnahme von Referenzspektren von reinem PHB sowie verschiedener Algen- und Cyanobakterienkulturen, sollten diese Messungen auf ganze Kulturen übertragen werden. Hierfür wurde ein Versuchsaufbau am Zentrum für Optische Technologien der Leibniz Universität Hannover genutzt. Als Lichtquelle wurde ein Nd-YAG-Laser der Firma EKSPILA (Vilnius, Litauen), Modell NL303G verwendet, dessen Emissionswellenlänge von 1064 nm mittels eines optisch parametrischen Oszillators (Firma EKSPILA, Modell PG122/UV) auf die jeweils gewünschte Anregungswellenlänge modifiziert wurde. Zur Führung der Anregungs- sowie der Streustrahlung wurde eine Quarzglasfaser mit einem Durchmesser von 800 µm in Y-Konfiguration verwendet. An einem „Arm“ wurde dabei die Anregungsstrahlung eingekoppelt und in den Messkopf geführt, der andere „Arm“ wurde verwendet, um das an der Probe gestreute Licht in den Detektor zu leiten. Die spektroskopische Aufteilung des Streulichts erfolgte mit einem Shamrock-500i-Spektrograf (Andor Technology plc., Belfast, UK), als Detektor wurde eine CCD-Kamera (Modell Newton 940) desselben Herstellers verwendet. Die Ansteuerung des Spektrometers sowie des Detektors erfolgte mittels der Software „Solis for spectroscopy“ (Fa. Andor Technology plc., Belfast), wohingegen die Software zur Laser-

steuerung eine Eigenentwicklung des Hannoverschen Zentrums für optische Technologien war. Eine schematische Übersicht des verwendeten Versuchssetups ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

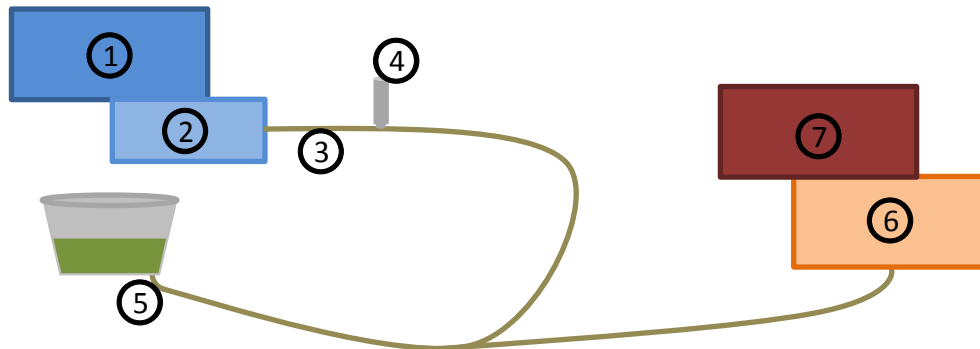


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Aufnahme von Raman-Spektren. 1: 1064-nm-Nd-YAG-Laser, 2: Optisch-parametrischer Oszillator, 3: Quarzglasfaser, 4: Photodiode zur Intensitätskontrolle der emittierten Laserstrahlung, 5: Faserkopf zur Einkopplung der Anregungsenergie in die Probe sowie zur Aufnahme der emittierten Raman-Strahlung, 6: Spektrograf, 7: CCD-Kamera

Da es sich bei der Anregungslichtquelle um einen gepulsten Laser handelte, dessen einzelnen Emissionspulse sich in ihrer Intensität unterscheiden können, wurde zusätzlich eine Photodiode in den Messaufbau implementiert, mit deren Hilfe die Intensität der einzelnen Pulse erfasst werden konnte. Damit wurde sichergestellt, dass die jeweils einzubringende Gesamt-Anregungsenergie für alle Proben gleich war, indem die Anzahl der emittierten Pulse je Probe automatisch angepasst wurde.

Die einzelnen Emissionspulse hatten eine Dauer von 4 Nanosekunden, alle Spektren wurden mit einer eingekoppelten Gesamtenergie von 1 J aufgenommen. Der Mittelpunkt der gemessenen Spektren wurde auf eine Verschiebung von 1300 Wellenzahlen cm^{-1} relativ zur Anregungswellenlänge gelegt⁹, um eine bestmögliche Auflösung der Spektren zu erzielen, welche bei annähernd 10 Pixeln pro Nanometer lag.

Eine vor Beginn der Messungen durchgeführte Wellenzahlen-Kalibrierung anhand einer Probe aus reinem Ethanol (deren Raman-Peak-Lage bekannt war) diente dazu, eventuelle Verschiebungen der gesamten gemessenen Spektren erkennen und korrigieren zu können.

⁹ Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (was einer Angabe in Wellenzahlen von ca. 20492 cm^{-1} entspricht \pm) entspricht die gewählte zentrale Detektionswellenzahlverschiebung relativ zum Anregungslaser von 1300 cm^{-1} einer Absolutwellenlänge von 521 nm.

Alle zu untersuchenden *Nostoc*-Proben sowie verschiedene PHB-Verdünnungsreihen wurden direkt im geschlossenen Photobioreaktor vermessen. Eine Detailansicht des Faserkopfes, welcher dazu diente, das Anregungslicht in die Probe, sowie die Raman-Strahlung zum Detektor zu leiten, ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

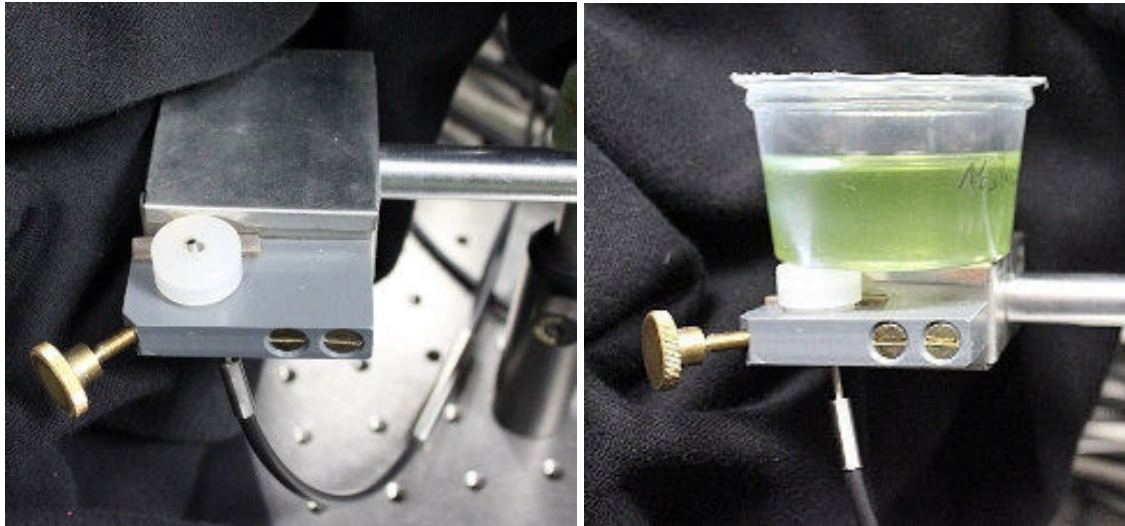


Abbildung 4.10: Für die Raman-Spektroskopischen Messungen an ganzen Kulturen verwendetes Versuchsaufbau. Links: Detailansicht des Faserkopfes, mittels welchem das Anregungslicht in die Kulturen, sowie die Raman-Signale in den Detektor geleitet wurden. Rechts: Versuchsaufbau mit *Nostoc*-Probe und (mittels Faser-Beleuchtung durch eine Taschenlampe) angedeutetem Strahlengang des Anregungslasers.

Um zu bestimmen, bei welcher Anregungswellenlänge die gemessenen Raman-Spektren eine größtmögliche Qualität aufwiesen, wurde zunächst eine Referenzkultur von *Nostoc muscorum* im Anregungsbereich von 440 bis 514 nm vermessen, da der Versuchsaufbau bedingt durch die nötigen Anregungslaser-Sperrfilter auf diesen Bereich begrenzt war. Nach Auswertung der Versuchsergebnisse (siehe Abschnitt 5.2.8) wurde für alle nachfolgenden Versuche eine Anregungswellenlänge von 488 nm gewählt. Vor dem Abspeichern der Spektren wurde jeweils ein mit ausgeschaltetem Anregungslaser aufgenommenes Dunkelspektrum subtrahiert um messsystembedingte Störeinflüsse zu eliminieren.

Die somit gemessenen Spektren wurden vor ihrer Verwendung in der Regression zur Bestimmung der PHB-Gehalte verschiedenen Vorbehandlungen unterzogen:

1. Zuschneiden der Gesamtspektren auf verwertbare Messbereiche
2. Entfernen von Störsignalen aufgrund defekter Kamerapixel

3. Grundlinienkorrektur zum Entfernen von Fluoreszenzsignalen

Zu 1: Als Spektralbereich wurde jener Bereich mit einer Verschiebung von 700 bis 1800 Wellenzahlen cm^{-1} relativ zur Laserwellenlänge genutzt.

Zu 2: Es wurden manuell defekte Pixel aus den Spektraldaten entfernt, welche sich durch Intensitätswerte unterhalb der spektralen Grundlinie bemerkbar machten.

Zu 3: Die Grundlinienkorrektur erfolgte vergleichbar zu dem rolling-circle-Ansatz von Mikhailyuk & Razzhivin (2003) nach dem von Koch *et al.* (2017a) vorgestellten Algorithmus zur Grundlinienkorrektur mit Hilfe von eingedrückten, horizontalen Geraden. Hierbei wurden die Spektren zunächst über eine Breite von 6 Messpunkten geglättet und nachfolgend mit einer Linienbreite von 180 Messpunkten in 5 Durchläufen grundlinienkorrigiert. Für eine genaue Beschreibung des Algorithmus sowie seiner Eigenschaften sei auf Koch *et al.* (2017a) verwiesen.

Die derart behandelten Daten wurden nachfolgend auf Ausreißer kontrolliert (für Details siehe Abschnitt 4.5.2) und zur chemometrischen PHB-Bestimmung verwendet.

4.4.7.3 NIR-Raman-Spektroskopie

Um Fluoreszenzeffekte zu vermeiden und somit Spektren aufzunehmen, welche einen geringeren Aufwand im Hinblick auf Vorverarbeitungsschritte bei der Datenauswertung bedeuten, wurde als Methode die Aufnahme von Raman-Spektren nach Anregung im NIR-Bereich getestet. Hierbei wurde ein Xantus-1-Spektrometer der Firma Rigaku (The Woodlands, Texas) verwendet. Die Aufnahme der Spektren geschah bei einer Anregungswellenlänge von 1064 nm, mit einer Leistung von 490 mW. Als Anregungsdauer wurden verschiedene Varianten getestet, da die verwendeten Proben (PHB-Reinsubstanz sowie verschiedene Cyanobakterien-Proben) unterschiedliche Anregungsverhalten zeigten. Alle Spektren wurden für einen Verschiebungsbereich relativ zur Anregungswellenlänge von 200 bis 2150 cm^{-1} aufgenommen¹⁰.

4.5 Chemometrische Auswertung von Spektraldaten

In dieser Arbeit wurden alle gemessenen Spektren, ungeachtet dessen, welches Messverfahren angewendet wurde, als ASCII-Dateien oder Textdateien gespeichert bzw. exportiert. Diese Dateien konnten somit für einfache Betrachtungen und Sortierschrit-

¹⁰ Bei einer Anregungswellenlänge von 1064 nm entspricht dies einem Spektralbereich von 1099 - 1380 nm.

te in Excel (Microsoft Corporation, Redmond), für die Erstellung von Diagrammen mit der freien Software Gnuplot (gnuplot.info) sowie für chemometrische Auswertungen mittels The Unscrambler X (Camo Software AS, Oslo) direkt verwendet bzw. einfach importiert werden.

4.5.1 Vorbehandlung von Spektraldaten

Die Vorbehandlung von Spektraldaten dient vor allem dazu, unerwünschte Informationen, bzw. Datenanteile welche keinerlei sinnvolle Informationen außer Rauschen o.ä. enthalten, aus gemessenen Spektren zu eliminieren (Rinnan *et al.*, 2009) oder gewünschte Informationen zu prononcieren. Folgende Verfahren wurden in dieser Arbeit verwendet:

1. Glättung von Spektraldaten

Da es widersprüchliche Aussagen darüber gibt, inwiefern eine Glättung von Spektraldaten vor Durchführung von PLS-Regressionen die Regressionsergebnisse verbessert, viele Autoren jedoch keinen Vorteil bzw. keine Verringerung der Modellfehler durch Glättungen erreichen konnten, wurde auf Glättungsschritte komplett verzichtet.

2. Ausreißerentfernung

Alle Datensätze wurden vor ihrer Verwendung zur Erstellung von Regressionsmodellen einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) unterzogen, um einen Überblick über den Datensatz zu erhalten. Die Ergebnisse der PCA wurden dazu genutzt, um statistisch signifikante Ausreißer¹¹ in den Spektraldaten zu erkennen. Mittels Hotelling T^2 Test der Varianzverteilung wurden (anhand der Mahalanobis-Distanz der projizierten Spektren) bei einem Konfidenzintervall von 95 % jene Spektren identifiziert, deren Varianz signifikant von der Grundgesamtheit abwich. Die so identifizierten Spektren wurden nachfolgend aus dem jeweiligen Datensatz entfernt.

3. Grundlinienkorrektur

In dieser Arbeit wurden eine simple Offset-Korrektur sowie eine lineare Grundlinienkorrektur verwendet.

4. Normierung

¹¹ Ein anschauliches Beispiel hierfür war eine mit Bakterien kontaminierte Kultur von Cyanobakterien, welche sich sowohl visuell als auch aufgrund des stark abweichenden Extinktionsspektrums in der durchgeführten PCA der Spektraldaten eindeutig von den übrigen Proben unterscheiden ließ.

Als Normierungsverfahren fanden Mittelwert-, sowie Flächen- und Einheitsvektornormierungen Anwendung.

5. Streulichtkorrektur

Als Verfahren zur Streulichtkorrektur wurden Detrending (mit Polynomen zweiter Ordnung) und eine Standard-Normal-Variate-Transformation verwendet. Multiplikative Streulichtkorrekturen oder orthogonale Signalkorrekturen wurden nicht verwendet, da sie stets ein Referenzspektrum erfordern, welches in den durchgeführten Versuchsreihen nicht gegeben war.

6. Ableitungen

Es wurden Polynomfit-basierte Ableitungen ersten und zweiten Grades angewendet, welche nach Savitzky-Golay-Algorithmen (Savitzky und Golay, 1964) berechnet wurden. Hierbei wurden symmetrische Fensterbreiten von 3 (bei Messungen im VIS-Bereich¹²) bzw. 5 Nanometern (bei Messungen im NIR-Bereich) und Polynome dritten Grades verwendet.

7. Modellzentrierung

Die Entscheidung für oder gegen eine Mittenzentrierung ist nicht unbedingt a priori treffbar und oftmals abhängig vom zu untersuchenden Datensatz. Da beispielsweise für vorherzusagende Daten, welche linear konzentrationsabhängig sind, eine Nutzung zentrierter Modelle nicht empfohlen ist (Seasholtz & Kowalski, 1992), wurden in dieser Arbeit alle PCA- und PLS-Modelle ohne Zentrierung berechnet.

4.5.2 Hauptkomponentenanalysen

Zur Visualisierung von Datenstrukturen bieten sich Hauptkomponentenanalysen (principal component analysis; PCA) an, welche vor allem eine Kompression von Originaldaten auf wenige, repräsentative artifizielle Daten als Ziel haben.

Für eine detaillierte mathematische Betrachtung der Berechnung von PCA-Modellen sei an dieser Stelle auf Wold *et al.* (1987) sowie auf Dunteman (1989) verwiesen. Für eine praxisorientierte Aufarbeitung dieser Thematik, welche zudem auf das auch in dieser Arbeit verwendete Programm The Unscrambler zugeschnitten ist, sei das Buch von Kessler (2007) empfohlen.

¹² Da die Auflösung des verwendeten Spektrometers bei ca. 3 Pixeln pro Nanometer lag, betrug die effektive Fensterbreite 15 Messpunkte.

In dieser Arbeit wurden PCAs lediglich durchgeführt, um Ausreißer innerhalb der Spektraldaten der einzelnen Versuchsreihen zu identifizieren. Da lediglich die Varianz der Spektralen Datensätze betrachtet wurde und zudem alle Spektren in die PCA-Modelle einfließen sollten, wurde die Modellerstellung anhand aller gemessenen Spektren durchgeführt und mittels kompletter Kreuzvalidierung verifiziert. Als Algorithmus kam hierbei ein NIPALS-Algorithmus (Non-linear iterative partial least squares) zum Einsatz, welcher vor allem bei geringen Anzahlen von berechneten Hauptkomponenten (PCs) optimale Ergebnisse liefert. Da die optimalen Modellumfänge (d.h. die Anzahl der berechneten PCs) für die verschiedenen Spektroskopietechniken im Vorhinein unbekannt waren, wurden alle Modelle mit 7 PCs ohne vorherige Mittenzentrierung der Daten berechnet.

Anhand von Hotelling-T²-Statistiken bei einem Konfidenzintervall von 95 % wurden außerhalb liegende Proben aus dem Originaldatensatz entfernt (siehe auch oben Abschnitt 4.5.1, Ausreißerentfernung).

4.5.3 Partial-Least-quares-Regressionen

Viele Stoffe weisen in unterschiedlichen Spektralbereichen keine scharfen, charakteristischen Absorptionspeaks auf. Zudem kommt es oft zu Überlagerungen der Signale von verschiedenen Stoffen und vor allem in NIR-Spektren treten zudem zumeist schwache Änderungen in Abhängigkeit zur Stoffkonzentration auf. Aus diesem Grund müssen meist Methoden der multivariaten Datenauswertung wie PLS-Regressionen verwendet werden, um Konzentrationsänderungen einzelner Stoffe quantitativ auszuwerten (Brereton, 2007, S. 254 ff.). Für theoretische Hintergründe und Eigenschaften des verwendeten NIPALS-Algorithmus, sowie zur PLS insgesamt, sei auf Geladi & Kowalski (1986) sowie auf Wold *et al.* (2001) verwiesen. Eine praxisorientierte Aufarbeitung dieser Thematik gibt Brereton (2007). Für eine die zudem auf das in dieser Arbeit verwendete Programm The Unscrambler (Camo Software AS, Oslo) zugeschnitten ist, sei erneut das Buch von Kessler (2007) empfohlen.

In dieser Arbeit wurden alle PLS-Modelle anhand der um Ausreißer bereinigten Originaldatensätze berechnet. Hierzu wurden alle Datensätze jeweils nach aufsteigender intrazellulärer PHB-Konzentration der Proben angeordnet und nachfolgend im Verhältnis 60:40 in einen Kalibrier-, sowie einen Validierdatensatz aufgeteilt, so dass in

beiden Datensätzen die gesamte Spannweite spektraler Varianz sowie jener der PHB-Konzentrationen enthalten war. Diese Aufteilung geschah manuell, wobei je Versuchslauf aus jedem PHB-Konzentrationsbereich gezielt Proben den Kalibrier- und den Validierdatensätzen zugeteilt wurden. Nachdem auf diese Art und Weise ca. 2/3 der Proben systematisch aufgeteilt wurden, wurden die verbliebenen Proben je Datensatz willkürlich den Kalibrier- bzw. dem Validierdatensätzen zugeordnet¹³.

Mittels NIPALS-Algorithmus wurden (analog zu den durchgeführten PCAs) jeweils 7 Faktorstufen berechnet, bei gleicher Gewichtung aller Wellenlängen der Spektraldaten. Die Wahl von 7 Faktoren ergab sich durch den Wunsch, verschiedene spektrale Einflüsse trennen zu können, ohne jedoch durch eine zu hohe Zahl an Komponenten ein overfitting der Modelle zu riskieren. Die im Ergebnisteil dieser Arbeit angegebenen Modellfehler der Kalibrierung sowie jene der Validierung beziehen sich jeweils auf jene Modellumfänge, deren Faktoranzahl sich nach der Validierung als optimal erwiesen hatte¹⁴.

Es wurde keine Mittenzentrierung der PLS-Modelle durchgeführt.

Zur Erörterung des Einflusses einzelner Wellenlängenbereich auf die erstellten Modelle wurden die Ladungsvektoren der einzelnen Faktorstufen visuell ausgewertet. Die Güte der Modelle wurde zudem über den Zusammenhang von originär gemessenen und vorhergesagten PHB-Konzentrationen mittels R^2 -Werten, sowie über die ermittelten Kalibrations- und Vorhersagefehler bewertet.

¹³ Durch Verfahren wie das von Kennard & Stone (1969) bzw. dessen Weiterentwicklung von Galvão *et al.* (2005) zur Probenaufteilung anhand euklidischer Distanzen wären eventuell geringere Vorhersagefehler erzielbar gewesen, dieser Effekt wurde aber als minimal eingeschätzt, da bereits durch das in dieser Arbeit genutzte Verfahren ein breiter Varianzbereich in den Kalibrier- und Validierdatensätzen abgedeckt wurde.

¹⁴ Es wurden stets 7 Faktoren berechnet und erst anhand der Validierdaten der optimale Modellumfang bestimmt. Hierbei wurde jene Faktoranzahl als optimal betrachtet, ab der bei Hinzunahme weiterer Faktorstufen der Vorhersagefehler wieder anwuchs. Die Modellstatistiken der Modelle mit den so identifizierten optimalen Faktoranzahlen wurden nachfolgend in diese Arbeit übernommen.

5 Ergebnisse

Im Folgenden werden alle Ergebnisse, welche im Laufe der Versuchsdurchführungen erzielt wurden, aufgeführt.

5.1 Entwickelter Einwegreaktor

Ein Teilziel dieser Arbeit war es, ein geschlossenes Einweg-Reaktorsystem zu entwickeln, welches für Screeningversuche an marinen, photoautotrophen Mikroorganismen geeignet ist. Das entworfene System ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

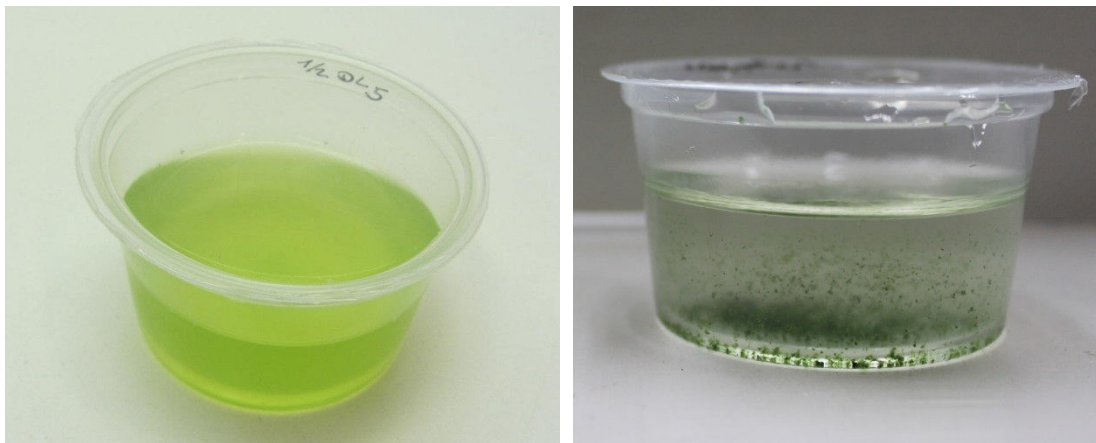


Abbildung 5.1: Entwickelter Einweg-Photobioreaktor auf Basis von Polymermaterialien. Der Reaktorbehälter wurde mit einer Kultur von *Chlorella vulgaris* (links) bzw. *Nostoc muscorum* (rechts) befüllt und verschweißt.

Das gezeigte System zeichnet sich durch seine Bruchsicherheit, sein geringes Eigengewicht sowie seine günstigen Anschaffungskosten aus. Es besteht aus Polymermaterialien, welche durch ihre Materialeigenschaften (Lichtdurchlässigkeit, Gasdurchlässigkeit) geeignete Bedingungen für photoautotrophe Organismen bieten. Um dies zu quantifizieren, wurden weitere Versuche durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden.

5.1.1 Spektrale Transmissionseigenschaften der Reaktormaterialien

Da Licht ein unerlässlicher Faktor für photoautotrophes Wachstum ist, sollte sichergestellt werden, dass die verwendeten Materialien im sichtbaren Spektralbereich hoch-

gradig strahlungsdurchlässig sind. Die bestimmten Transmissionsspektren der verwendeten Werkstoffe sind in Abbildung 5.2 gezeigt.

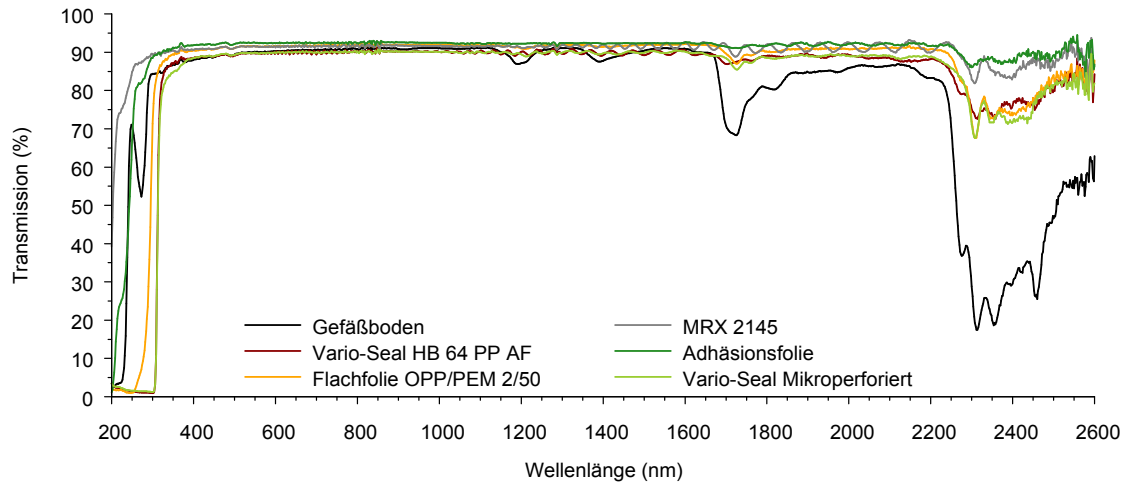


Abbildung 5.2: Transmissionsspektren der verwendeten Einweg-Polymermaterialien.

Wie erkennbar, weisen alle Materialien oberhalb von ca. 320 nm eine sehr hohe Strahlungsdurchlässigkeit von ca. 90 % auf. Diese Durchlässigkeit erstreckt sich über einen breiten Spektralbereich, der bis ca. 2200 nm reicht. Im Spektrum der Reaktorschale sind dabei verringerte Durchlässigkeiten bei ca. 1200, 1400 und insbesondere bei 1700 nm erkennbar. Oberhalb von 2300 nm sinkt die Transmissivität aller Materialien stark ab, wobei dieser Effekt bei den Siegfölied am geringsten ausgeprägt ist.

Auffällig sind starke Wellenmuster in allen Folienspektren im Bereich von ca. 600 bis 900 Nanometern, sowie bei einigen Proben im Bereich von ca. 1200 bis 2200 nm.

5.1.2 Gaswechsel-Messungen

Um die verwendeten Verschlussmaterialien bezüglich ihrer Gasdurchlässigkeit charakterisieren und vergleichen zu können, wurden Gaswechsellmessungen mit CO₂ als Trägergas durchgeführt. Die aus diesen Messungen berechneten Gaswechselzahlen für das Gasvolumen oberhalb der Flüssigphase sind in Abbildung 5.3 aufgeführt:

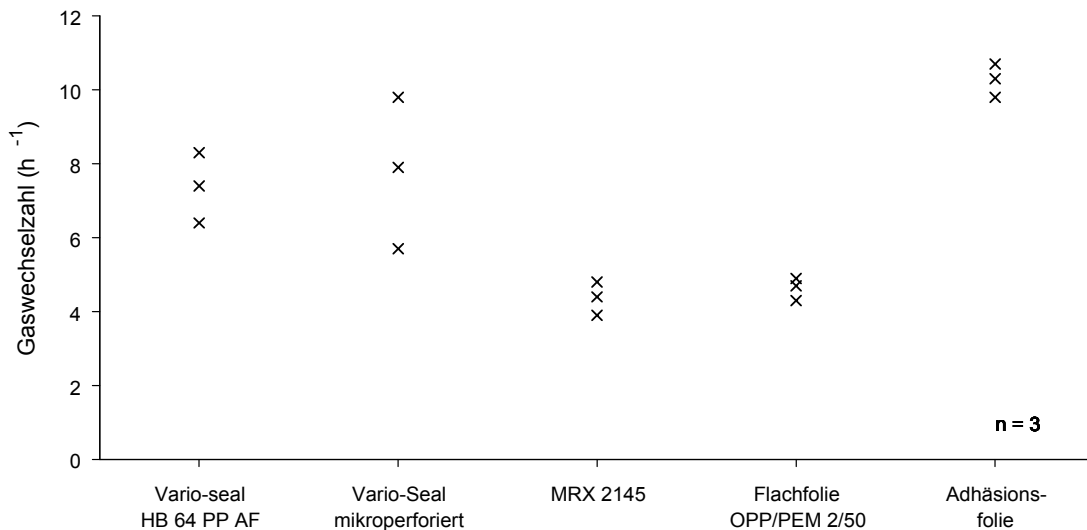


Abbildung 5.3: Ergebnisse der Gaswechsellmessungen für verschiedene Verschlussfolien. Gezeigt sind die im geschlossenen Reaktor erwartbaren Austauschraten der Gasphase oberhalb der Kultursuspension. Alle Messungen wurden in dreifacher Wiederholung durchgeführt.

Wie ersichtlich, unterscheiden sich die Polymermaterialien teilweise erheblich hinsichtlich ihrer Permeabilität für Gase, hier am Beispiel für CO₂ gezeigt. Neben einer Gruppe aus relativ gasundurchlässigen Folien (MRX2145 und Flachfolie OPP/PEM 2/50), gibt es eine zweite Gruppe mit höherer Permeationsfähigkeit (Vario-Seal HB 64 PP AF und Vario-Seal Mikroperforiert). Die vermessene Adhäsionsfolie zeigt die höchste Durchlässigkeit für CO₂. Zu beachten sind die insgesamt geringen Abweichungen der Messwiederholungen je Folientyp, während die Messwerte der mikroperforierten Siegel folie relativ stark streuen.

5.1.3 Bestimmung der Wachstumskapazität des entwickelten Einwegreaktors

Um eine Aussage darüber treffen zu können, inwiefern der entwickelte Einwegreaktor für die Anzucht von Mikroalgen geeignet ist, wurden neben den Versuchen zur Materialcharakterisierung Wachstumsversuche durchgeführt.

So sollte in Langzeitversuchen mit einer Kulturdauer von mehreren Wochen, die maximal unterhaltbare Biomassenkonzentration ermittelt werden. Hierzu wurden Kulturen von *Chlorella vulgaris* verwendet und verschiedene Systemparameter bestimmt. Dabei wurden zunächst Messungen direkt im Reaktor, bzw. für die Erlenmeyer-Referenzkulturen Küvettenmessungen im Photometer durchgeführt. In die ermittelten Wachstumskurven wurden sigmoidale Funktionen gefittet (wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben), anhand derer die Wachstumskapazität im Reaktor sowie der Zeitpunkt der

maximalen Wachstumsrate bestimmt wurden. Ein Bild der Kulturen, aufgenommen am Versuchsende nach 34 Tagen ist in Abbildung 5.4 gegeben:

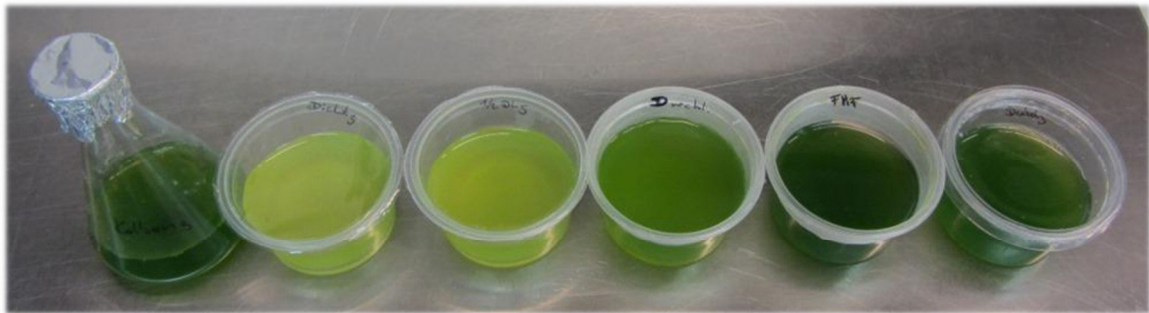


Abbildung 5.4: Beispielhaft ausgewählte *C. vulgaris*-Kulturen der verschiedenen Versuchsvarianten, aufgenommen nach einer Kulturdauer von 34 Tagen. Links im Bild ist eine Referenzkultur im Erlenmeyerkolben gezeigt, daneben Einwegreaktoren mit verschiedenen Verschlussstypen. Die Verschlusszuordnung ist (von links nach rechts): Flachfolie OPP, Vario-Seal HB, MRX-Folie, Adhäsionsfolie, PP-Deckel.

Bereits bei Ansicht der Kulturen fallen die stark unterschiedlichen Färbungen und die damit einhergehenden Unterschiede der im Kulturverlauf erzielten Zelldichten auf. Die Ergebnisse der Kulturdichte-Messungen mitsamt der eingefitteten sigmoidalen Funktionen sind in Abbildung 5.5 dargestellt:

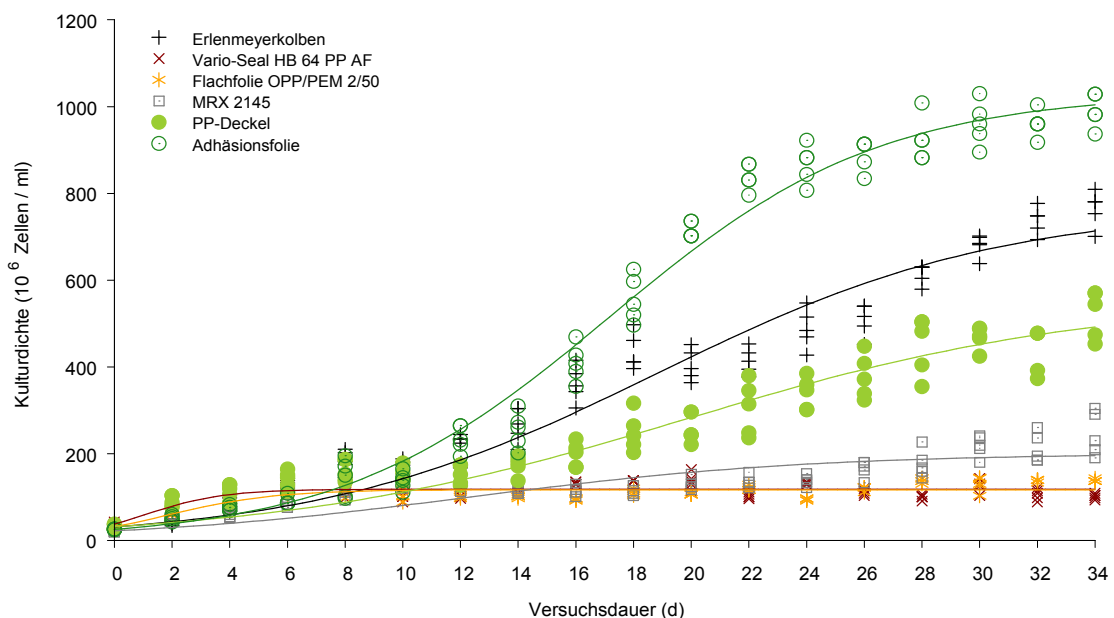


Abbildung 5.5: Ermittelte Wachstumskurven von *C. vulgaris* in Erlenmeyerkolben als Referenzsystem sowie im geschlossenen Reaktor bei Nutzung verschiedener Verschlussstypen. Die durchgezogenen Linien sind durch alle fünf je Variante aufgenommenen Datenreihen kumulativ gefittete Sigmoidalfunktionen, welche nach der in Abschnitt 4.1.4 aufgeführten Formel ermittelt wurden.

Wie zu erkennen, gibt es starke Unterschiede im Wachstumsverhalten in den verschiedenen verschlossenen Reaktoren. Auffällig ist, dass zu Beginn der Kulturperiode alle Wachstumskurven einen ähnlichen Verlauf aufweisen. Bei Kulturdauern ab 8 Tagen zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten. Während einige Varianten bei sehr geringen (Vario-Seal HB und Flachfolie OPP) bzw. bei geringen Zelldichten (MRX-Folie) stagnieren, ermöglicht ein Verschluss mit PP-Deckeln bereits das Erreichen von Zelldichten bis 500 Millionen Zellen pro Milliliter. Im Vergleich zum Referenzsystem schneidet jedoch lediglich die verwendete Adhäsionsfolie besser ab, mit einer erreichbaren Kulturkapazität im Reaktor von bis zu einer Milliarde Zellen pro Milliliter. Zum statistischen Vergleich der geschlossenen Reaktorvarianten mit Erlenmeyerkolben als Referenzsystem, wurden in multiplen Mittelwertvergleichen alle Verschlussvarianten gegen die Referenz verrechnet. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Abbildung 5.6 dargestellt.

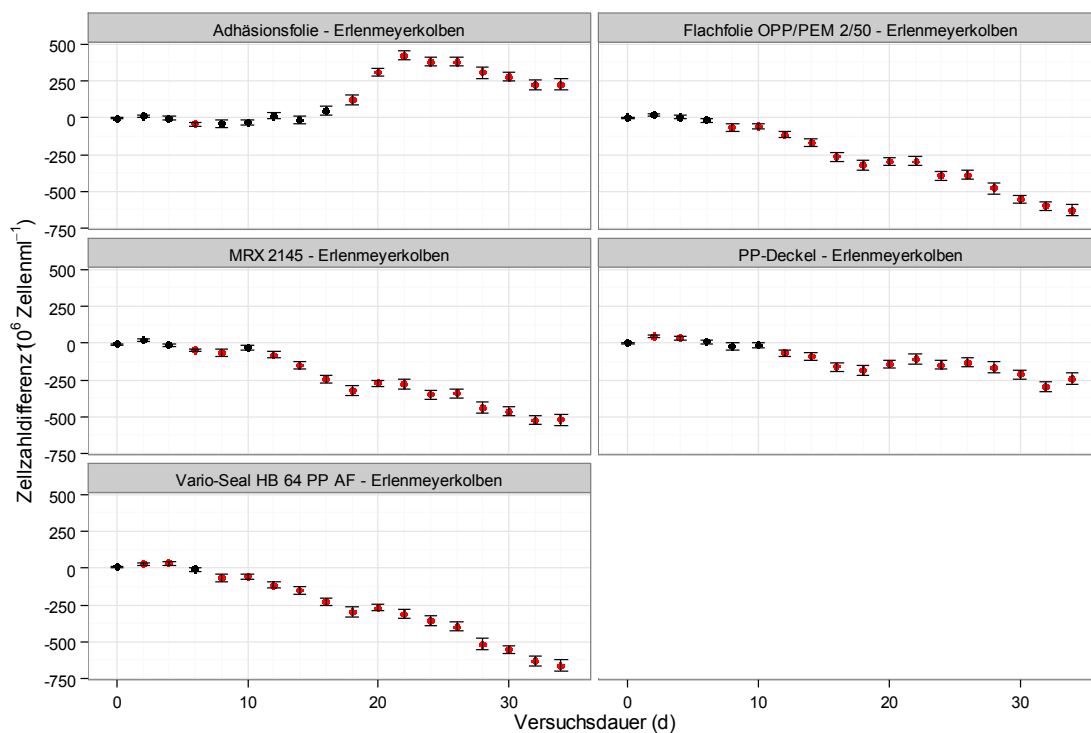


Abbildung 5.6: Entwicklung der Zelldichten im geschlossenen Reaktorsystem bei Verwendung verschiedener Verschlussmaterialien im Vergleich mit Erlenmeyerkolben als Referenzsystem. Gezeigt sind Mittelwerte aus 5 Wachstumskurven (schwarze Punkte) sowie deren Varianzen (Fehlerbalken der Datenpunkte). Zeitpunkte statistisch signifikanter Abweichungen der Zellzahlen in den geschlossenen Reaktoren im Vergleich zum Referenzsystem aus Erlenmeyerkolben sind als rote Datenpunkte hervorgehoben. Die Signifikanz wurde aufgrund multipler Mittelwertvergleiche mittels Tukey-Tests bei einem Signifikanzniveau von 5 % ermittelt.

Wie erkennbar, gibt es signifikante Unterschiede in den möglichen Kulturdichten bei Verwendung unterschiedlicher Verschlussmaterialien. Während ein Verschluss mit Adhäsionsfolie höhere Zellzahlen ermöglicht als sie in Erlenmeyerkolben realisierbar sind, zeigt sich bei allen übrigen Varianten mit fortschreitender Kulturdauer ein vermindertes Wachstum. Entscheidend ist jedoch, dass die sichtbaren Wachstumsnachteile erst bei Kulturdauern ab 8-12 Tagen auftreten, kürzere Kulturzyklen im geschlossenen System (oder alternativ auch längere Kulturdauern bei niedrigeren Zelldichten) jedoch ohne Wachstumsnachteile möglich sind.

5.1.4 Dauerkulturführung im geschlossenen Einwegreaktor

Einzelne Kulturen, welche 18 bis 24 Monate im geschlossenen Reaktorsystem aufbewahrt wurden, werden nach Öffnung der Reaktorbehälter mit frischem Anzuchtmedium versetzt und für 12 Tage unter den unten genannten Kulturbedingungen erneut kultiviert. Es zeigt sich hierbei, dass trotz nicht vorhandener Nährstoffzufuhr diverse Organismen überdauert haben und erneutes Wachstum zu beobachten ist. Abbildung 5.7 zeigt die Wachstumskurven von vier Suspensionen, welche im Verhältnis 1:1 mit frischem Medium vermischt und anschließend in Erlenmeyerkolben kultiviert wurden.

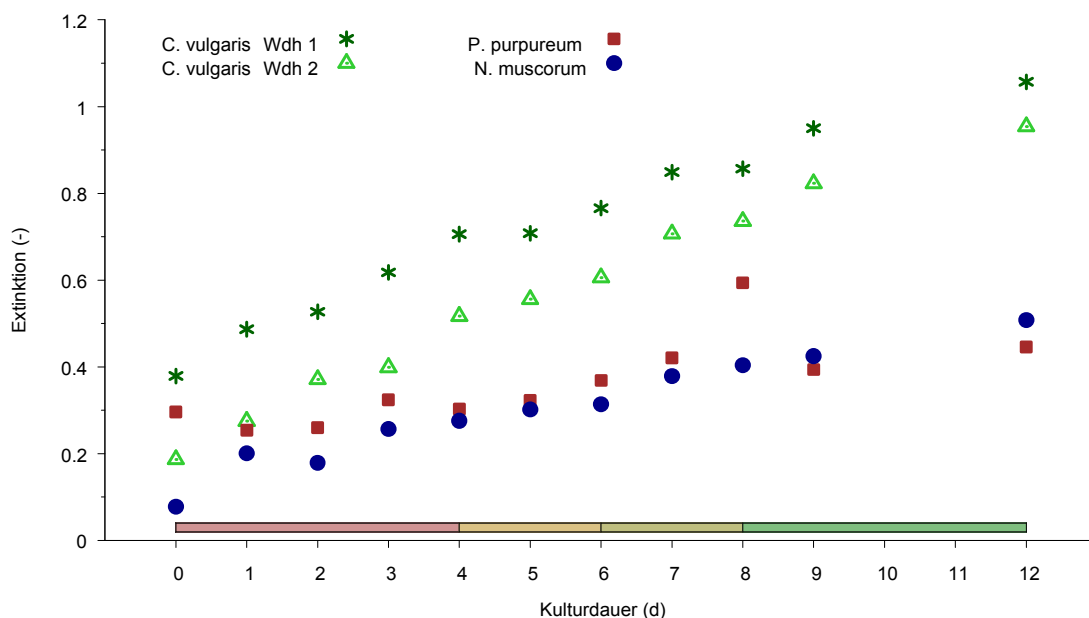


Abbildung 5.7: Wachstumskurven unterschiedlicher Kultursuspensionen, welche nach mindestens 18 Monaten Aufbewahrung im geschlossenen Reaktorsystem mit frischem Anzuchtmedium vermischt und anschließend bei 24 °C und $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ kultiviert wurden. Unten im Diagramm ist als farbiger Balken der Farbumschlag der Kultur von *P. purpureum* (rote Datenpunkte) angedeutet, so wie sie sich nach Zugabe frischen Mediums in den gezeigten 12 Tagen entwickelte. Alle Extinktionsmessungen fanden bei 850 nm statt. An den Tagen 10 und 11 waren krankheitsbedingt keine Messungen möglich.

Wie erkennbar, zeigt sich in allen Kulturen eine Wiederaufnahme des Wachstums nach Zugabe frischen Anzuchtmediums und Überführung in geschüttelte Erlenmeyerkolben. Am stärksten ist der Biomassezuwachs in den zwei Kulturen von *C. vulgaris*, am schwächsten in jener von *N. muscorum*. In der Kultur von *P. purpureum* tritt zudem ein Farbumschlag der ursprünglich roten Kulturen (welche während ihrer Lagerung unter leichtem Salzstress standen, da sie im Rahmen eines anderen Experiments in NaCl-angereichertem Medium aufbewahrt wurden) hin zu komplett wieder ergrünten Zellen auf, was durch den farbigen Balken im Diagramm näherungsweise wiedergegeben ist. Um das Wachstum mit jenem vitaler Kulturen vergleichen zu können, wurden an allen Versuchstagen auf den Anfangstag bezogene Teilungsraten der *Chlorella*-Kulturen berechnet. Selbiges gilt für einige Versuchsglieder des im vorigen Abschnitt beschriebenen Versuchs für die ersten 12 Anzuchtstage. Die kombinierten Ergebnisse sind in Abbildung 5.8 dargestellt.

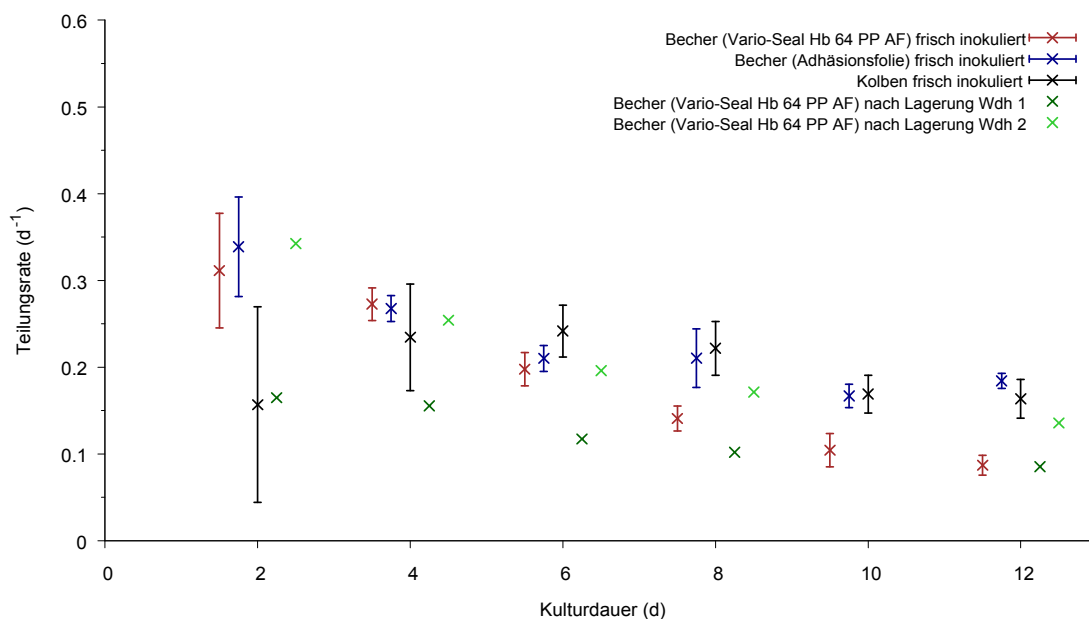


Abbildung 5.8: Jeweils auf den ersten Versuchstag (Tag 0) bezogene Teilungsraten von Kulturen aus der Versuchsreihe zur Bestimmung der Wachstumskapazität im Reaktor sowie von Kulturen, welche nach mehrmonatiger Lagerung erneut in frischem Anzuchtmedium kultiviert wurden. Die linken drei Werte zeigen jeweils die Raten von „gesunden“ Kulturen, welche anhand vitaler Inokula angesetzt wurden. Die rechten zwei Balken zeigen die Raten der gelagerten Kulturen. Die Werte der linken drei Balken basieren auf 5 Messwiederholungen, die der rechten zwei auf einzelnen Messungen.

Es zeigt sich, dass in den ersten Versuchstagen die Teilungsraten stark zwischen den in unterschiedlichen Anzuchtssystemen gewachsenen nicht-gelagerten Kulturen schwan-

ken (je Versuchstag die linken drei Balken in der obigen Darstellung) und sich ab dem vierten Versuchstag zunehmend angleichen. Nachfolgend zeigen lediglich die Kulturen in Erlenmeyerkolben und jene in Reaktoren, die mit Adhäsionsfolie verschlossen wurden, konstant hohe Wachstumsraten. Bei Verschluss mit Vario-Seal HB 64 PP AF Folie verringern sich die Teilungsraten mit zunehmender Versuchsdauer.

Bei Betrachtung der wieder reanimierten Kulturen fällt auf, dass diese gerade in den ersten Tagen stark unterschiedliche Teilungsraten zeigen, diese sich jedoch im Laufe der Kulturdauer immer mehr angleichen. Letztlich streben auch diese Raten Werten entgegen, welche mit jenen initial vitaler Kulturen im geschlossenen Reaktorsystem übereinstimmen oder gar höher liegen und nur leicht geringer sind als die in Erlenmeyerkolben beobachteten.

5.2 Optische *In-situ*-Analysen

Zur nicht-invasiven Analyse von Mikroalgen- und Cyanobakterienkulturen im entwickelten Einweg-PBR wurden diverse Messtechniken implementiert und erprobt. Diese dienten dazu, umfassende Informationen über Kulturdichten und -zustände zu erlangen. Die daraus resultierenden Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten nach Analysetechniken aufgeschlüsselt dargestellt.

5.2.1 NIR-Messungen optischer Dichten

Zur nicht-invasiven Erfassung und Aufzeichnung von Kulturdichteentwicklungen innerhalb des geschlossenen Reaktors wurde ein System entworfen, welches auf der Grundlage von Extinktionsmessungen eine Bestimmung von Zelldichten ermöglichte. Hierbei wurde zunächst ein geschlossenes System konstruiert, welches in Abbildung 5.9 dargestellt ist.

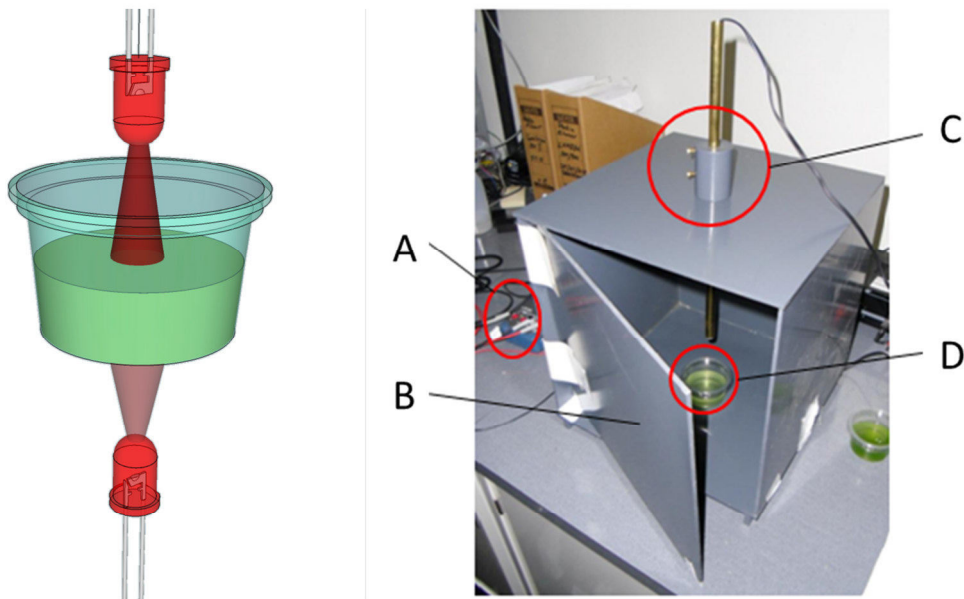


Abbildung 5.9: Links: Schematische Darstellung des Systems zur Messung von Kulturdichten im geschlossenen Reaktor. Als Lichtquelle diente eine NIR-LED, als Detektor eine NIR-sensitive Photodiode. Rechts: Geschlossenes Kulturdichte-Messsystem. A: Spannungsmesser zur Ermittlung der kulturdichteabhängigen Intensität der transmittierten Strahlung. B: Lichtdicht verschließbares Gehäuse zum Schutz vor Störlicht. C: Höhenverstellbare Strahlungsquellenhalterung. D: Reaktorbehälter mit Kultursuspension, welcher direkt über der Photodiode platziert ist.

Die variable Höhe der Lichtquelle erlaubt es, durch eine Verkürzung der Distanz zwischen LED und Reaktorbehälter, höhere Einstrahlungsintensitäten zu realisieren. Hier-

durch kann eine große Spannbreite an Zelldichten vermessen werden, wobei Abbildung 5.10 diese Spannbreite zeigt.

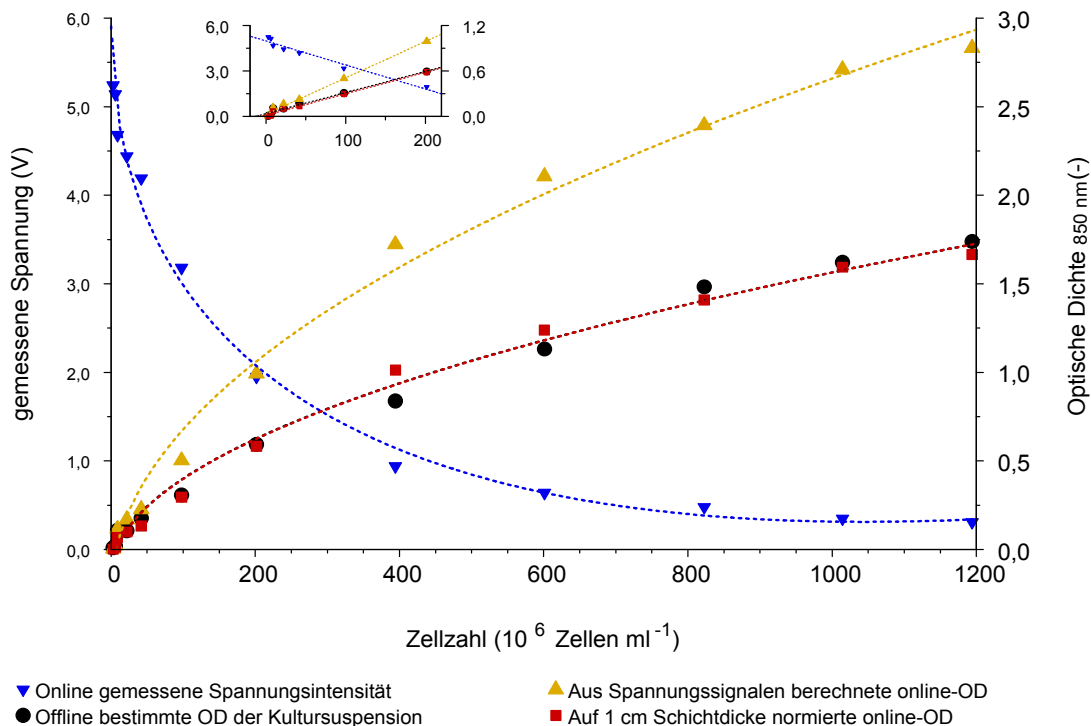


Abbildung 5.10: Zelldichtebestimmungen von *Chlorella vulgaris* im geschlossenen Reaktor. Zu sehen sind Spannungssignale, welche in der geschlossenen Messbox in Abhängigkeit von der Dichte verschiedener Verdünnungen einer Algensuspension aufgenommen wurden. Dem gegenüber gestellt ist die offline in Küvetten bestimmte optische Dichte der jeweiligen Verdünnungsstufen. Außerdem wurden aus den Spannungswerten optische Dichten berechnet, welche einmal in ursprünglicher Form und zudem in normierter Form auf eine Schichtdicke von 1 cm aufgeführt sind. Im eingefügten Kleindiagramm wurde außerdem der lineare Messbereich aufgetragen. Die eingezeichneten Kurven wurden anhand der Datenpunkte gefittet und dienen hier lediglich zur besseren Orientierung und Zuordenbarkeit der einzelnen Punkte zu ihrer jeweiligen Messreihe.

Wie erkennbar, gibt es einen Teilbereich bis ca. 200 Millionen Zellen pro Milliliter, in dem ein linearer Zusammenhang zwischen Spannungssignal (sowie optischen Dichten) und vorherrschenden Zelldichten besteht. Bei höheren Dichten sind dagegen Abweichungen von der Linearität zu beobachten. Die gemessenen strahlungsabhängigen Spannungen sind hierbei nach einer gewissen „Akklimatisierung“ an die zu vermessende Probe (ca. 2 Sekunden) quasi konstant und weisen lediglich sehr geringe, in der Praxis vernachlässigbare Schwankungen auf. Zudem sind die Messdaten bei wiederholten Messungen derselben Proben stabil und reproduzierbar. Dies zeigt sich auch an Vali-

dierungsmessungen verschiedener Kulturen, wobei die nicht-invasiv gemessenen Zelldichten gut mit den offline bestimmten korrelieren.

Um des Weiteren Kulturdichtemessungen in parallel kultivierten Reaktorbehältern zu realisieren, wurde eine Zangenkonstruktion entworfen, in welcher analog zum obigen System LEDs und Photodioden zur Zelldichtebestimmung genutzt wurden. Dieses System, welches in Abbildung 5.11 dargestellt ist, erlaubte die Aufnahme von Zelldichten direkt im geschlossenen Reaktor während der Kultivierung.

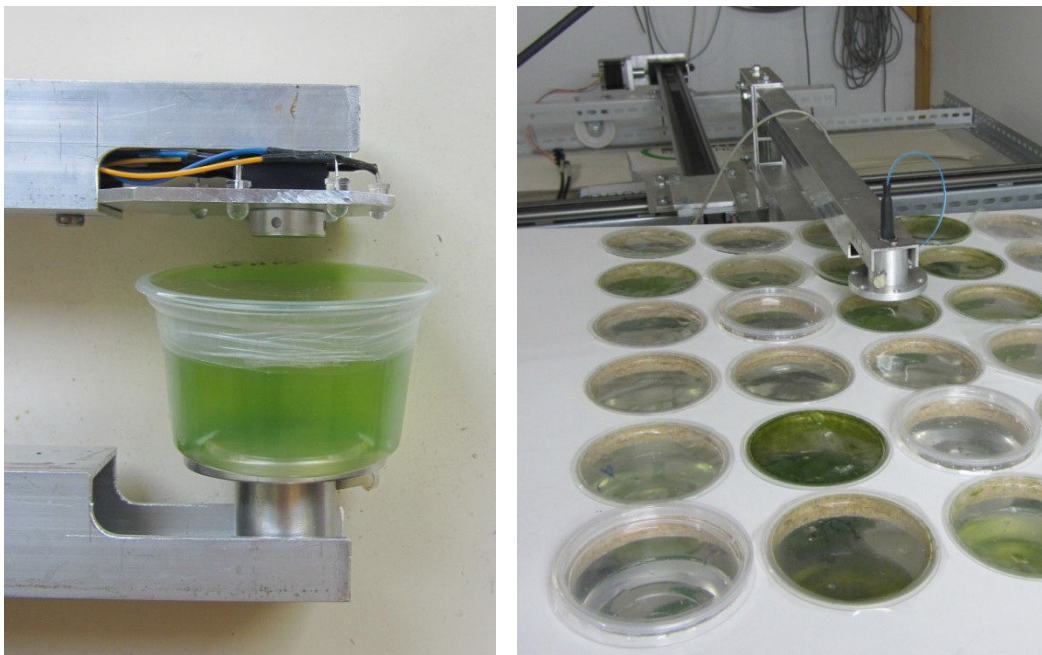


Abbildung 5.11: Links: Darstellung des Systems zur Messung von Kulturdichten im laufenden Reaktorbetrieb. LED und Photodiode wurden in einer Halterung aus Aluminium verbaut, um eine berührungslose Messung von Reaktoren während der Kultur auf einem Orbitalschüttler zu ermöglichen. In dieser Version des Messsystems sind zudem im Zentrum der Messkopfober- bzw. -unterseite optische Fasern für die Implementierung von spektrometrischen Messungen integriert. Auf der Unterseite befindet sich das Ende jener Faser, welche zur Strahlungsquelle reicht, auf der Oberseite ist das Ende der zum Spektrometer leitenden Faser montiert. Rechts: Messzange im Betrieb. Die Halterung wurde auf computergesteuerte Fahrschienen montiert, welche eine Positionierung in X-Y-Richtung ermöglichen.

Um das Messsystem auf geringere Kulturdichten zu optimieren, wurden unterschiedliche Widerstände in der Messschaltung erprobt. Abbildung 5.12 zeigt neben einem Datensatz für *Chlorella vulgaris* einen für *Nostoc muscorum*, wobei lediglich gering konzentrierte Suspensionen vermessen wurden.

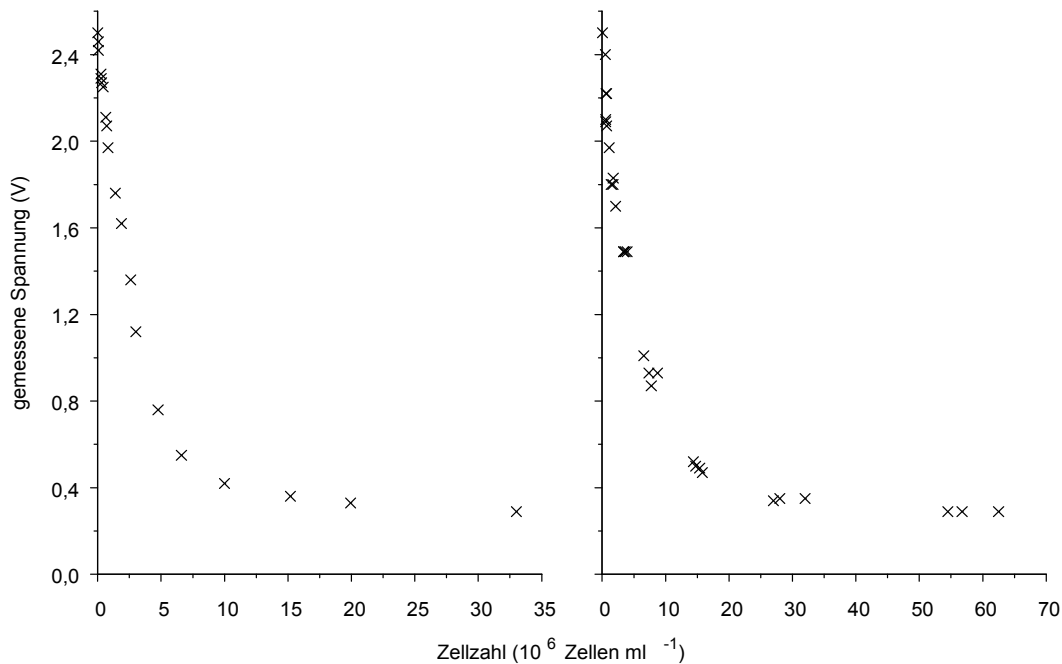


Abbildung 5.12: Gegenüberstellung von per Zählkammer bestimmten Zelldichten mit im geschlossenen Reaktor aufgenommenen Spannungsintensitäten. Links: *Nostoc muscorum*, rechts: *Chlorella vulgaris*.

Wie zu erkennen, ist eine Zelldichte von 0 Zellen ml⁻¹ äquivalent zum Grundsignal des Messsystems von 2,5 Volt. Im Bereich geringer Zelldichten gibt es einen linearen Zusammenhang zwischen der Messspannung und den vorherrschenden Zelldichten, dessen Spannbreite kulturspezifisch ist. Im Bereich hoher Zelldichten erreicht das Messsignal eine Sättigung und stagniert bei ca. 0,4 Volt, so dass hohe Kulturdichten in Konfigurationen, welche auf geringe Zelldichten optimiert sind, nicht mehr verlässlich im geschlossenen Reaktor bestimmt werden können.

5.2.2 Chlorophyllfluoreszenz-Messungen

Als weiteres nicht-invasives Analyseverfahren wurden Chlorophyllfluoreszenzmessungen durchgeführt. Um zu untersuchen, ob sich anhand gemessener Chlorophyllfluoreszenzausbeuten intrazelluläre PHB-Gehalte vorhersagen lassen, wurden 98 Einzelproben von *N. muscorum* vor Durchführung der Referenzanalytik in einem Chlorophyllfluoreszenz-Messgerät vermessen. Die Ergebnisse der Messungen, welche im geschlossenen Reaktorsystem erfolgten, sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Hierbei handelt es sich um den Quotienten aus der Maximalfluoreszenz dunkeladaptierter Kulturen und der variablen Fluoreszenz, welcher die Ausbeute definiert, mit welcher am Photosystem II absorbiertes Licht für photochemische Reaktionen genutzt werden kann.

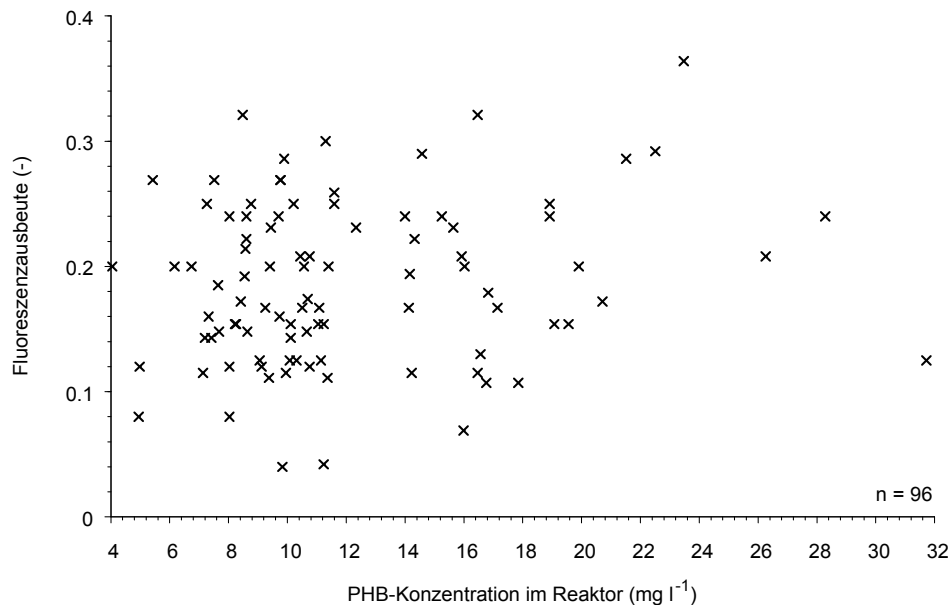


Abbildung 5.13: Gegenüberstellung von PHB-Gehalten im Reaktorgefäß (gemessen per Referenzanalytik) und bestimmter Chlorophyllfluoreszenzausbeute von *N. muscorum* Kulturen der 1. Versuchsreihe. Die Fluoreszenz wurde an Kulturen bestimmt, welche 30 Minuten dunkeladaptiert wurden.

Wie zu erkennen, weisen die Fluoreszenzwerte eine große Streuung auf und es gibt keinen ersichtlichen Zusammenhang zwischen den gemessenen Fluoreszenzdaten und den intrazellulären PHB-Gehalten. Aufgrund der stark streuenden Werte ist mit diesem Datensatz keinerlei Regressionsmodell bezugnehmend auf intrazelluläre PHB-Gehalte erstellt worden.

Um zu überprüfen, inwiefern Chlorophyllfluoreszenzmessungen, welche über einen längeren Messzeitraum gewonnen werden und in denen neben der reinen Quantenausbeute auch weitere Parameter gemessen wurden, eine Aussage über zelluläre PHB-Akkumulationen ermöglichen, wurden weitere Messungen an einem anderen Probenatz durchgeführt. Diese Messungen dienten dazu, den Kautsky-Effekt aufzunehmen und aus den gewonnenen Parametern tiefer greifende Erkenntnisse über die vorherrschenden Zellzustände zu erzielen. Jedoch konnte kein gemessener Parameter mit den im Reaktor herrschenden PHB-Konzentrationen numerisch korreliert werden und auch mit diesen Daten wurden keine Regressionsmodelle erstellt.

5.2.3 VIS-Spektroskopie

In diesem Kapitel werden unter Verwendung unpolarisierter VIS-Anregungsstrahlung ermittelte Ergebnisse der Messungen dargestellt.

5.2.3.1 Vergleich von Küvetten- und *In-situ*-VIS-Spektren

Aufgrund der äußerst unterschiedlichen Geometrie der geschlossenen Reaktoren im Vergleich mit Küvetten galt es zu klären, inwiefern im Reaktor aufgenommene Spektren mit solchen, die in Küvetten gemessen wurden, direkt vergleichbar sind. Zum Vergleich der resultierenden Extinktionsspektren sind in der folgenden Abbildung 5.14 Messungen von Tusche- sowie *Chlorella*-Suspensionen verschiedener Konzentrationsstufen dargestellt.

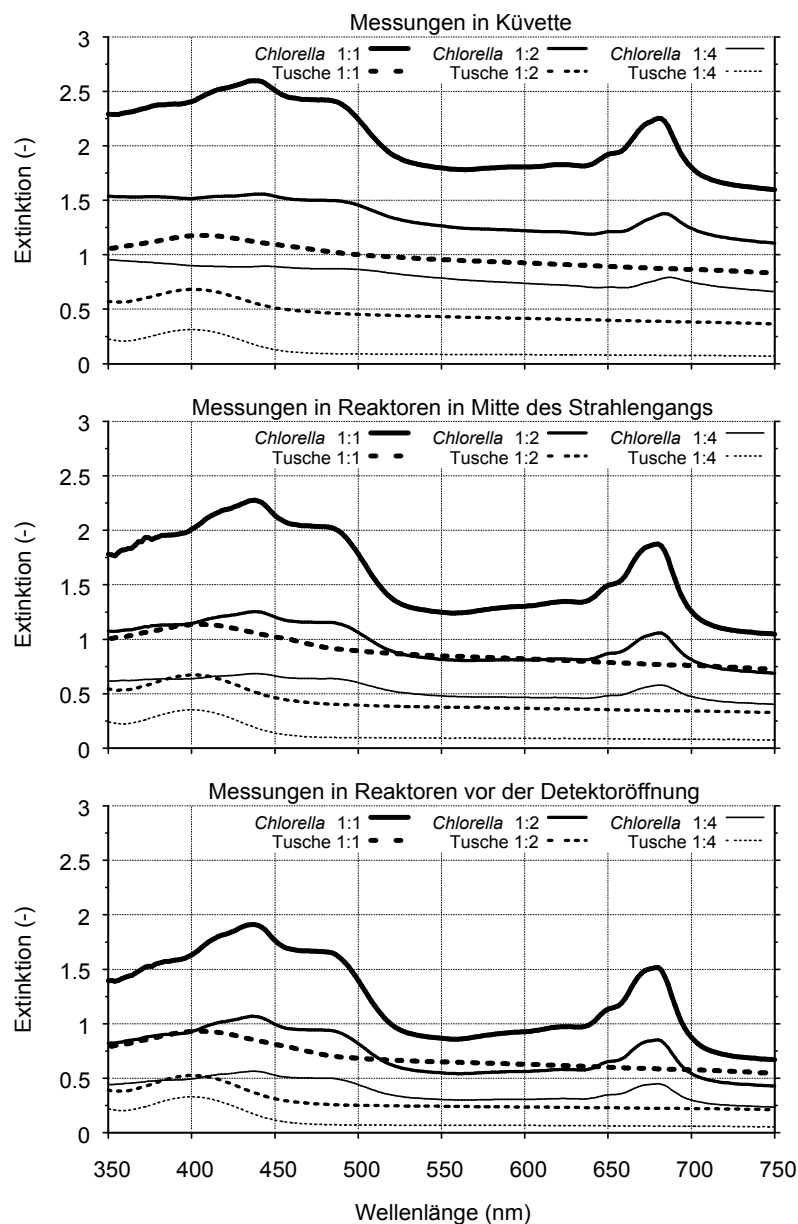


Abbildung 5.14: Vergleich von VIS-Extinktionsspektren einer Tusche- sowie einer *Chlorella*-Suspension bei Vermessung in Küvetten (oberer Bildteil), bei Messung in Reaktorbehälter die in der Spektrometermitte fixiert wurden (mittlerer Bildteil) sowie bei Messung in Reaktorbehältern die direkt vor dem Detektor positioniert wurden. Es wurde jeweils eine Stammsuspension (1:1) sowie zwei Verdünnungsstufen (1:2; 1:4) vermessen. Alle Tusche- sowie *Chlorella*-Spektren sind gegen Wasser respektive Medium als Blindwert vermessen worden.

Es zeigt sich, dass die Gesamtintensitäten der Spektren derselben Probe je nach Messaufbau unterschiedlich sind. In den Küvettenmessungen sind stets höhere Extinktionswerte zu beobachten als in den Reaktoren, wobei eine Platzierung direkt vor der Detektoröffnung die geringsten Signalintensitäten zeigt. Die beobachteten Intensitätsunterschiede zwischen den Versuchsaufbauten sind dabei umso stärker ausgeprägt, je höher die vermessene Suspension konzentriert ist. Zu beachten sind die relativ flachen Tusche-Spektren, welche lediglich im Bereich von 400 nm eine Extinktionsbande zeigen und ansonsten unspezifische Anstiege der Signalintensität zum kurzwelligen Spektralbereich zeigen. Die *Chlorella*-Suspensionen zeigen neben der unspezifischen Steigung zum Kurzwelligen zudem Signale bei 680 sowie im Bereich von 350 bis 500 nm.

5.2.3.2 Reproduzierbarkeit der *In-situ*-VIS-Spektroskopie

Die folgenden Abbildungen zeigen wiederholte Messungen an denselben Proben, durchgeführt sowohl in Quarzküvetten als auch im Reaktor. Abbildung 5.15 zeigt zunächst Messungen in Quarzküvetten, welche als Referenz bezüglich der erreichbaren Reproduzierbarkeit anzusehen sind.

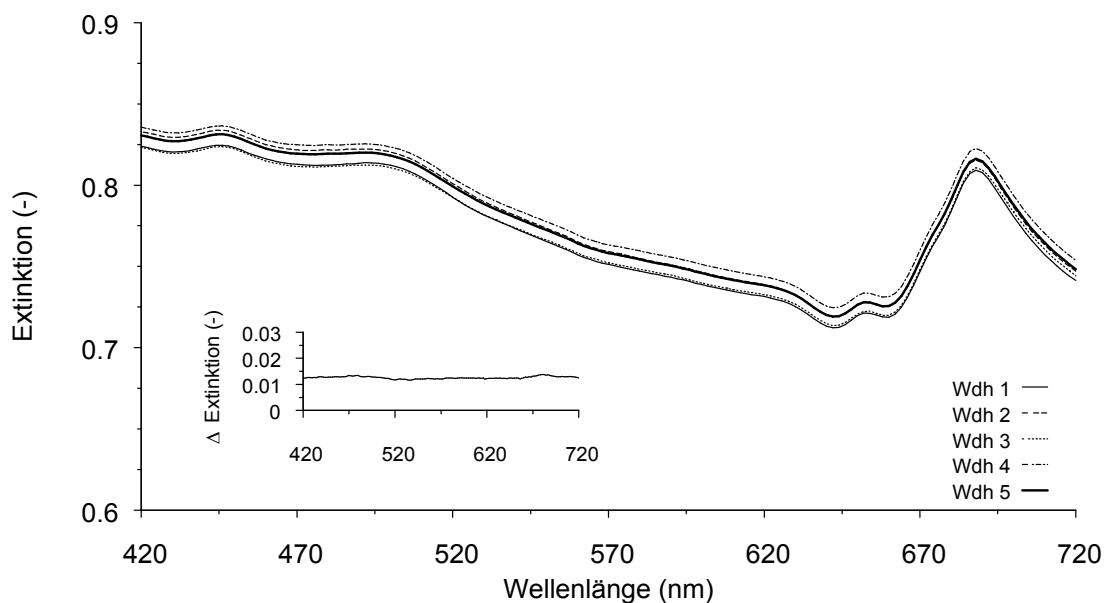


Abbildung 5.15: Reproduzierbarkeit von VIS-Extinktionsmessungen an einer Kultur von *Chlorella vulgaris* in Quarzküvetten. Gezeigt sind 5 Einzelmessungen derselben Probe nach jeweiliger erneuter Positionierung in der Küvettenhalterung. Im linken unteren Bildteil ist die erfasste Spannweite der wellenlängenabhängigen Extinktionsdifferenzen zwischen den einzelnen Messungen eingezeichnet.

Dieselben Messungen sind analog im geschlossenen Reaktorsystem durchgeführt worden, was in der folgenden Abbildung 5.16 dargestellt ist.

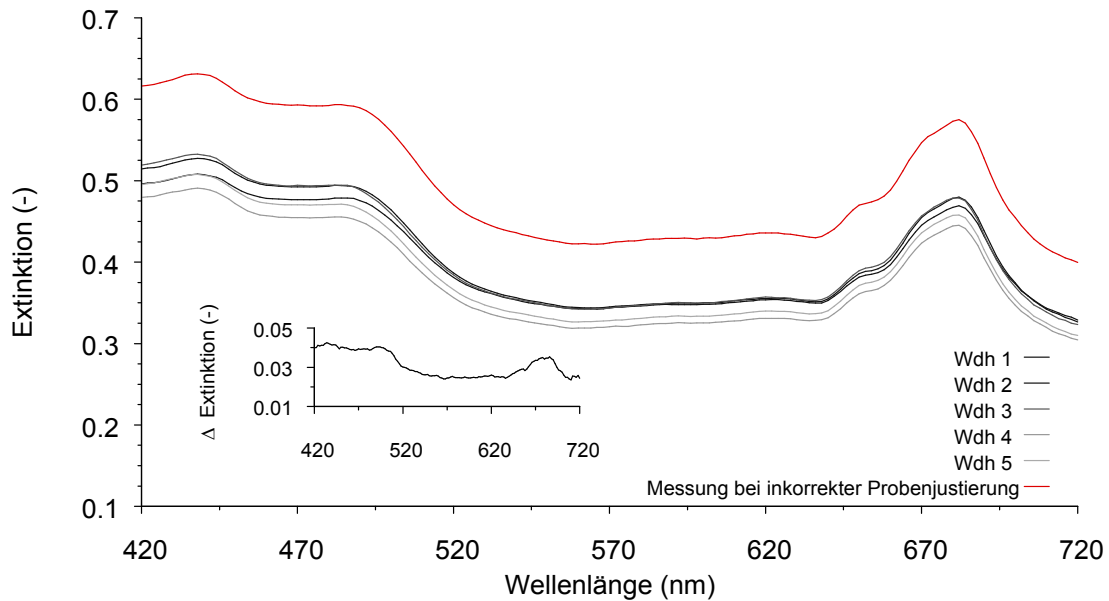


Abbildung 5.16: Reproduzierbarkeit von VIS-Extinktionsmessungen an einer Kultur von *Chlorella vulgaris* im geschlossenen Reaktorsystem. Gezeigt sind 6 Einzelmessungen derselben Probe nach jeweiliger erneuter Positionierung in der Spektrometerrinne bei einer Schichtdicke der Suspension von 1 cm. Im linken unteren Bildteil ist die erfasste Spannweite der wellenlängenabhängigen Extinktionsdifferenzen zwischen 5 korrekt durchgeführten Einzelmessungen eingezeichnet. Das sechste Spektrum ist nicht inkludiert da es explizit erzeugt worden ist um den Einfluss einer inkorrekten Probenjustierung auf die Messergebnisse zu demonstrieren.

Wie erkennbar, liegt die Abweichung einzelner Messungen bei der Verwendung von Quarzküvetten über den gesamten VIS-Bereich relativ konstant bei einer Größenordnung von 0,015 Extinktionseinheiten. Demgegenüber ist bei denselben Messungen im Reaktor zum einen eine höhere Abweichung von bis zu 0,04 Extinktionseinheiten zu beobachten, zum anderen variiert die Stärke dieser Differenz über den betrachteten Wellenlängenbereich. So ist sie stärker im Bereich von 420 bis 520, sowie um 680 nm als im Bereich von 520 bis 680 nm. Auch ist anhand des eingezeichneten Ausreißerspektrums¹⁵ ersichtlich, dass bei inkorrektur Probenjustierung sehr starke Abweichungen zwischen Messwiederholungen möglich sind, wobei dies vor allem die Gesamtintensität der Spektren betrifft und weniger die Form einzelner Spektren verzerrt wird.

5.2.3.3 PHB-Referenzspektren für den unpolarisierten VIS-Bereich

Um das Extinktionsverhalten reiner PHB-Suspensionen zu untersuchen, sind verschiedene Konzentrationen an teilkristallinem PHB in entionisiertem Wasser suspendiert

¹⁵ Dieses Spektrum wurde gezielt durch eine leicht schiefe Fixierung des Reaktorbehälters im Spektrometer erzeugt, so dass das Messlicht nicht senkrecht, sondern leicht schräg auf die Reaktoroberfläche traf.

und im Bereich von 400 bis 800 nm vermessen worden. Die gemessenen Spektren für den VIS-Bereich bei Verwendung unpolarisierter Messstrahlung sind in Abbildung 5.17 dargestellt.

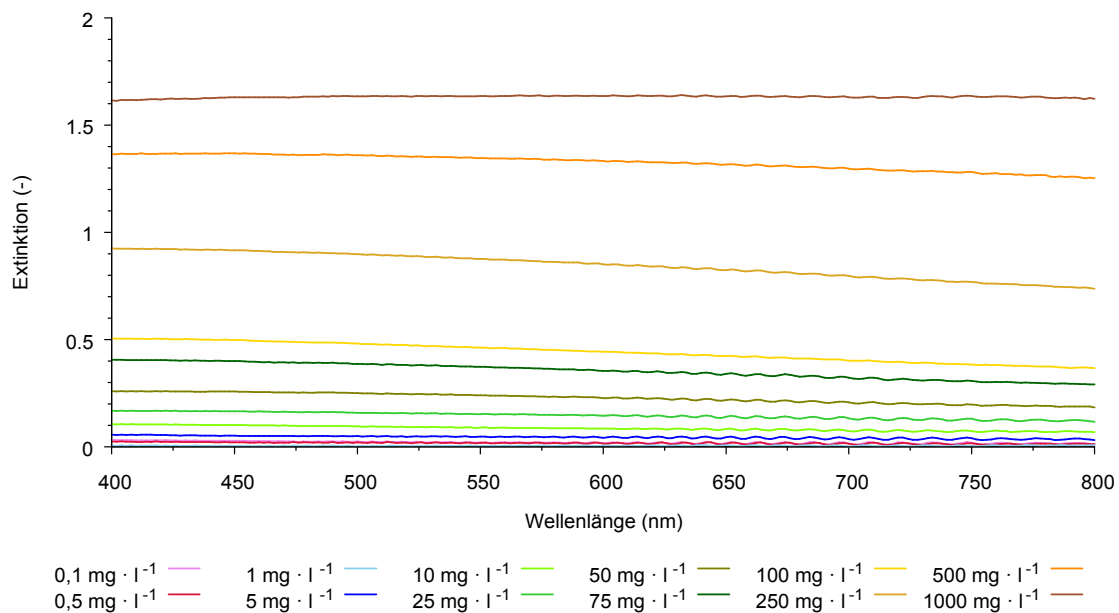


Abbildung 5.17: VIS-Extinktionsspektren verschieden konzentrierter PHB-Suspensionen in H_2O . Die Messungen erfolgten in geschlossenen Reaktoren bei Verwendung der nicht modifizierten Standardlichtquelle.

Wie zu erkennen, zeigen sich für den sichtbaren Spektralbereich keinerlei charakteristische Extinktionsmuster für die untersuchten PHB-Suspensionen. Jedoch sind konzentrationsabhängige Absolutintensitäten in den Spektren der einzelnen Verdünnungsstufen ersichtlich, wobei in allen Spektren die Intensitäten vom kurzwelligen hin zum langwelligen Spektralbereich fast linear abnehmen. Auffällig sind zudem stark hervortretende Wellenmuster innerhalb der Spektren mit einer Amplitude von bis zu 0,01 Extinktionseinheiten, welche über den Bereich von 550 bis 800 Nanometern in ihrer Breite zunehmen.

5.2.3.4 Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten

Um einen Überblick über die im Kulturverlauf auftretenden Veränderungen in den Spektraldaten zu geben, auf denen letztlich die Regressionsmodelle beruhen, werden im Folgenden zunächst stets Rohspektren gezeigt, wie sie im jeweiligen Versuchsetup gemessen worden sind. Nachfolgend werden die mit ihnen erstellten Regressionsmodelle detaillierter betrachtet und mögliche physiologische Grundlagen der Modelle

herausgearbeitet. Die Ergebnisse der mittels Vorbehandlungen optimierten Modelle werden (falls Verbesserungen erzielt werden konnten) eingehender betrachtet und suboptimale Modelle lediglich auszugsweise präsentiert.

Die im sichtbaren Spektralbereich gemessenen Rohspektren sind anhand von drei Beispielen in der folgenden Abbildung 5.18 dargestellt. Die gezeigten Spektren decken einen breiten Bereich an prozentual (bezogen auf die Probentrockenmasse) intrazellulär vorhandenem PHB ab, weshalb im weiteren Ergebnisteil dieser Arbeit stets eine beispielhafte Darstellung der Messspektren anhand dieser oder vergleichbarer Proben erfolgt.

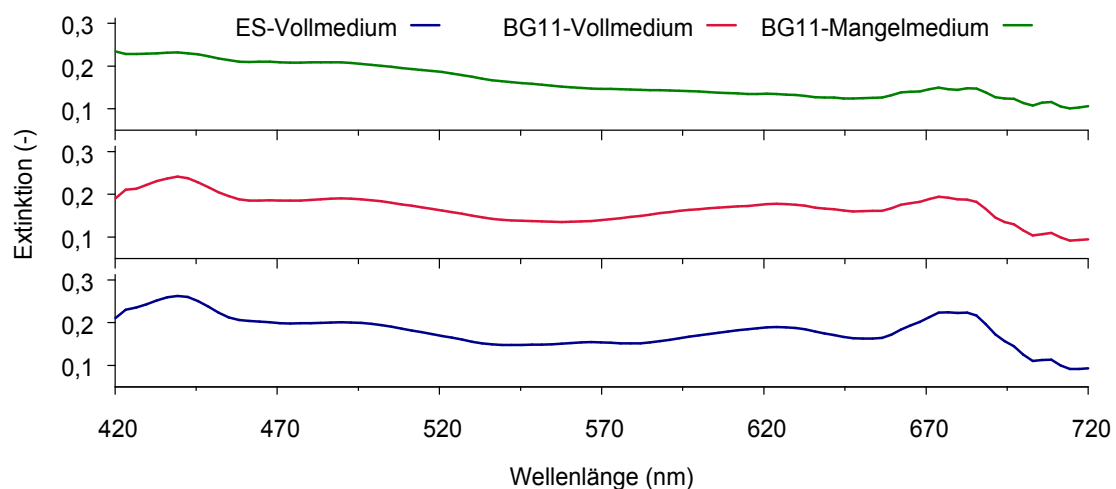


Abbildung 5.18: VIS-Extinktionsspektren verschiedener Kulturen von *N. muscorum*, aufgenommen nach einer Kulturdauer von 3 Wochen. Die Messungen erfolgten im geschlossenen Reaktor bei vertikalem Messaufbau unter Verwendung einer unpolarisierten Lichtquelle. Die gezeigten Spektren stammen von Proben mit einem PHB-Anteil von 10,19 (ES-Vollmedium), 4,35 (BG11-Vollmedium) sowie 15,13 (BG11-Mangelmedium) Gewichtsprozent bezogen auf die jeweilige Probentrockenmasse.

In der obigen Abbildung zeigt sich in den Spektren jener Proben, welche ohne Mangelbedingungen kultiviert worden sind, eine Extinktionsbande im Bereich von ca. 435 nm, Extinktionsbanden bei ca. 500 und 620 nm, sowie eine weitere Extinktionsbande bei ca. 680 nm. Das Spektrum der Mangelprobe weist einen stärkeren Anstieg im kurzwelligen Spektralbereich auf und die genannten Extinktionsbanden sind zudem weniger stark ausgeprägt. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die nicht aufgeführten Spektren je nach gebildeter Biomasse und den intrazellulär vorhandenen PHB-Gehalten sowohl in ihrer Form als auch in ihrer Intensität von den gezeigten Beispielen abwichen, die

aufgeführten Spektren jedoch für die im Diskussionsteil betrachteten Veränderungen und deren Grundlagen als ausreichend heterogen erachtet werden.

Mit den aufgenommenen Spektraldaten sind nachfolgend PLS-Regressionsmodelle erstellt worden, was sowohl anhand der Rohdaten, als auch nach Anwendung verschiedener, im Material-und-Methoden-Teil dieser Arbeit aufgeführter, Vorbehandlungen geschah. Die Ergebnisse der Regressionen des 4. Versuchsdurchlaufs sind in den folgenden Abbildungen dargestellt und sollen in dieser ausführlichen Form einmalig dargestellt werden, während weitere Versuchsläufe (welche im Material-und-Methoden-Teil aufgeführt sind) numerisch im Fließtext abgehandelt werden.

Die folgende Abbildung 5.19 zeigt das Ergebnis der anhand der Rohspektren durchgeführten PLS-Regression des 4. Versuchsdurchlaufs.

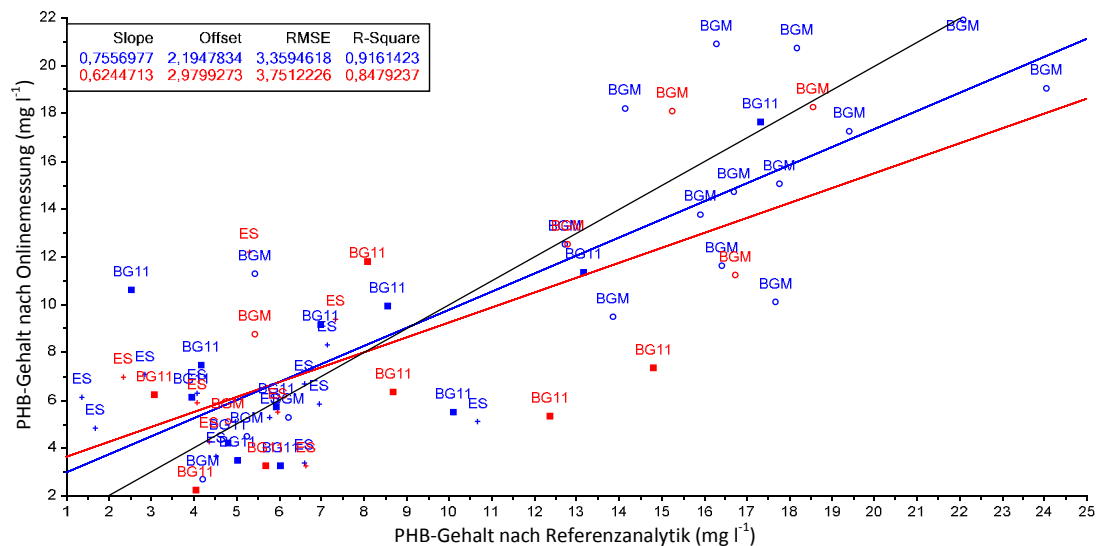


Abbildung 5.19: Übersicht der PLS-Regressionsergebnisse des 4. Versuchsdurchlaufs bei Verwendung der gemessenen VIS-Rohspektren als Vorhersagewerte. Gezeigt ist die Gegenüberstellung der per Referenzanalytik ermittelten PHB-Gehalte (Abszisse) mit den Vorhersagewerten des Regressionsmodells (Ordinate). Die PLS wurde mit 7 Faktoren ohne Zentrierung berechnet. Der Kalibrierdatensatz umfasst 40 Proben (blau), der Validierdatensatz 20 Proben (rot). In schwarz eingezeichnet ist die Winkelhalbierende, in blau die Regressionsfunktion der Kalibrierdaten, in rot jene der Validierdaten. Die Proben wurden in ES-Vollmedium („ES“), BG11-Vollmedium („BG11“) und BG11-Mangelmedium („BGM“) kultiviert.

Das erstellte PLS-Modell umfasst einen Datensatz von insgesamt 60 Proben, welche einen PHB-Gehalt von 1,37 bis 24,02 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ abdecken. Wie in der Statistikbox erkennbar, liegt der mittlere Modellfehler der Kalibrierung bei ca. 3,3 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ und jener der Validierung etwas höher bei ca. 3,75 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Bei einer Spannweite der PHB-

Konzentration von ca. $23 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ im betrachteten Versuch liegt der mittlere Vorhersagefehler somit in einer Größenordnung von 16 % der Grundgesamtheit.

Für die Kalibrierung ist ein Bestimmtheitsmaß von 0,92 gegeben, während in der Validierung lediglich ein Wert von 0,85 erreicht wird. Wie erkennbar, ist die Vorhersage im Bereich geringer PHB-Konzentrationen teilweise relativ ungenau, wobei im gesamten Modell geringe PHB-Gehalte prinzipiell überschätzt und hohe Gehalte unterschätzt werden. Für die PHB-Vorhersage anhand der Rohdaten erwies sich ein Modellumfang von 5 berechneten Hauptkomponenten als optimal.

Um herauszufinden, welche Wellenlängenbereich für die Vorhersage der PHB-Gehalte wichtig sind, und um mögliche physiologische Erklärungen geben zu können, werden im Folgenden die Gewichtungen der Spektraldaten im Regressionsmodell genauer betrachtet. Eine Übersicht der Wellenlängeneinflüsse auf das Regressionsergebnis ist in der folgenden Abbildung 5.20 dargestellt.

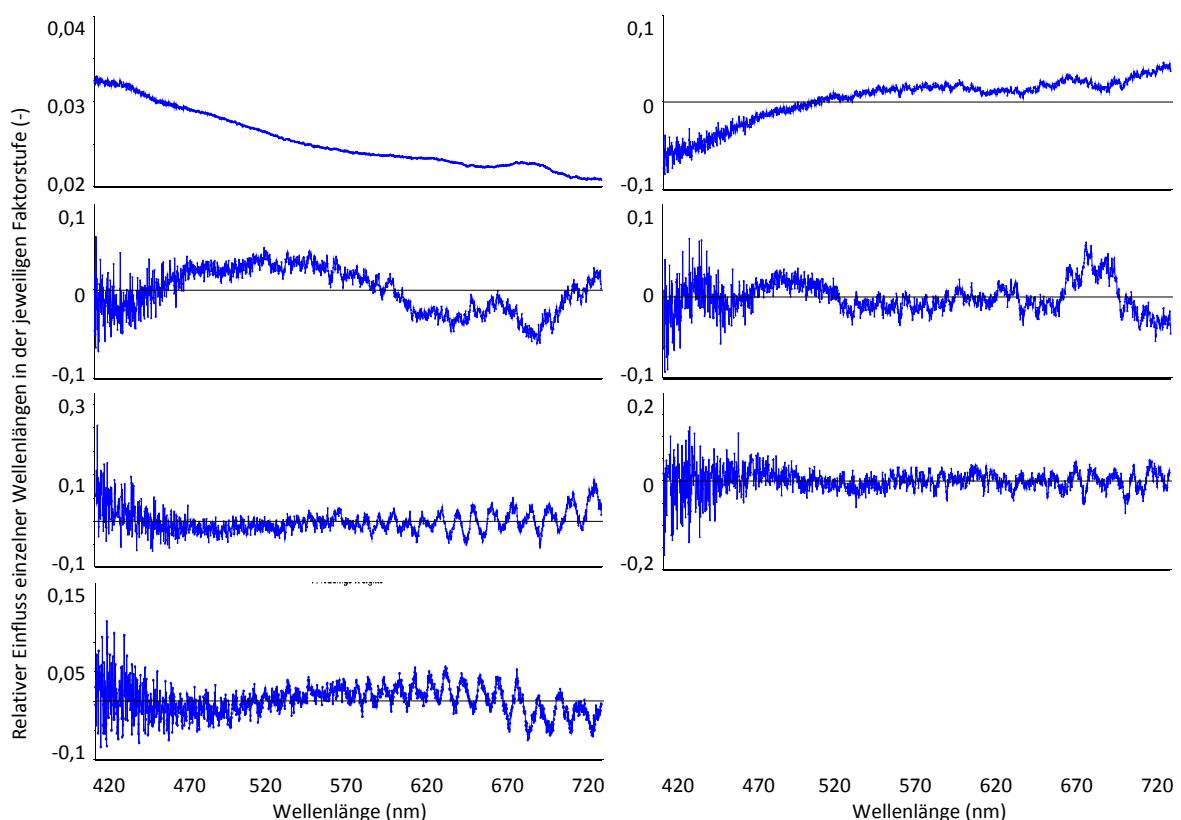


Abbildung 5.20: Relativer Einfluss der VIS-Spektraldaten auf das Vorhersagemodell. Gezeigt sind die Faktorstufen 1 - 7 (1 & 2 in der ersten Zeile, 3 & 4 in der zweiten, usw.), wobei größere Werte einen größeren Einfluss bedeuten.

Es zeigt sich, dass der Ladungsvektor der 1. Faktorstufe einen relativ linearen Anstieg zum kurzwelligen Spektralbereich aufweist, während Faktor 2 gegenläufig erscheint. Im 3. Faktor ist ein verstärkter Einfluss im Bereich von 500 - 600 nm ersichtlich, sowie um 620 sowie 680 nm. Faktor 4 sticht durch enge Einflussbereiche, vor allem im Bereich von 680 nm hervor. Die Faktoren 5, 7 und besonders 6 sind durch relativ unspezifisch um den Nullwert schwankende Relevanzen gekennzeichnet.

5.2.3.5 Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im unpolarisierten VIS-Bereich

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt die spektralen Varianzen, ein beispielhaft ausgewählter Regressionsdurchlauf sowie der Regression zugrunde liegenden Spektralbereiche dargestellt wurden, soll im Folgenden ein umfassender Überblick über mehrere Versuchswiederholungen gegeben werden. Hierfür sind in Tabelle 5.5 die gesammelten Regressionsergebnisse aller drei im sichtbaren Spektralbereich mit unpolarisierter Messstrahlung durchgeführten Versuche aufgeführt.

Tabelle 5.5: Vergleich der für den unpolarisierten VIS-Spektralbereich erstellten Regressionsmodelle

Versuchsreihe	PHB-Gehalte ^a (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^c (%)	RMSEP ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEP ^c (%)	R ² Kalibrierung	R ² Validierung	Modellfaktoren
1 (Küvette)	3,375 - 31,719	3,1006	10,94	3,4792	12,27	0,945	0,923	5
2 (Reaktor, horizontal)	7,804 - 87,379	5,8068	7,30	11,8739	14,92	0,959	0,826	7
4 (Reaktor, vertikal)	0,678 - 24,042	3,3595	14,38	3,7512	16,06	0,916	0,848	5

Anzahl Kalibrier-/Validierproben: 59/40, 48/32, 40/20 (jeweils für Versuchsreihe 1, 2, 4)

^a Aufgeführt sind minimale und maximale PHB-Gehalte der Probengesamtheit jeder Versuchsreihe

^b Die aufgeführten absoluten Kalibrier- (RMSECs) und Validierfehler (RMSEPs) sind jene der Rohdatenbasierten Modelle

^c Die prozentualen Werte sind berechnet anhand der absoluten RMSECs und RMSEPs bezogen auf die absoluten PHB-Gehaltsspannen

Aufgrund der verschiedenen Anzuchtbedingungen ergeben sich unterschiedliche Spannbreiten der innerhalb eines Versuchs erreichten PHB-Konzentrationen in den Reaktoren. Auch die absoluten Modellfehler der Kalibrierung sowie der Validierung unterscheiden sich, während die auf die PHB-Konzentrationsspannbreiten bezogenen prozentualen Fehler, mit Ausnahme der Kalibration der 2. Versuchsreihe, in derselben

Größenordnung liegen. In allen Modellen sind die Fehler in der Kalibrierung zudem geringer als in der Validierung wohingegen die Bestimmtheitsmaße höher liegen. Als optimal zeigt sich ein Modellumfang von 5 bis 7 Faktoren. Bei Aufnahme der Spektren in Küvetten ist der Modellfehler zudem am kleinsten, wohingegen die im Reaktor durchgeführten Messungen bei horizontalem Versuchsssetup (vgl. Abbildung 4.7) zu hohen Modellfehlern führen. Bei vertikalem Versuchsssetup gleicht der Vorhersagefehler jenem der Referenzmessung.

Für eine eventuelle Verbesserung der anhand der Rohdaten erstellten Modelle, wurden die Spektraldaten zudem diversen Vorbehandlungen unterzogen. Die Ergebnisse dieser Modelle sind in Abbildung 5.21 dargestellt, wobei die jeweils erzielten Vorhersagefehler, Bestimmtheitsmaße und Faktorenanzahlen in Bezug zu jenen Ergebnissen gesetzt worden sind, welche anhand der Rohspektren erzielt worden sind.

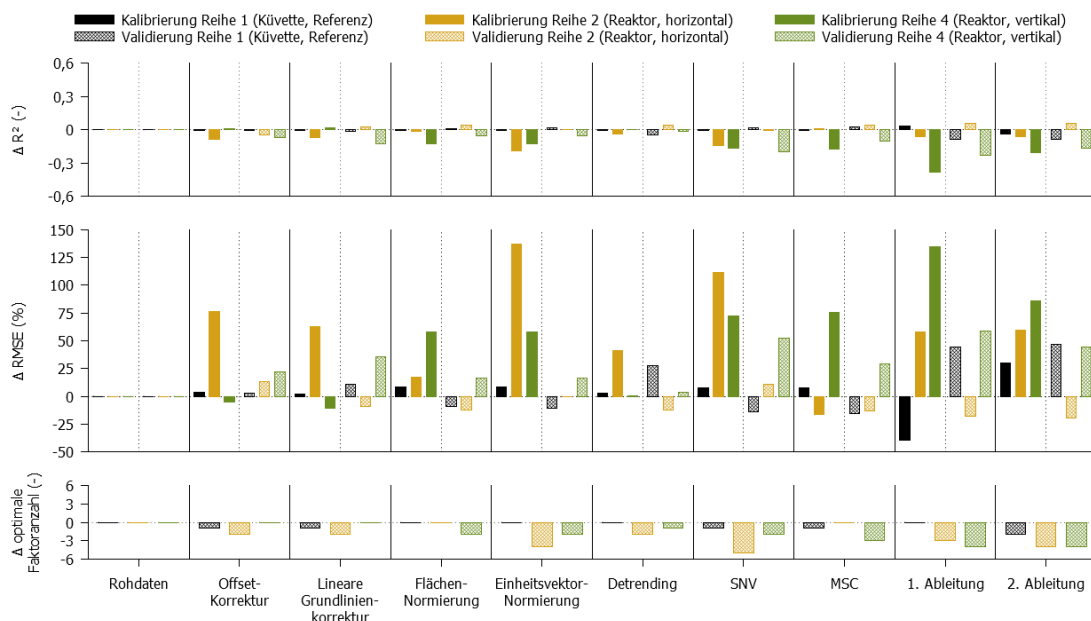


Abbildung 5.21: Übersicht aller für den unpolarisierten VIS-Bereich erstellten Regressionsmodelle bei Anwendung verschiedener Vorbehandlungen der spektralen Rohdaten. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse der Rohdaten-Regressionen als auf null gezogene Referenzen (für die erreichten Modellparameter siehe vorherige Tabelle 5.5) sowie die (prozentualen oder absoluten) Differenzen der Modellparameter bei Nutzung der vorbehandelten Spektraldaten¹⁶.

¹⁶ Zur vereinfachten Interpretation der Grafik seien folgende Anmerkungen gegeben:

R²: Das Bestimmtheitsmaß sollte möglichst hoch sein, deshalb gilt $R^2 \uparrow \triangleq$ gut; $R^2 \downarrow \triangleq$ schlecht

$\Delta RMSE$: Die Differenz der Modellfehler (RMSE) im Vergleich zu jenen, die anhand der spektralen Rohdaten berechnet wurde, sollte möglichst groß sein und ein negatives Vorzeichen haben, da dies einer Verringerung der Fehler entspricht, deshalb gilt $\Delta RMSE < 0 \triangleq$ gut, $\Delta RMSE > 0 \triangleq$ schlecht

Faktoranzahl: Für möglichst schlanke und stabile Modelle ist eine möglichst geringe Faktoranzahl wünschenswert, deshalb gilt Anzahl $\downarrow \triangleq$ gut, Anzahl $\uparrow \triangleq$ schlecht

Positive prozentuale Angaben bedeuten hierbei eine Verschlechterung der Regressionsergebnisse, negative Werte einen verringerten Vorhersagefehler und somit eine erhöhte Modellgüte. Gleiches gilt für die absolut aufgetragenen Differenzen des Modellumfangs, wobei negative Werte für im Umfang reduzierte Modelle stehen, während für die Bestimmtheitsmaße größere Werte eine bessere Modellgüte darstellen.

Es zeigt sich, dass die Bestimmtheitsmaße bei der Verwendung von vorbehandelten Daten in allen Versuchsreihen abnehmen, dies sowohl bei der Kalibrierung als auch bei der Validierung. Ähnlich konsistent zeigen sich die optimalen Modellumfänge, welche sich durch die Nutzung von Vorbehandlungen in beinahe allen Fällen verringern. Äußerst inhomogen sieht dagegen das Verhalten der Modellfehler aus. So kommt es in kaum einem Fall zu einer konsistenten Veränderung, einzig einzelne Versuchsreihen zeigen verbesserte Ergebnisse (z.B. Reihe 1 & 2 bei Flächennormierung der Spektraldaten), wobei sich gleichzeitig das Verhalten von Kalibrier- und Validierfehler stark unterscheidet. Zudem zeigt sich, dass sich die einzelnen Versuchsreihen bei Anwendung einer gleichen Vorbehandlungsmethode unterschiedlich verhalten, sowohl quantitativ als auch qualitativ.

5.2.4 NIR-Spektroskopie

5.2.4.1 Vergleich von Küvetten- und *In-situ*-NIR-Spektren

Bei Betrachtung des nah-infraroten Spektralbereiches zeigt sich ein identisches Verhalten zum VIS-Bereich, was in der folgenden Abbildung 5.22 dargestellt ist.

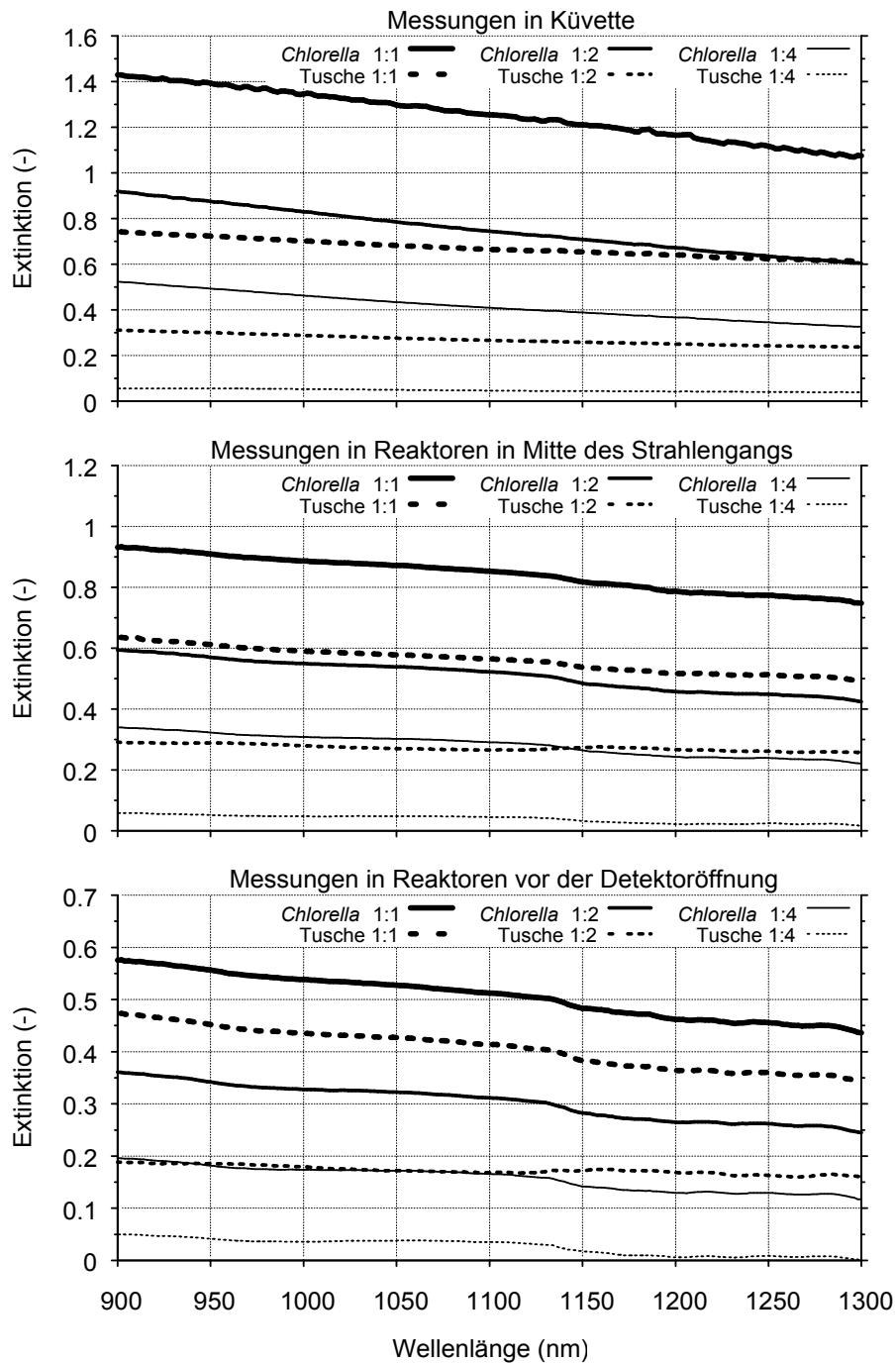


Abbildung 5.22: Vergleich von NIR-Extinktionsspektren einer Tusche- sowie einer *Chlorella*-Suspension bei Vermessung in Küvetten (oberer Bildteil), bei Messung in Reaktorbehälter die in der Spektrometermitte fixiert wurden (mittlerer Bildteil) sowie bei Messung in Reaktorbehältern die direkt vor dem Detektor positioniert wurden. Es wurde jeweils eine Stammsuspension (1:1) sowie zwei Verdünnungsstufen (1:2; 1:4) vermessen. Alle Tusche- sowie *Chlorella*-Spektren wurden gegen Wasser respektive Medium als Blindwert aufgenommen

Wiederum zeigen Messungen in Küvetten die höchsten Signalintensitäten (hier sei nochmal auf die unterschiedlichen Achsenskalierungen in der obigen Darstellung hingewiesen!) während vor allem eine detektornahe Probenplatzierung bei Messungen

direkt in Reaktorgefäßen zu geringeren Intensitäten führt. Im Gegensatz zum sichtbaren Spektralbereich sind keine distinkten Extinktionsbanden sichtbar, lediglich in jenen Spektren, welche in den Reaktoren aufgenommen worden sind zeigen sich in den Bereichen um 980 sowie um 1160 nm leicht verringerte Extinktionen im Vergleich zu den ansonsten recht geradlinig verlaufenden Spektren. Bei allen Messungen zeigte sich erneut ein Anstieg der Spektren zum Kurzwelligen.

5.2.4.2 Reproduzierbarkeit der *In-situ*-NIR-Spektroskopie

Die folgende Abbildung 5.23 zeigt in NIR-Bereich aufgenommene Küvettenspektren, Abbildung 5.24 Spektren derselben Probe bei Vermessung im geschlossenen Reaktor.

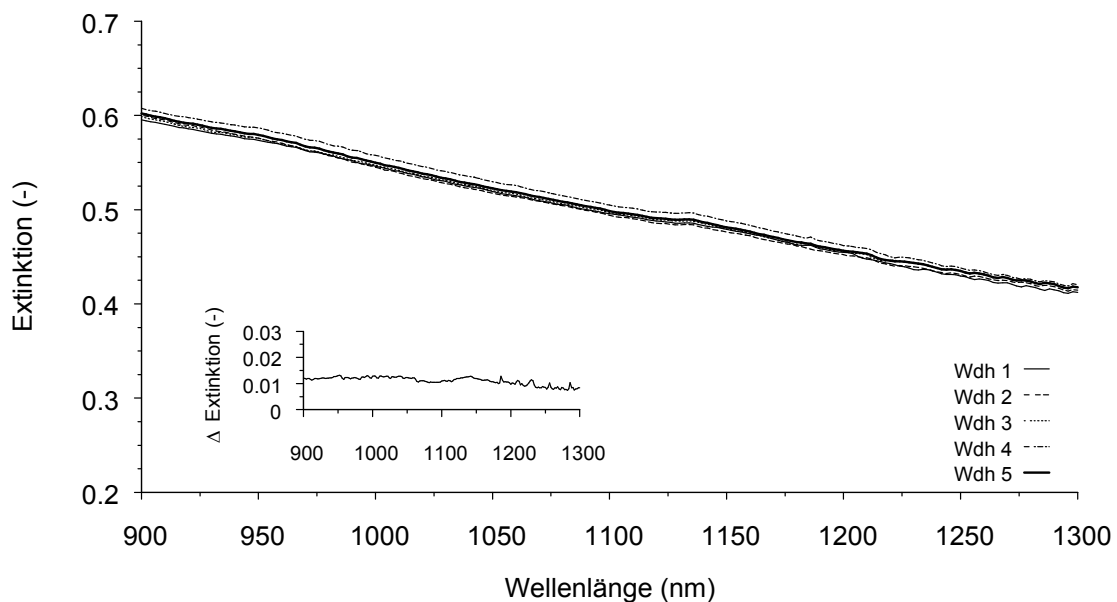


Abbildung 5.23: Reproduzierbarkeit von NIR-Extinktionsmessungen an einer Kultur von *Chlorella vulgaris* in Quarzküvetten. Gezeigt sind 5 Einzelmessungen derselben Probe nach jeweiliger erneuter Positionierung in der Küvettenhalterung. Im linken unteren Bildteil ist die erfasste Spannbreite der wellenlängenabhängigen Extinktionsdifferenzen zwischen den einzelnen Messungen eingezeichnet.

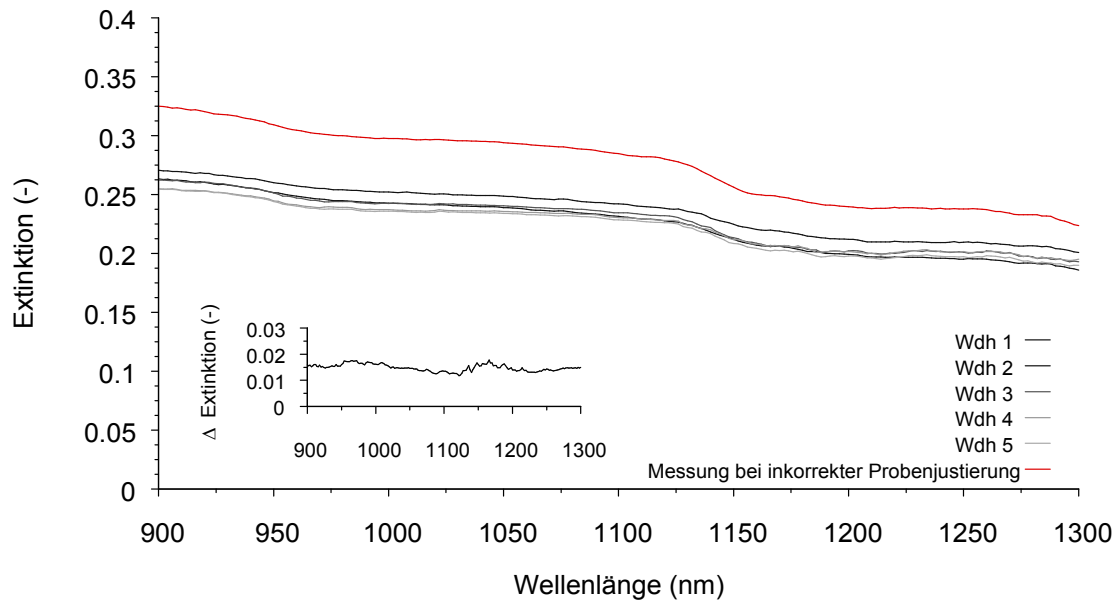


Abbildung 5.24: Reproduzierbarkeit von NIR-Extinktionsmessungen an einer Kultur von *Chlorella vulgaris* im geschlossenen Reaktorsystem. Gezeigt sind 6 Einzelmessungen derselben Probe nach jeweiliger erneuter Positionierung in der Spektrometermitte bei einer Schichtdicke der Suspension von 1 cm. Im linken unteren Bildteil ist die erfasste Spannweite der wellenlängenabhängigen Extinktionsdifferenzen zwischen 5 Einzelmessungen eingezeichnet. Das sechste Spektrum ist nicht inkludiert, da es explizit erzeugt worden ist, um den Einfluss einer inkorrekten Probenjustierung auf die Messergebnisse zu demonstrieren.

Auch im NIR-Bereich zeigte sich in den Küvettenpektren eine recht geringe Abweichung von ca. 0,01 Extinktionseinheiten, welche wiederum über den gesamten Spektralbereich relativ konstant ist. Bei Messungen direkt im Reaktor lag die Abweichung bei ca. 0,015 Extinktionseinheiten, wobei diese Differenz über den betrachteten Spektralbereich relativ konstant bleibt. Auch für den NIR-Bereich zeigt sich, dass teilweise extreme Ausreißer¹⁷ in den Spektraldaten möglich sind.

5.2.4.3 PHB-Referenzspektren für den unpolarisierten NIR-Bereich

Um eine Zuordnung einzelner Absorptionsbanden zu den verursachenden Molekülbindungen zu ermöglichen, wurden zunächst verschiedene Verdünnungsstufen einer PHB-Suspension in entionisiertem Wasser spektroskopisch vermessen. Dies diente einerseits dazu, minimal bzw. maximal im Reaktor messbare PHB-Konzentrationen zu ermitteln, andererseits wurden die anhand der Reinsubstanz aufgenommenen Spektren auf Plausibilität und das Vorhandensein ursächlicher Zusammenhänge zwischen Extinkti-

¹⁷ Dieses Spektrum wurde gezielt durch eine leicht schiefe Fixierung des Reaktorbehälters im Spektrometer erzeugt, so dass das Messlicht nicht senkrecht, sondern leicht schräg auf die Reaktoroberfläche traf.

onssignalen und Stoffeigenschaften (d.h. PHB-spezifische Extinktionsbanden) überprüft. Abbildung 5.25 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen für den NIR-Bereich unter Verwendung der unmodifizierten Spektrometerlampe als Lichtquelle.

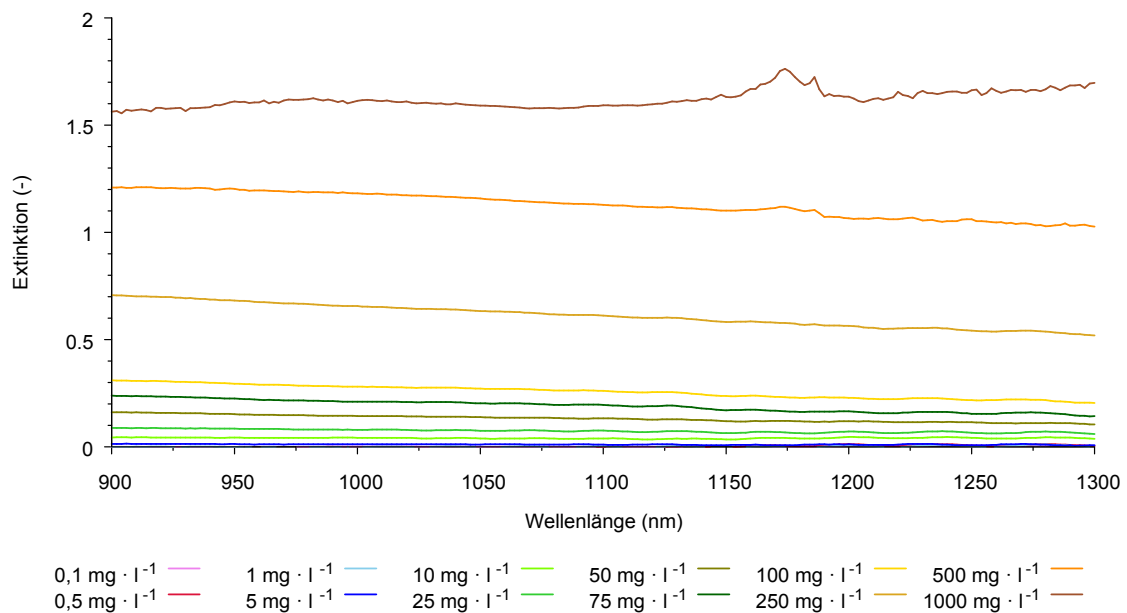


Abbildung 5.25: NIR-Extinktionsspektren verschieden konzentrierter PHB-Suspensionen in H₂O. Die Messungen erfolgten in geschlossenen Reaktoren bei Verwendung der nicht modifizierten Standardlichtquelle.

Wie zu erkennen, zeigt sich ein konzentrationsabhängiges Extinktionsverhalten über einen breiten Konzentrationsbereich. Auffällig ist der für die maximal konzentrierte Probe stark von den übrigen Konzentrationsstufen abweichende Spektralverlauf. Bei Konzentrationen ab 500 mg pro Liter ist zudem ein Peakmuster im Bereich von 1150 bis 1190 nm klar erkennbar, welches bei geringer konzentrierten Proben visuell nicht erkennbar ist.

5.2.4.4 Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten

Die gemessenen Rohspektren wurden wie alle weiteren Datensätze einer PLS-Regression unterzogen. Auch für diesen Datensatz sei zunächst ein Überblick über die Qualität der Rohdaten gegeben. Abbildung 5.26 zeigt NIR-Rohspektren ausgewählter Proben von *N. muscorum*.

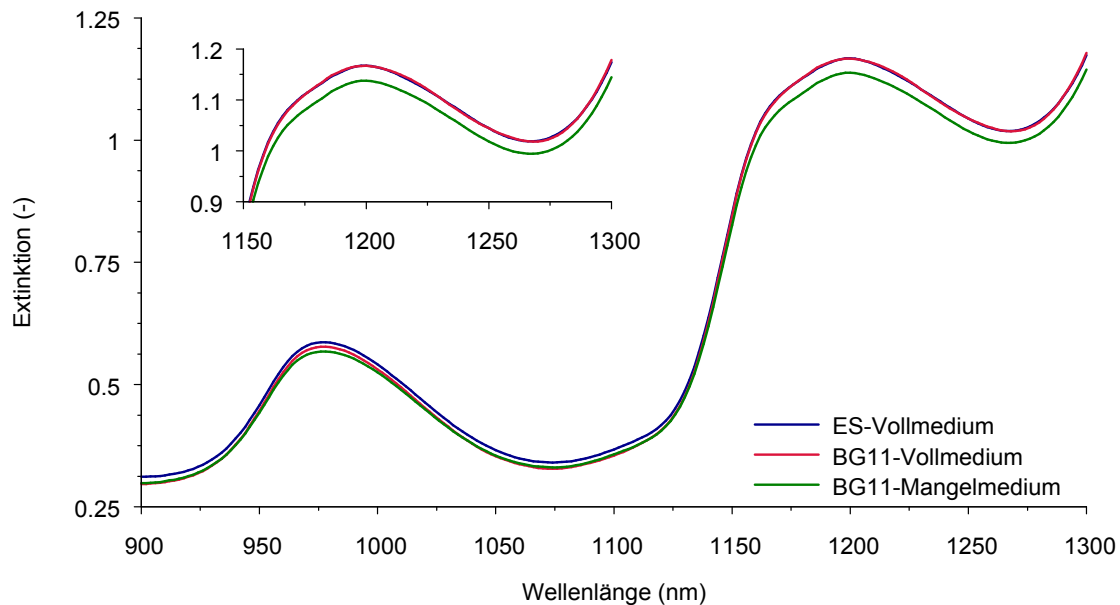


Abbildung 5.26: NIR-Extinktionsspektren verschiedener Kulturen von *N. muscorum*, aufgenommen nach einer Kulturdauer von 3 Wochen. Die Messungen fanden im geschlossenen Reaktor statt, wobei die Standardlichtquelle des Spektrometers verwendet wurde. Die gezeigten Spektren stammen von Proben mit einem PHB-Anteil von 9,65 (ES-Vollmedium), 6,32 (BG11-Vollmedium) sowie 15,57 (BG11-Mangelmedium) Gewichtsprozent bezogen auf die jeweilige Probentrockenmasse. Der Bereich von 1150 bis 1250 nm wurde für eine bessere Sichtbarkeit zusätzlich vergrößert abgebildet, da sich in den Messungen an PHB-Reinsubstanz hier starke Extinktionssignale zeigten.

Da von den Daten, welche in obiger Abbildung dargestellt sind, kein Wasser-Extinktionsspektrum abgezogen wurde, sind alle Spektren vor allem durch zwei starke Absorptionsbanden im Bereich von 975 und 1200 nm gekennzeichnet. Wie zu sehen, unterscheiden sich die einzelnen Spektren in ihren Verläufen visuell nur minimal voneinander und selbst im vergrößert abgebildeten Bereich von 1150 bis 1250 nm sind lediglich Intensitätsunterschiede zwischen den Spektren erkennbar und keine distinkten Abweichungen im Spektralverlauf. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass alle gemessenen Spektren aufgrund der wässrigen Messumgebung im Reaktor primär die obigen Verläufe zeigten, weshalb anhand der nachfolgend dargestellten Regressionsergebnisse eine detailliertere Darstellung der spektralen Varianz erfolgen soll.

Hierzu ist der folgenden Abbildung 5.27 das anhand der Rohdaten berechnete PLS-Regressionsmodell gezeigt.

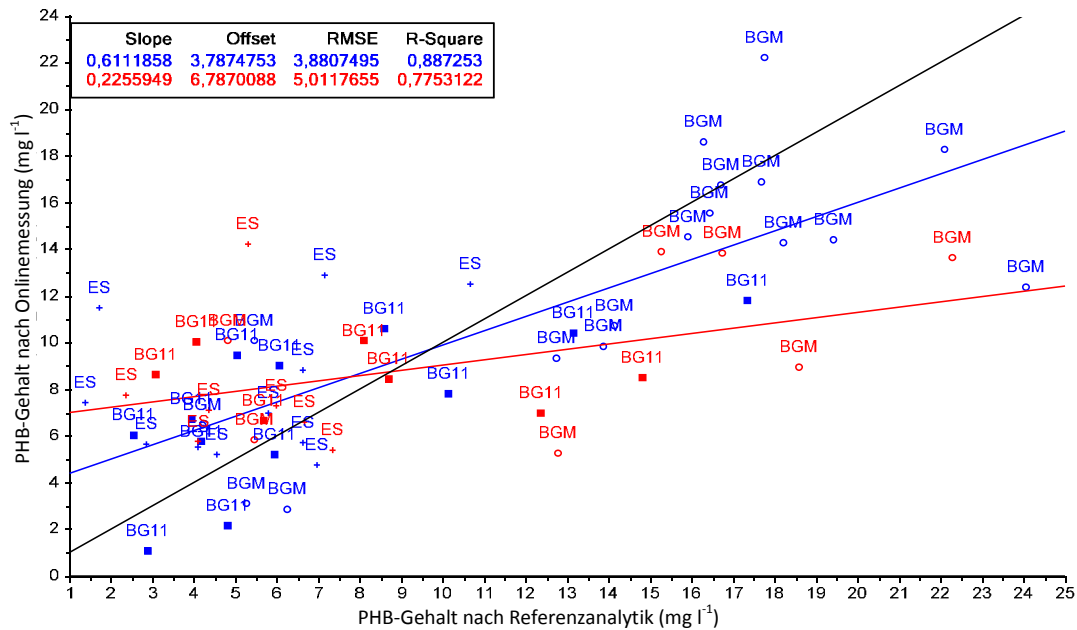


Abbildung 5.27: Übersicht der PLS-Regressionsergebnisse des 4. Versuchsdurchlaufs bei Verwendung der gemessenen NIR-Rohspektren als Vorhersagewerte. Gezeigt ist die Gegenüberstellung der per Referenzanalytik ermittelten PHB-Gehalte (Abszisse) mit den Vorhersagewerten des Regressionsmodells (Ordinate). Die PLS wurde mit 7 Faktoren ohne Zentrierung berechnet. Der Kalibrierdatensatz umfasst 40 Proben (blau), der Validierdatensatz 21 Proben (rot). In schwarz eingezeichnet ist die Winkelhalbierende, in blau die Regressionsfunktion der Kalibrierdaten, in rot jene der Validierdaten. Die Proben wurden in ES-Vollmedium („ES“), BG11-Vollmedium („BG11“) und BG11-Mangelmedium („BGM“) kultiviert.

Das erstellte PLS-Modell umfasste einen Datensatz von insgesamt 61 Proben, welche einen PHB-Gehalt von 1,37 bis 24,02 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ abdecken. Wie in der Statistikbox erkennbar, liegt der mittlere Modellfehler der Kalibrierung bei ca. 3,9 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ und jener der Validierung etwas höher bei ca. 5 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Für die Kalibrierung ist ein Bestimmtheitsmaß von 0,89 gegeben, während in der Validierung lediglich ein Wert von 0,78 erreicht wird. Wie erkennbar, ist die Vorhersage im Bereich geringer PHB-Konzentrationen teilweise relativ ungenau, wobei im gesamten Modell geringe PHB-Gehalte prinzipiell überschätzt, und hohe Gehalte unterschätzt werden. Für die PHB-Vorhersage anhand der Rohdaten erwies sich ein Modellumfang von 7 berechneten Hauptkomponenten als optimal.

Um herauszufinden, worauf die PHB-Vorhersage im NIR-Bereich beruht, werden auch hier die wellenlängenabhängigen Einflüsse auf die Berechnung der einzelnen Faktoren betrachtet. Eine Zusammenfassung ist in Abbildung 5.28 gegeben.

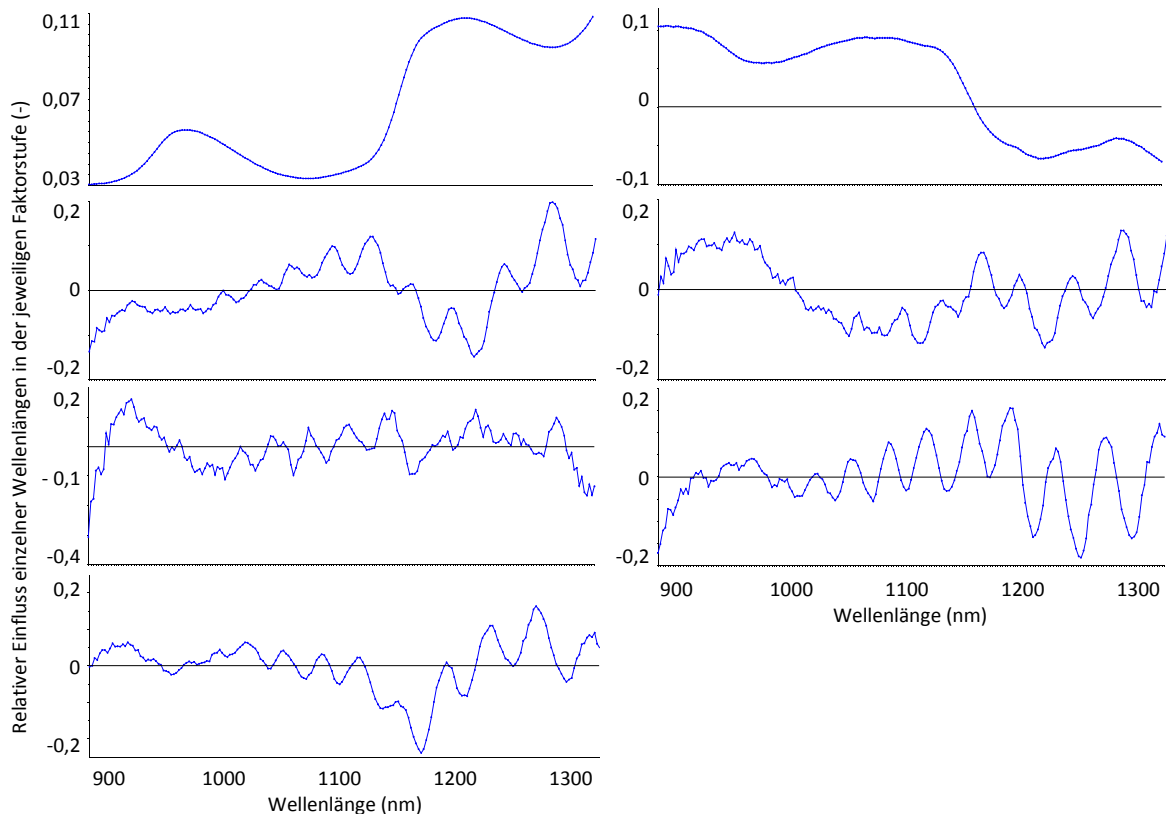


Abbildung 5.28: Relativer Einfluss der NIR-Spektraldaten auf das Vorhersagemodell. Gezeigt sind die Faktorstufen 1 - 7 (1 & 2 in der ersten Zeile, 3 & 4 in der zweiten, usw.), wobei größere Werte einen größeren Einfluss bedeuten.

Der erste Ladungsvektor sieht dem Absorptionsspektrum von Wasser im NIR-Bereich ähnlich, während der Zweite vertikal zum ersten gespiegelt erscheint. Höhere Faktoren wie der Dritte, weisen einen Einfluss im Wellenlängenbereich von 1150 bis 1200 nm auf. Im vierten Faktor ist der Bereich von 920 bis 960 nm am auffälligsten, während andere Wellenlängen bereits beginnen um die Nullachse zu schwanken. Dieses Verhalten verstärkt sich in den Faktoren 5 und 6 weiterhin, während im 7. Faktor (analog zum 3.) der Bereich um 1175 nm einen hohen Einfluss auf das Regressionsergebnis aufweist.

5.2.4.5 Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im unpolarisierten NIR-Bereich

Auch für die Messungen im NIR-Bereich soll im Folgenden ein umfassender Überblick über mehrere Versuchswiederholungen gegeben werden. Hierfür sind in Tabelle 5.6 die gesammelten Regressionsergebnisse aller drei mit unpolarisierter Messstrahlung durchgeführten Versuche aufgeführt.

Tabelle 5.6: Vergleich der für den unpolarisierten NIR-Spektralbereich erstellten Regressionsmodelle

Versuchsreihe	PHB-Gehalte ^a (mg l ⁻¹)	RMSEC ^b (mg l ⁻¹)	RMSEC ^c (%)	RMSEP ^b (mg l ⁻¹)	RMSEP ^c (%)	R ² Kalibrierung	R ² Validierung	Modellfaktoren
1 (Küvette)	3,375 - 31,719	3,7428	13,20	3,0379	10,72	0,919	0,940	7
3 (Reaktor, vertikal)	4,773 - 20,284	2,8671	18,48	3,5721	23,03	0,947	0,915	3
4 (Reaktor, vertikal)	0,678 - 24,042	3,8807	16,61	5,0118	21,45	0,887	0,775	7

Anzahl Kalibrier-/Validierproben: 59/39, 41/26, 40/21 (jeweils für Versuchsreihe 1, 3, 4)

^a Aufgeführt sind minimale und maximale PHB-Gehalte der Probengesamtheit jeder Versuchsreihe

^b Die aufgeführten absoluten RMSECs und RMSEPs sind jene der Rohdaten-basierten Modelle

^c Die prozentualen Werte sind berechnet anhand der absoluten RMSECs und RMSEPs bezogen auf die absoluten PHB-Gehaltsspannen

Aufgrund der verschiedenen Anzuchtbedingungen ergeben sich unterschiedliche Spannbreiten der innerhalb eines Versuchs erreichten PHB-Konzentrationen in den Reaktoren. Die bestimmten absoluten Vorhersagefehler der Modelle unterscheiden sich im NIR-Bereich zwischen allen drei Reihen, jedoch ist der Fehler vor allem im vierten Versuchslauf erhöht. Prozentual betrachtet hingegen zeigt sich eine ähnliche Größenordnung für die Messungen direkt im geschlossenen Reaktorbehälter während der Wert bei Messungen in Küvetten geringer ist. Auffallend sind die stark unterschiedlichen optimalen Modellumfänge, welche von 3 bis 7 Faktoren reichen.

Für eine eventuelle Verbesserung der anhand der Rohdaten erstellten Modelle wurden die NIR-Spektraldaten analog zum sichtbaren Spektralbereich diversen Vorbehandlungen unterzogen. Die Ergebnisse dieser Modelle sind in Abbildung 5.29 dargestellt, wobei für eine intuitivere Interpretation der Ergebnisse erneut die jeweils erzielten Vorhersagefehler, Bestimmtheitsmaße und Faktorenanzahlen in Bezug zu jenen Ergebnissen gesetzt wurden, welche anhand der Rohspektren erzielt wurden.

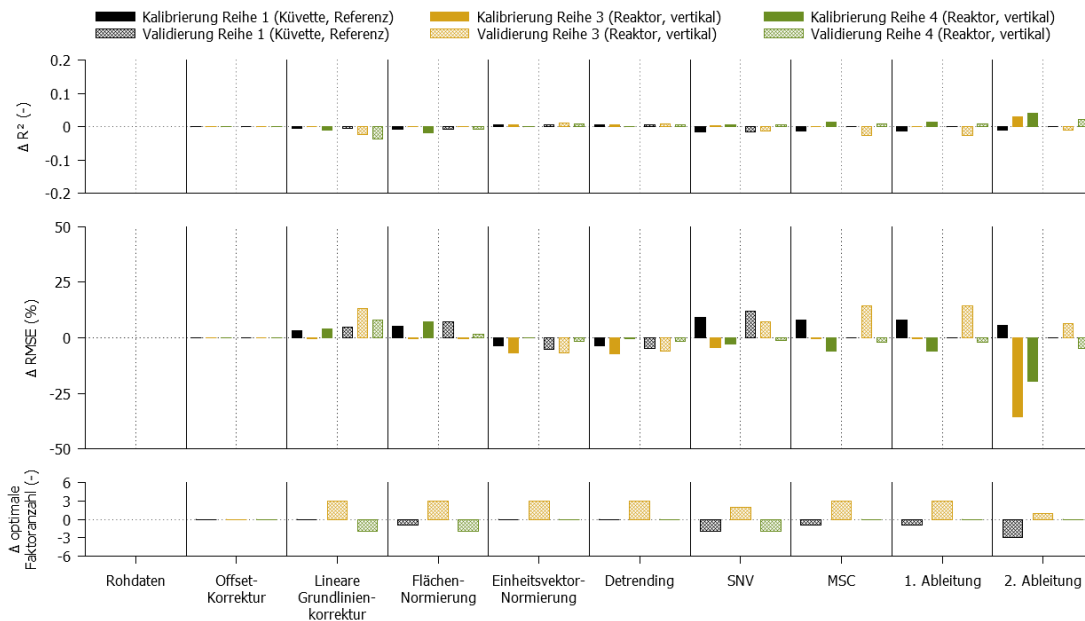


Abbildung 5.29: Übersicht aller für den unpolarisierten NIR-Bereich erstellten Regressionsmodelle bei Anwendung verschiedener Vorbehandlungen der spektralen Rohdaten. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse der Rohdaten-Regressionen als auf null gezogene Referenzen (für die erreichten Modellparameter siehe vorherige Tabelle 5.6) sowie die (prozentualen oder absoluten) Differenzen der Modellparameter bei Nutzung der vorbehandelten Spektraldaten.

Wie ersichtlich, ändert sich das Bestimmtheitsmaß der Regressionsmodelle bei keiner der Vorbehandlungen nennenswert. Lediglich bei Anwendung der linearen Grundlinienkorrektur sinkt es ab und bei Verwendung von Ableitungsspektren zweiter Ordnung steigt es leicht an. Auch eine konsistente Reduktion der Modellumfänge ist nicht zu beobachten. Bei Betrachtung der Vorhersagefehler lässt sich lediglich bei Einheitsvektornormierung und Detrending eine über alle Versuchsreihen beobachtbare Reduktion des RMSEP erkennen. Insgesamt zeigt sich im Vergleich zum sichtbaren Spektralbereich (vgl. Abbildung 5.21) in den Modellen, welche anhand vorbehandelter NIR-Daten berechnet wurden, eine größere Konsistenz in der Reaktion des RMSEP der einzelnen Versuchsreihen auf unterschiedliche Vorbehandlungsmethoden.

5.2.5 VIS-Polarisationsspektroskopie

Analog zu den in Kapitel 5.2.3 beschriebenen Ergebnissen, sollen in diesem Abschnitt die spektroskopischen Messungen dargestellt werden, welche unter Verwendung von zirkular links- bzw. rechtsdrehend polarisierter Strahlungsquellen durchgeführt worden sind.

5.2.5.1 Polarisationsabhängiges Absorptionsverhalten der Polymermaterialien im sichtbaren Spektralbereich

Da in einigen Messreihen mit polarisierter Messstrahlung gearbeitet wurde, sei an dieser Stelle das Verhalten der verschiedenen Polymermaterialien bei Betrachtung in Kreuzpolarisation dargestellt. Abbildung 5.30 zeigt einige Materialien, wobei in diesem Fall sichtbares Licht zur Anwendung kam um eine visuelle Darstellung in Echtfarben zu ermöglichen.

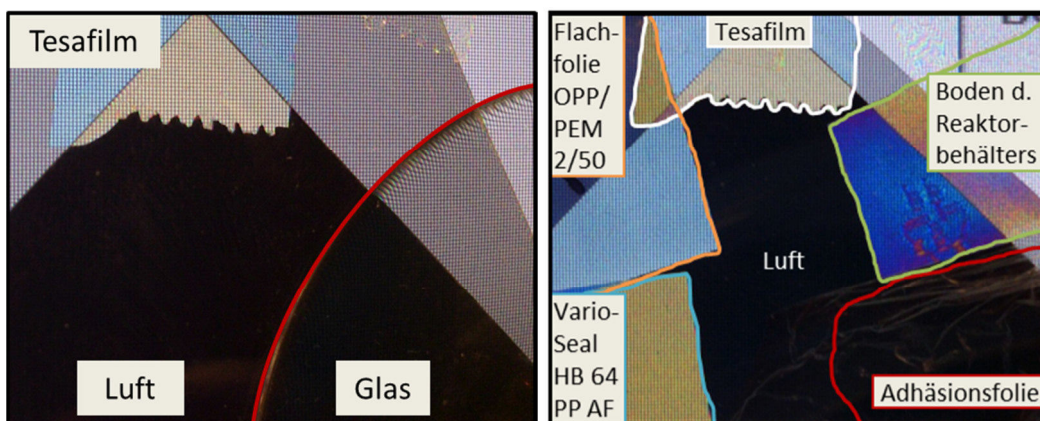


Abbildung 5.30: Polarisationsmodulierendes Transmissionsverhalten verwendeter Polymermaterialien. Die Aufnahme wurde mittels kreuzpolarisierten zirkularen Filtern aufgenommen, wobei die schwarze Fläche im Zentrum die übereinander liegenden gekreuzten Polarisationsfilter zeigt, welche das Messlicht blocken. Das spezifische Verhalten der einzelnen Polymere ist im überlappenden Bereich der zwei Filter sichtbar. Das im oberen Bildteil (als beinahe weiße Fläche sichtbare) markierte Tesafilm diente lediglich zur Fixierung der Polarisationsfilter. Die jeweiligen farbigen Linien markieren die Grenze der jeweiligen Probe, so beispielsweise der rote Kreisabschnitt, welcher die Glasfläche einschließt.

Im mittleren Bildteil sind als schwarze Fläche die gekreuzten Polarisationsfilter sichtbar. Demgegenüber sind an den Bildrändern als farbige Flächen die zwischen den Polfiltern inserierten Polymermaterialien sichtbar. Wie erkennbar, führen verschiedene Materialien zu unterschiedlichen sichtbaren Farben.

5.2.5.2 PHB-Referenzspektren für den polarisierten VIS-Bereich

Auch für die durchgeführten Messungen bei Verwendung polarisierter Anregungsstrahlung werden zunächst die Extinktionsspektren und nachfolgend die jeweils berechneten Extinktionskoeffizienten dargestellt. Die für links- sowie rechtsdrehend zirkular polarisierte Strahlung erzielten Ergebnisse sind in den folgenden Abbildung 5.31 und Abbildung 5.32 dargestellt.

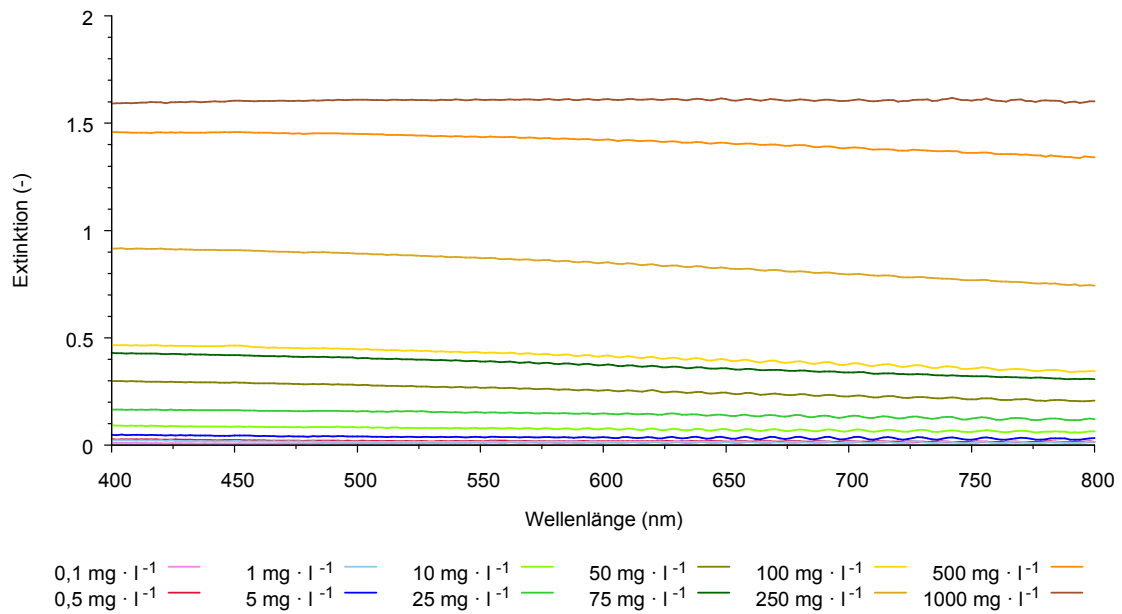


Abbildung 5.31: VIS-Extinktionsspektren verschieden konzentrierter PHB-Suspensionen in H₂O. Die Messungen erfolgten in geschlossenen Reaktoren bei Verwendung linksdrehend zirkularer Messstrahlung.

Augenscheinlich unterscheiden sich die Spektren und ihre Verläufe nicht von jenen, welche für unpolarisiertes Messlicht aufgenommen wurden. Auch für die nachfolgend dargestellten, unter rechtsdrehend zirkularen polarisierten Lichtbedingungen aufgenommenen Werte, ergibt sich ein vergleichbares Bild.

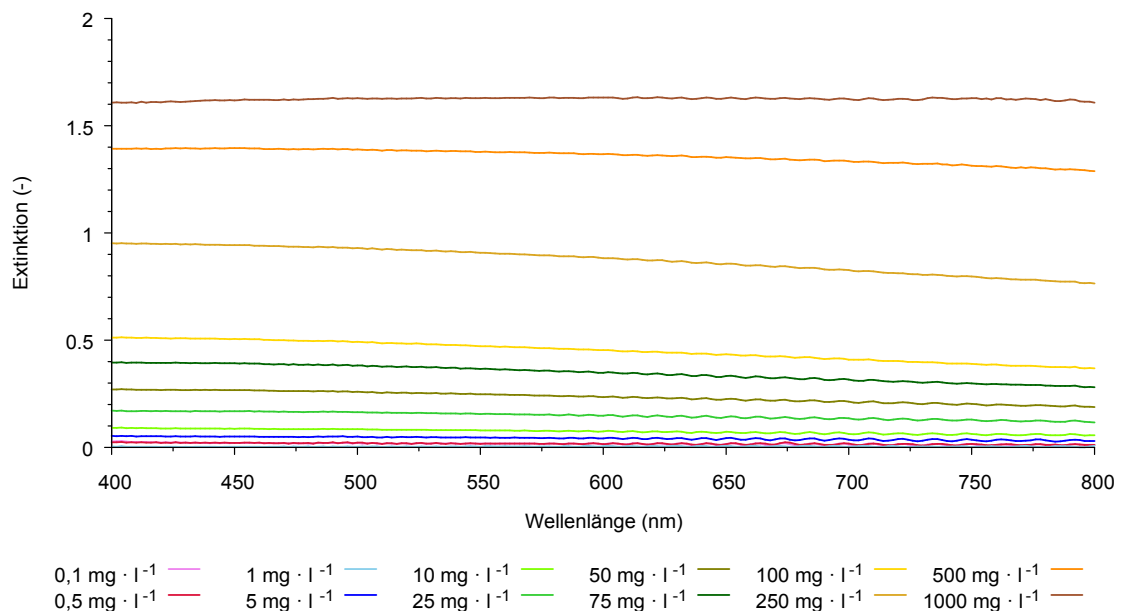


Abbildung 5.32: VIS-Extinktionsspektren verschieden konzentrierter PHB-Suspensionen in H₂O. Die Messungen erfolgten in geschlossenen Reaktoren bei Verwendung rechtsdrehend zirkularer Messstrahlung.

Die in obiger Abbildung 5.32 dargestellten Spektren sind augenscheinlich deckungsgleich zu jenen, der linksdrehenden Polarisation, auch hier kommen lediglich leicht abfallende Messwerte bei längeren Wellenlängen, die bereits beschriebenen Wellenmuster und keinerlei hervorstechende Extinktionspeaks vor.

Anhand der unter polarisierten Strahlungsbedingungen aufgenommenen Extinktionspektren wurden Circular dichroismen über den Messbereich von 400 bis 800 nm berechnet. Hierzu wurden die rechtsdrehenden von den linksdrehenden Spektraldaten subtrahiert und die Extinktionsdifferenz ausgewertet. Die so erhaltenen CD-Spektren sind in Abbildung 5.33 gezeigt.

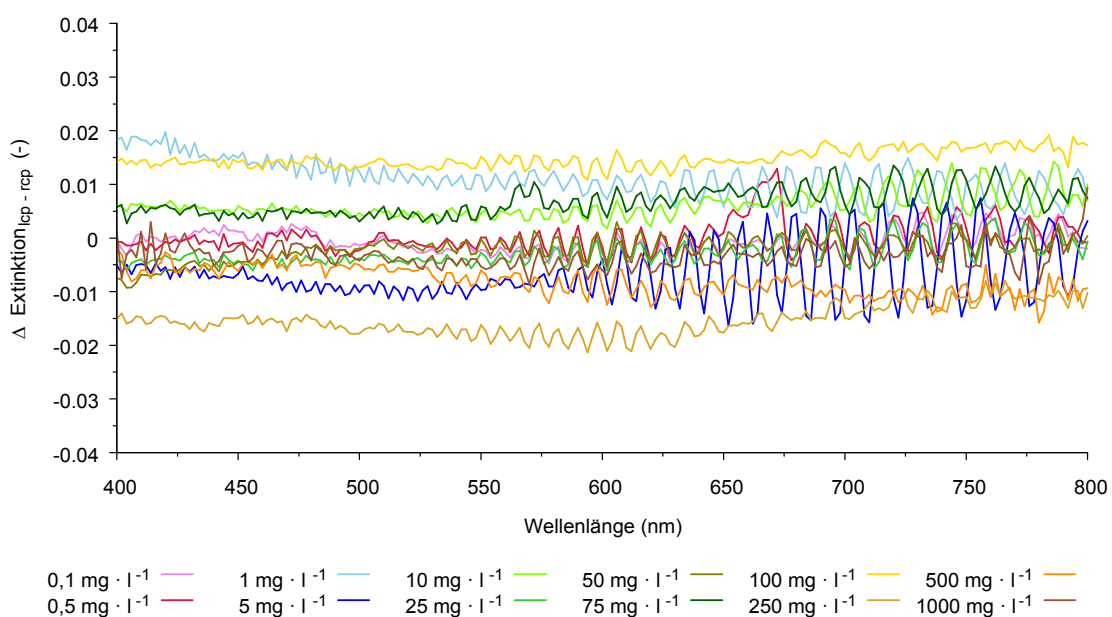


Abbildung 5.33: Berechnete VIS-Circulardichroismen verschieden konzentrierter PHB-Suspensionen in H_2O . Die Messungen erfolgten in geschlossenen Reaktoren bei Verwendung links- (lcp) sowie rechtsdrehend (rcp) zirkular polarisierter Messstrahlung. Die gezeigten Spektren sind Differenzspektren der linksdrehenden minus der rechtsdrehenden Extinktionswerte im Bereich von 400 bis 800 nm.

Es fällt auf, dass es in den berechneten CD-Spektren keinerlei distinkte Differenzbanden im sichtbaren Spektralbereich gibt. Die Spektren aller Konzentrationsstufen liegen hierbei sehr nah bei null, einzig drei Verdünnungsstufen (namentlich 1, 100 und 250 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) weichen um den Faktor 2 von der Bandbreite ab, in der sich die polarisationsbedingte Extinktionsdifferenz aller übrigen Stufen bewegt. Augenscheinlich zeigt sich kein direkter Zusammenhang zwischen PHB-Konzentration und Signalintensität, jedoch zeigt sich in allen CD-Spektren, welche für den VIS-Bereich berechnet wurden, ein sehr schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis.

5.2.5.3 Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten

Um einen Überblick über die im Kulturverlauf auftretenden Veränderungen in den Spektraldaten zu geben auf denen letztlich die Regressionsmodelle beruhen, werden im Folgenden zunächst Rohspektren gezeigt, gefolgt von den erstellten Regressionsmodellen. Die im sichtbaren Spektralbereich mittels polarisierter Messstrahlung aufgenommenen Rohspektren sind anhand von je drei Beispielen in Abbildung 5.34 sowie Abbildung 5.35 dargestellt.

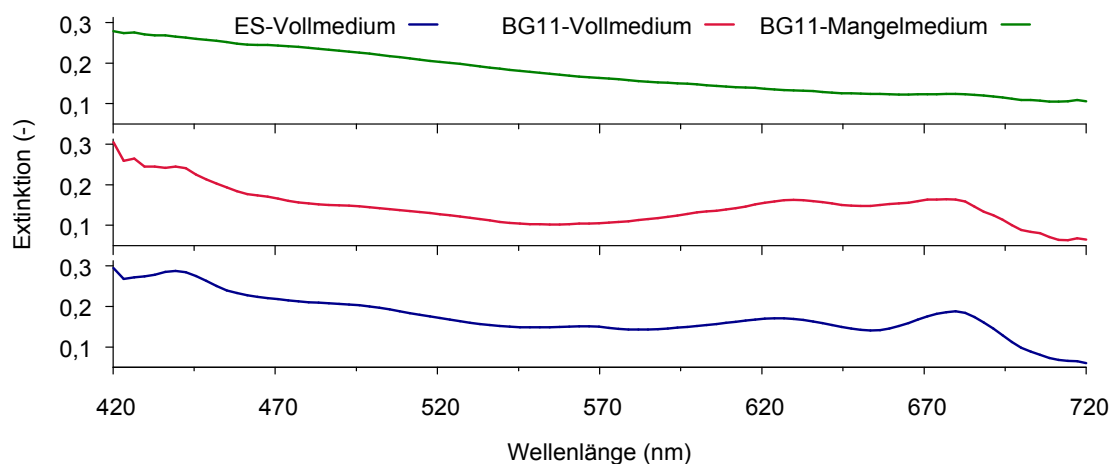


Abbildung 5.34: VIS-Extinktionsspektren verschiedener Kulturen von *N. muscorum*, aufgenommen nach einer Kulturdauer von 3 Wochen mittels linksdrehend zirkular polarisierter Strahlung. Die gezeigten Spektren stammen von Proben mit einem PHB-Anteil von 12,42 (ES-Vollmedium), 3,70 (BG11-Vollmedium) sowie 13,51 (BG11-Mangelmedium) Gewichtsprozent bezogen auf die jeweilige Probentrockenmasse.

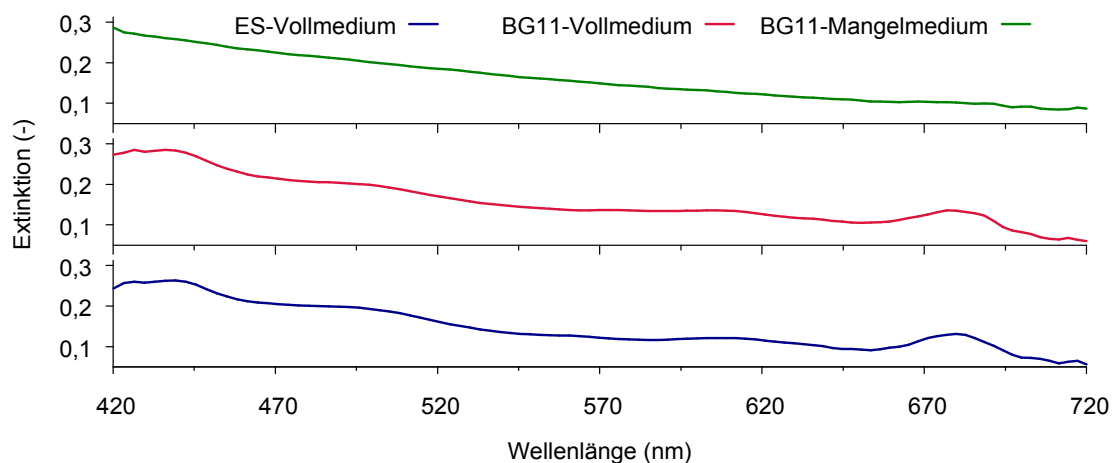


Abbildung 5.35: VIS-Extinktionsspektren verschiedener Kulturen von *N. muscorum*, aufgenommen nach einer Kulturdauer von 3 Wochen mittels rechtsdrehend zirkular polarisierter Strahlung. Die gezeigten Spektren stammen von Proben mit einem PHB-Anteil von 12,42 (ES-Vollmedium), 5,48 (BG11-Vollmedium) sowie 13,51 (BG11-Mangelmedium) Gewichtsprozent bezogen auf die jeweilige Probentrockenmasse.

In den obigen Abbildungen zeigen sich in den Spektren jener Proben, welche ohne Mangelbedingungen kultiviert wurden, jeweils eine Extinktionsbande im Bereich von ca. 435 nm, Extinktionsbanden bei ca. 500 und 620 nm, sowie eine weitere Extinktionsbande bei ca. 680 nm. Das Spektrum der Mangelprobe weist einen stärkeren Anstieg im kurzwelligen Spektralbereich auf und die genannten Extinktionsbanden sind zudem weniger stark ausgeprägt. Augenscheinlich weist das BG11-Vollmediumspektrum bei rechtsdrehender Polarisierung einen sehr ähnlichen Verlauf zum ES-Vollmediumspektrum auf, während der Verlauf bei linksdrehender Polarisierung eher schwammig ist, und vor allem die klare Extinktionsbande bei 680 nm an Ausprägung verliert. Betrachten wir nunmehr die in Abbildung 5.36 dargestellten CD-Spektren für den sichtbaren Spektralbereich.

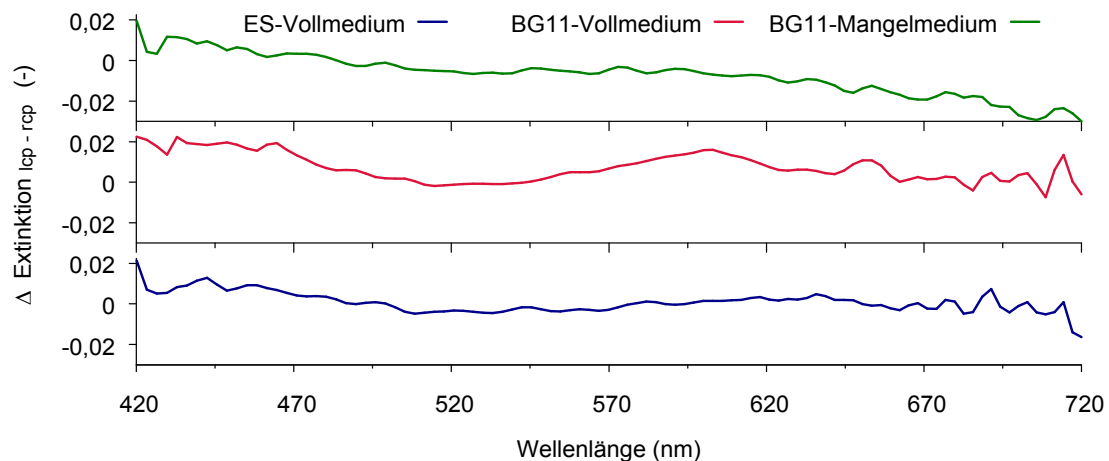


Abbildung 5.36: Berechnete VIS-Circulardichroismen verschiedener Kulturen von *N. muscorum*, aufgenommen nach einer Kulturdauer von 3 Wochen. Die Messungen erfolgten in geschlossenen Reaktoren bei Verwendung links- (lcp) sowie rechtsdrehend (rcp) zirkular polarisierter Messstrahlung. Die gezeigten Spektren sind Differenzspektren der linksdrehenden minus der rechtsdrehenden Extinktionswerte, wobei das Spektrum der ES-Vollmedium-Probe in Originalintensität dargestellt ist, während die weiteren Spektren für eine bessere Vergleichbarkeit um 0,02 bzw. 0,04 Einheiten in der Vertikalen verschoben wurden. Die gezeigten Spektren stammen von Proben mit einem PHB-Anteil von 10,81 (ES-Vollmedium), 5,09 (BG11-Vollmedium) sowie 12,85 (BG11-Mangelmedium) Gewichtsprozent bezogen auf die jeweilige Probentrockenmasse.

Es fällt auf, dass ES-Vollmedium und BG11-Mangelmedium relativ ähnliche Spektren hervorrufen, während BG11-Vollmedium einen abweichenden Verlauf mit ausgeprägter Extinktionsbande bei ca. 600 nm bedingt. Beide Vollmedien resultieren in CD-Spektralverläufen, welche im positiven Bereich liegen (d.h. die gemessenen linksdrehend zirkularen Extinktionen liegen über den gesamten betrachteten Spektralbereich über den rechtsdrehend zirkularen), wohingegen das Mangelmedium ab ca. 620

nm in den negativen Bereich absinkt (bei Betrachtung der Abbildung sei die Vertikalverschiebung einiger Spektren beachtet!). Insgesamt sind noch die niedrigen Intensitäten aller drei gezeigten CD-Spektren hervorzuheben.

Mit den aufgenommenen Spektraldaten wurden nachfolgend Regressionsmodelle erstellt, was sowohl anhand der Rohdaten, als auch nach Anwendung verschiedener, im Material-und-Methoden-Teil dieser Arbeit aufgeführter Vorbehandlungen geschah.

Die Ergebnisse der Regressionen des 4. Versuchsdurchlaufs sind in den folgenden Abbildungen dargestellt, während weitere Versuchsläufe numerisch abgehandelt werden. Die folgende Abbildung 5.37 zeigt die Ergebnisse der anhand mittels polarisiertem sichtbaren Licht gemessenen und berechneten Spektren durchgeführten PLS-Regressionen des 4. Versuchsdurchlaufs.

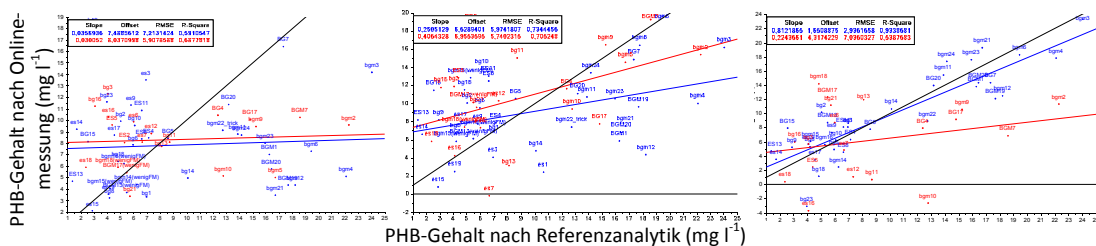


Abbildung 5.37: Übersicht der PLS-Regressionsergebnisse des 4. Versuchsdurchlaufs bei Verwendung der polarisierten VIS-Rohspektren als Vorhersagewerte. Links: linksdrehend zirkular polarisiertes Messlicht; Mitte: rechtsdrehende Polarisation; Rechts: berechnete CD-Spektren als Datengrundlage. Gezeigt ist jeweils die Gegenüberstellung der per Referenzanalytik ermittelten PHB-Gehalte (Abszisse) mit den Vorhersagewerten des Regressionsmodells (Ordinate). Die PLS wurden mit 7 Faktoren ohne Zentrierung berechnet. Die Kalibrierdatensätze (blau) umfassten jeweils 39, 40 bzw. 38 Proben, die Validierdatensätze (rot) umfassten 21, 21 bzw. 19 Proben. In schwarz eingezeichnet ist die Winkelhalbierende, in blau die Regressionsfunktion der Kalibrierdaten, in rot jene der Validierdaten. Die Proben wurden in ES-Vollmedium („ES“), BG11-Vollmedium („BG11“) und BG11-Mangelmedium („BGM“) kultiviert.

Die erstellten PLS-Modelle umfassen einen Datensatz von insgesamt 60 Proben, wobei im Falle der CD-Spektren lediglich 19 Validierproben verwendet werden konnten. Wie im linken Abbildungsteil zu erkennen, weichen die Regressionsgeraden sehr stark von der Winkelhalbierenden ab und die Datenpunkte sind zudem relativ ungeordnet im Ergebnisraum verteilt. Gleiches gilt für das Modell auf Basis der rechtsdrehend polarisierten Spektren. Bei beiden Modellen ist zudem der Modell-Offset relativ hoch. Auch das CD-Spektren-basierte Modell weist ähnliche Charakteristika auf, wobei sich die Regressionsgeraden der Validierung und vor allem der Validierung der Winkelhalbierenden annähern.

Auch für diese Modelle soll der Einfluss der einzelnen Wellenlängen in den Messspektren gezeigt werden. Dies ist der Übersichtlichkeit halber in der folgenden Abbildung 5.38 für alle drei Modelle zusammengefasst.

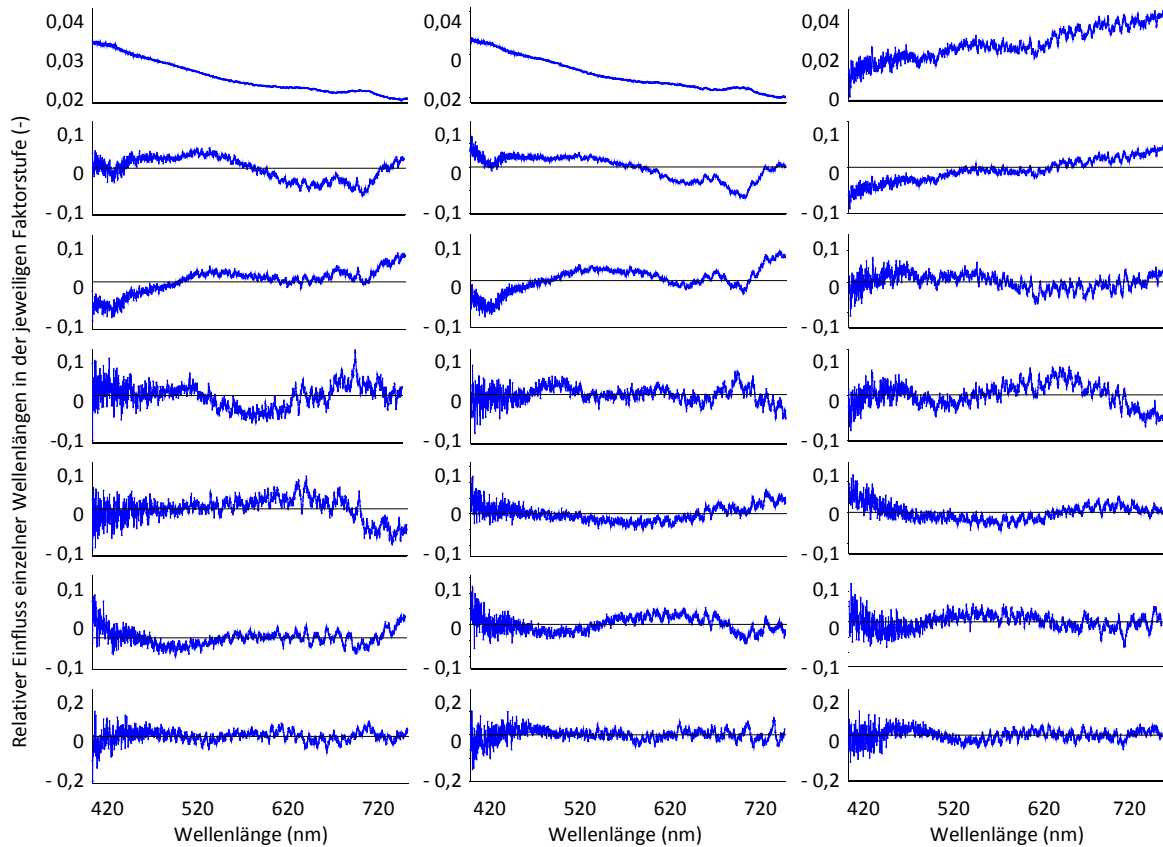


Abbildung 5.38: Relativer Einfluss der VIS-Spektraldaten auf die Vorhersagemodelle. Links: Linksdrehend zirkular polarisierte Messstrahlung; Mitte: Rechtsdrehende Polarisation; Rechts: berechnete CD-Spektren als Datengrundlage. Gezeigt sind die Faktorstufen 1 - 7 der PLS-Modelle (jeweils von oben nach unten), wobei größere Werte einen größeren relativen Einfluss bedeuten.

Analog zu jenem Regressionsmodell, welches anhand der mit unpolarisiertem Messlicht aufgenommenen Spektren berechnet wurde, zeigt sich in der ersten Faktorstufe der PLS-Modelle, welche auf polarisierten Rohdaten beruhen, ein starker Anstieg zum kurzwelligen Spektralbereich. Die beinahe identischen Verläufe für links- und rechtsdrehend zirkular polarisiertes Licht in den Faktorstufen 2 und 3 zeigen vor allem Signale im Bereich von 500, sowie bei 680 Nanometern. Die Faktoren 4 und 5 zeigen gegenläufige Einflussmuster, wobei in ihnen die Bereiche von 500 bis 600 Nanometern signalbehaftet sind. Die Faktoren 6 und vor allem 7 zeigen kaum noch von der Nulllinie abweichende Strukturen. Bei Betrachtung der Faktorladungen des CD-Spektrenbasierten Modells zeigen sich diese Schwankungen um die Nulllinie bereits ab dem

dritten Faktor und lediglich die Faktoren 1 und 2 zeigen Einflussmuster, welche jedoch im Gegensatz zum ersten Faktor der anderen Modelle einen nahezu linearen Anstieg zum langwelligen Spektralbereich aufweisen.

5.2.5.4 Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im polarisierten VIS-Bereich

Nachdem die spektralen Varianzen, beispielhaft ausgewählte Regressionsdurchläufe sowie der Regression zugrunde liegenden Spektralbereiche dargestellt worden sind, soll im Folgenden ein umfassender Überblick über mehrere Versuchswiederholungen gegeben werden. Hierfür sind in Tabelle 5.7, Tabelle 5.8 und Tabelle 5.9 die gesammelten Ergebnisse aller für den sichtbaren Spektralbereich mit polarisierter Messstrahlung erstellten Regressionsmodelle aufgeführt.

Tabelle 5.7: Vergleich der VIS-Regressionsmodelle, welche auf linksdrehend zirkular polarisiert gemessenen Spektraldaten beruhen

Versuchsreihe	PHB-Gehalte ^a (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^c (%)	RMSEP ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEP ^c (%)	R ² Kalibrierung	R ² Validierung	Modellfaktoren
1 (Küvette)	3,375 - 31,719	2,4283	8,57	3,1752	11,20	0,966	0,936	5
2 (Reaktor, horizontal)	7,804 - 87,379	13,4337	16,88	14,0948	17,71	0,780	0,755	4
4 (Reaktor, vertikal)	0,678 - 24,042	7,2121	30,87	5,9079	25,29	0,591	0,688	1

Anzahl Kalibrier-/Validierproben: 59/40, 48/32, 39/21 (jeweils für Versuchsreihe 1, 2, 4)

Tabelle 5.8: Vergleich der VIS-Regressionsmodelle, welche auf rechtsdrehend zirkular polarisiert gemessenen Spektraldaten beruhen

Versuchsreihe	PHB-Gehalte ^a (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^c (%)	RMSEP ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEP ^c (%)	R ² Kalibrierung	R ² Validierung	Modellfaktoren
1 (Küvette)	3,375 - 31,719	2,2545	7,95	3,5168	12,41	0,971	0,921	5
2 (Reaktor, horizontal)	7,804 - 87,379	7,5324	9,47	16,2076	20,37	0,931	0,676	5
4 (Reaktor, vertikal)	0,678 - 24,042	5,9742	25,57	5,7402	24,57	0,734	0,705	3

Anzahl Kalibrier-/Validierproben: 59/40, 48/32, 40/21 (jeweils für Versuchsreihe 1, 2, 4)

Tabelle 5.9: Vergleich der VIS-Regressionsmodelle, die auf den CD-Spektren beruhen, welche aus links- und rechtsdrehend zirkular polarisiert gemessenen Spektraldaten berechnet wurden

Versuchsreihe	PHB-Gehalte ^a (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^c (%)	RMSEP ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEP ^c (%)	R ² Kalibrierung	R ² Validierung	Modellfaktoren
1 (Küvette)	3,375 - 31,719	1,5355	5,42	4,6235	16,31	0,986	0,868	4
2 (Reaktor, horizontal)	7,804 - 87,379	8,3313	10,47	19,8578	24,95	0,915	0,514	5
4 (Reaktor, vertikal)	0,678 - 24,042	2,9362	12,57	7,036	30,11	0,934	0,539	6

Anzahl Kalibrier-/Validierproben: 58/38, 48/32, 38/19 (jeweils für Versuchsreihe 1, 2, 4)

^a Aufgeführt sind minimale und maximale PHB-Gehalte der Probengesamtheit jeder Versuchsreihe

^b Die aufgeführten absoluten RMSECs und RMSEPs sind jene der Rohdaten-basierten Modelle

^c Die prozentualen Werte sind berechnet anhand der absoluten RMSECs und RMSEPs bezogen auf die absoluten PHB-Gehaltsspannen

In den Rohspektren-Modellen der zirkular polarisiert gemessenen Versuchsvarianten zeigen sich ähnliche Kalibrierungs- und Vorhersagefehler für links- und rechtsdrehende Messstrahlung, und auch die Bestimmtheitsmaße der Regressionen sind sich sehr ähnlich. Wie in den Tabelle 5.7 und Tabelle 5.8 ersichtlich, weisen die Küvettenmessungen stets die geringsten Fehlerwerte auf, während Horizontal- und vor allem Vertikalmessungen direkt in den geschlossenen Reaktoren zu schlechteren Regressionsergebnissen führten. Bei Betrachtung der Parameter der CD-Spektren-Regression (Tabelle 5.9) fällt hingegen auf, dass die Kalibrierfehler teilweise geringer sind als in den Rohspektren-Modellen, die Vorhersagefehler jedoch stark in die Höhe schießen während zudem die Bestimmtheitsmaße der Validierung stark verringert sind. Allen Modellen ist der optimale Umfang von 4-5 Faktoren gemein, wobei die vierte Versuchsreihe mit teilweise stark verringerten oder leicht erhöhten Optima heraussticht.

Vergleicht man die obigen Ergebnisse mit den Modelldaten der unpolarisierten Regressionen (siehe Tabelle 5.5), so liegen alle Vorhersagefehler über jenen der letztgenannten Modelle wobei vor allem vertikale Messungen der Spektraldaten zu stark erhöhten Vorhersagefehlern in den Modellen führen.

Analog zur Zusammenfassung der Effekte der angewendeten Datenvorbehandlungen aus Abschnitt 5.2.3.5 für den unpolarisierten VIS-Bereich werden in Abbildung 5.39,

Abbildung 5.40 und Abbildung 5.41 alle Modellergebnisse nach verschiedenen Vorbehandlungen der polarisiert gemessenen und berechneten Spektren präsentiert.

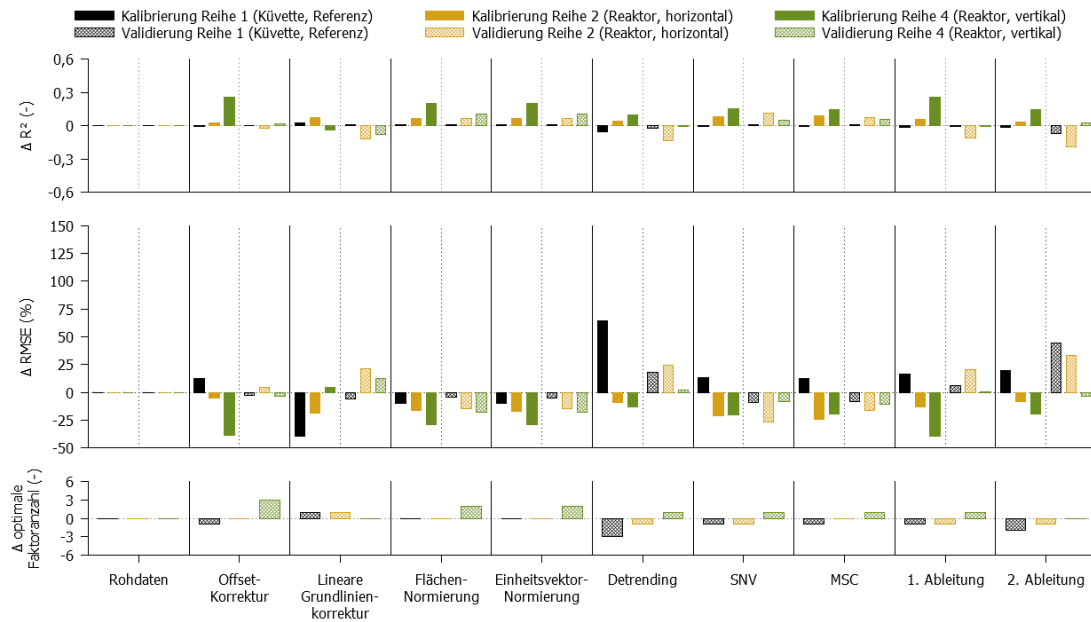


Abbildung 5.39: Übersicht aller für den linksdrehend zirkular polarisierten VIS-Bereich erstellten Regressionsmodelle bei Anwendung verschiedener Vorbehandlungen der spektralen Rohdaten. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse der Rohdaten-Regressionen als auf null gezogene Referenzen (für die erreichten Modellparameter siehe oben Tabelle 5.7 bis Tabelle 5.9) sowie die (prozentualen oder absoluten) Differenzen der Modellparameter bei Nutzung der vorbehandelten Spektraldaten.

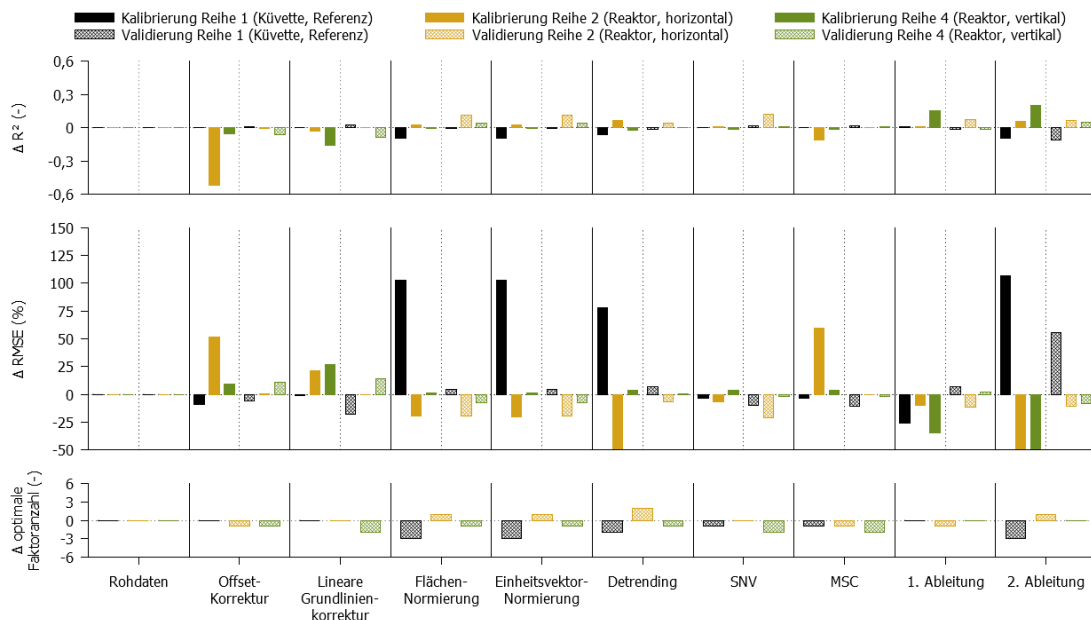


Abbildung 5.40: Übersicht aller für den rechtsdrehend zirkular polarisierten VIS-Bereich erstellten Regressionsmodelle bei Anwendung verschiedener Vorbehandlungen der spektralen Rohdaten. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse der Rohdaten-Regressionen als auf null gezogene Referenzen sowie die (prozentualen oder absoluten) Differenzen der Modellparameter bei Nutzung der vorbehandelten Spektraldaten.

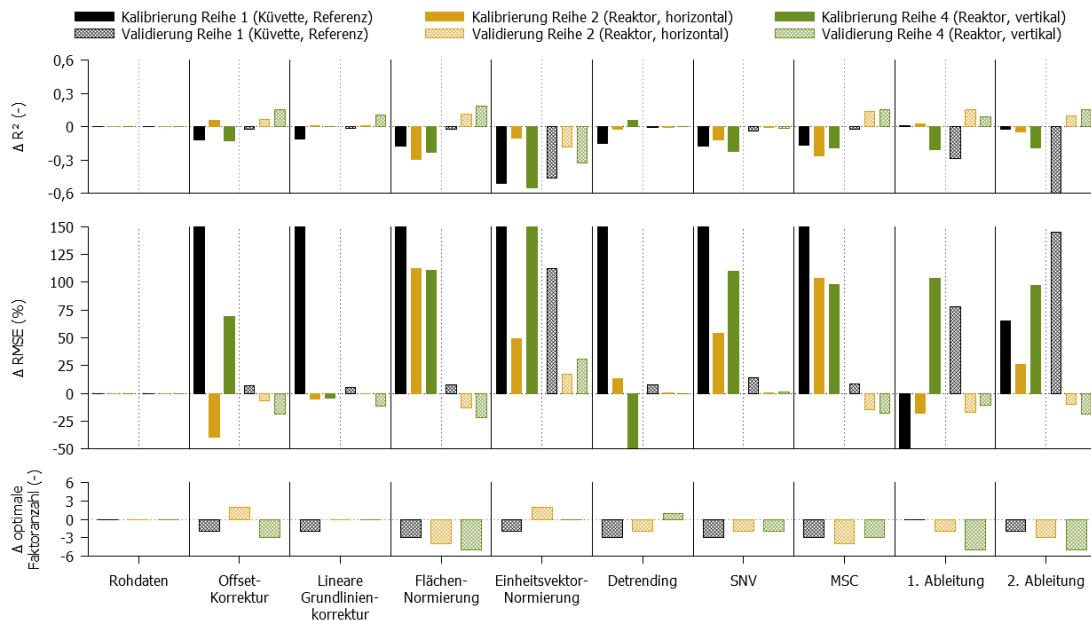


Abbildung 5.41: Übersicht aller anhand von VIS-CD-Spektren erstellten Regressionsmodelle bei Anwendung verschiedener Vorbehandlungen der spektralen Rohdaten. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse der Rohdaten-Regressionen als auf null gezogene Referenzen sowie die (prozentualen oder absoluten) Differenzen der Modellparameter bei Nutzung der vorbehandelten Spektraldaten.

Für die unter zirkularer Polarisierung gemessenen Spektren und die daraus erstellten Regressionsmodelle ergibt sich bei Anwendung diverser Vorbehandlungsmethoden der Rohdaten ein sehr uneinheitliches Bild bezüglich der resultierenden Modellparameter. Während für linksdrehende Polarisierung des Messlichts vor allem Verfahren zur Normierung der Spektraldaten (Flächen- und Einheitsvektornormierung) sowie solche zur Streulichtkorrektur (SNV und MSC) zur Verbesserung der Vorhersagefehler um bis zu 25 %, bei gleichzeitig leicht erhöhten Bestimmtheitsmaßen führen, zeigen sich bei rechtsdrehender Polarisierung lediglich bei den Normierungsverfahren leichte Verbesserungen, während gleichzeitig die Bestimmtheitsmaße stark verringert sind. Auch die optimalen Modellumfänge schwanken zwischen den Behandlungen, wobei auch hier Methoden zur Streulichtkorrektur die besten Ergebnisse erzielen. Bei Verwendung der berechneten CD-Spektren als Datengrundlage ergibt sich ein noch inkonsistenteres Bild, wobei fast alle Verfahren zu einer Erhöhung der Vorhersagefehler führen und zudem extreme Verringerungen in den optimalen Modellumfängen zu beobachten sind.

5.2.6 NIR-Polarisationsspektroskopie

Analog zu den in Kapitel 5.2.4 beschriebenen Ergebnissen werden in diesem Abschnitt jene spektroskopischen Messungen dargestellt, die unter Verwendung von zirkular links- bzw. rechtsdrehend polarisierter Strahlungsquellen durchgeführt wurden.

5.2.6.1 Polarisationsabhängiges Absorptionsverhalten der Polymermaterialien im nah-infraroten Spektralbereich

Da für den NIR-Bereich keine visuelle Auswertung möglich ist und zudem lediglich eine Verzögerungsplatte zur Verfügung stand (wodurch keine Filterkreuzung möglich war), wurden diese Messungen dort nicht durchgeführt.

5.2.6.2 PHB-Referenzspektren für den polarisierten NIR-Bereich

Wie bereits in Abschnitt 5.2.4.3 beschrieben, sollten zunächst Referenz-Extinktionsspektren reiner PHB-Suspensionen aufgenommen werden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 5.42 und Abbildung 5.43 dargestellt.

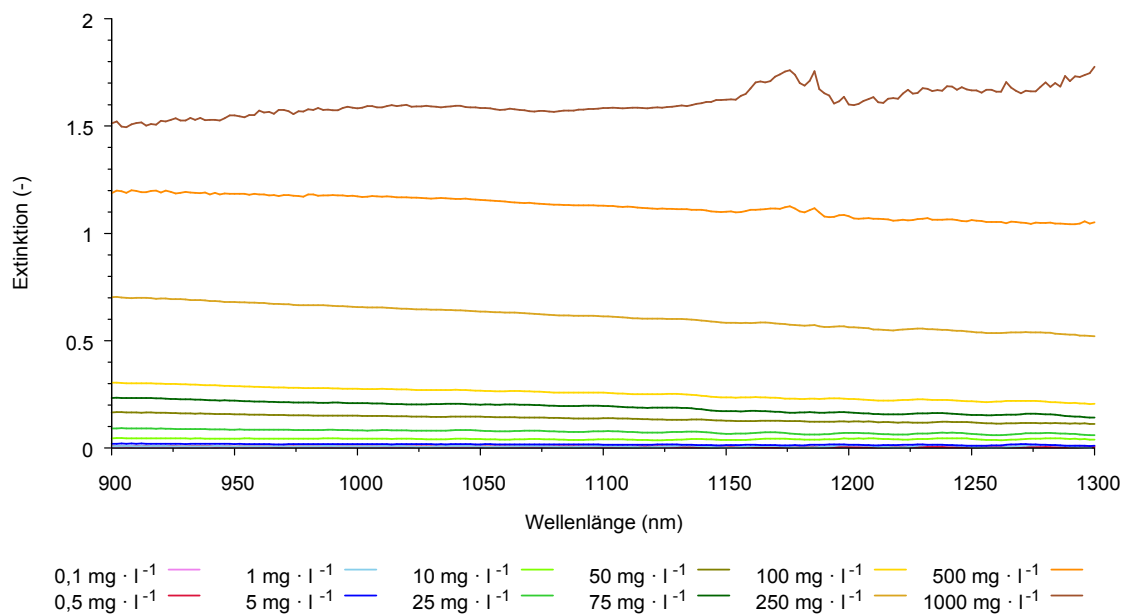


Abbildung 5.42: NIR-Extinktionsspektren verschieden konzentrierter PHB-Suspensionen in H₂O. Die Messungen erfolgten in geschlossenen Reaktoren bei Verwendung linksdrehend zirkularer Messstrahlung.

Wie zu erkennen, zeigen sich auch in diesem Versuchssetup vor allem bei hohen PHB-Konzentrationen Extinktionssignale im Bereich von 1150 bis 1190 nm neben der relativ linearen Extinktionsabnahme von 900 bis 1300 nm. Zur besseren Vergleichbarkeit

werden in der folgenden Grafik zunächst die Extinktionsspektren unter Verwendung rechtsdrehend zirkularen Messlichtes dargestellt.

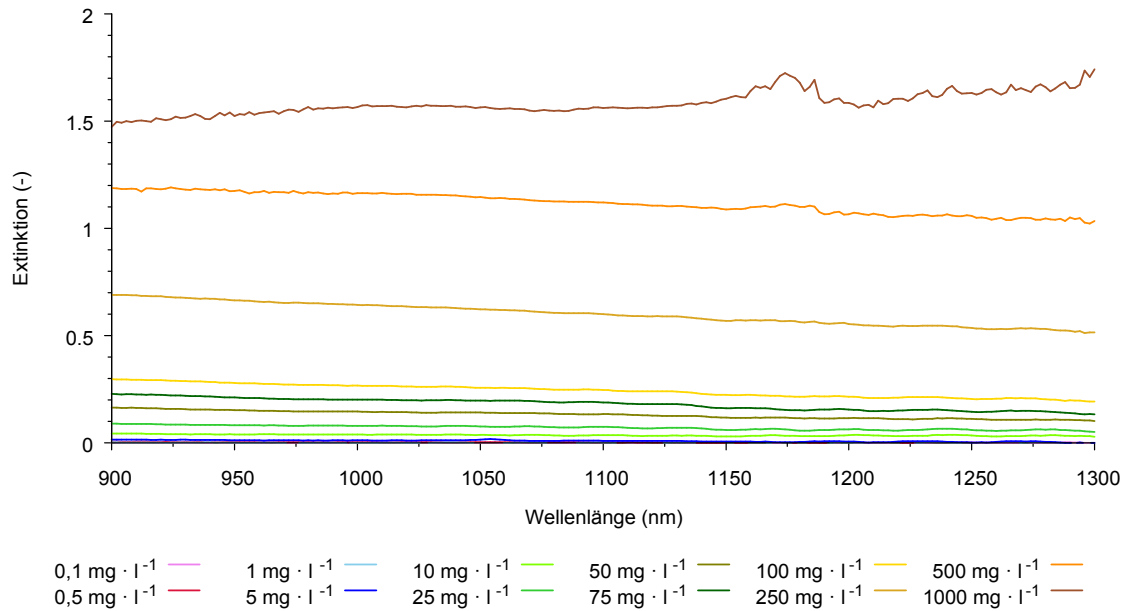


Abbildung 5.43: NIR-Extinktionsspektren verschieden konzentrierter PHB-Suspensionen in H₂O. Die Messungen erfolgten in geschlossenen Reaktoren bei Verwendung rechtsdrehend zirkularer Messstrahlung.

Erkennbar zeigen sich prinzipiell die gleichen Eigenschaften wie bereits für die vorherige Abbildung beschrieben. Auffällig ist, dass der bei 1185 nm auftretende Extinktionspeak jedoch weniger stark ausgeprägt ist als bei jenen Spektren, welche mittels unpolarisierter bzw. linksdrehend polarisierter Messstrahlung aufgenommen wurden.

Anhand der unter polarisierten Strahlungsbedingungen aufgenommenen Extinktionsspektren wurden Circular dichroismen über den Messbereich von 900 bis 1300 nm berechnet. Hierzu wurden die rechtsdrehenden von den linksdrehenden Spektraldaten subtrahiert und die Extinktionsdifferenzen ausgewertet. Die so erhaltenen CD-Spektren sind in Abbildung 5.44 gezeigt.

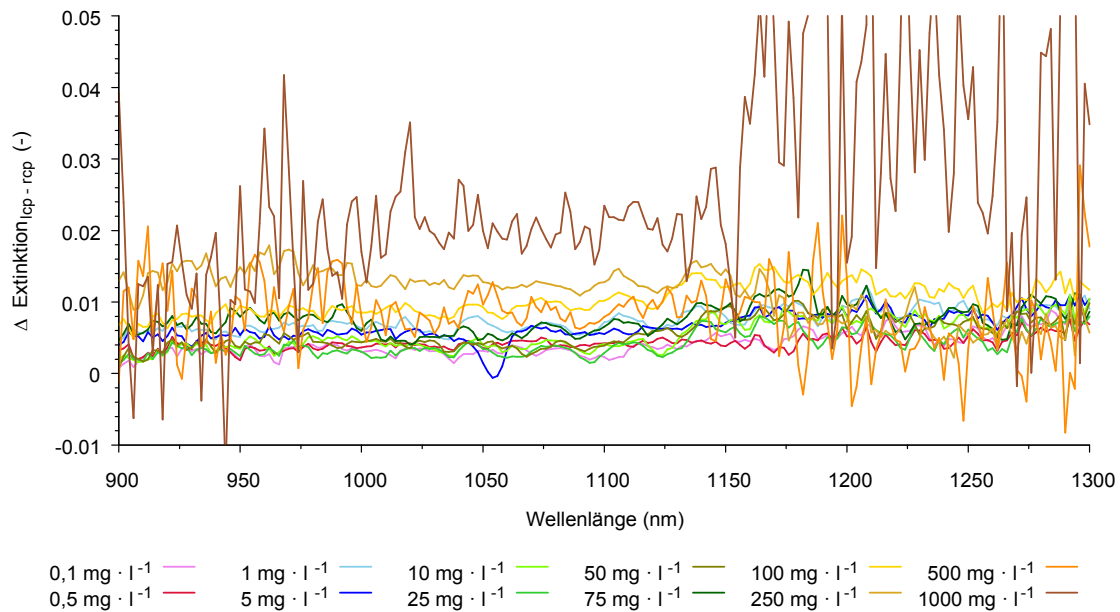


Abbildung 5.44: Berechnete NIR-Circulardichroismen verschieden konzentrierter PHB-Suspensionen in H_2O . Die Messungen erfolgten in geschlossenen Reaktoren bei Verwendung links- (lcp) sowie rechtsdrehend (rcp) zirkular polarisierter Messstrahlung. Die gezeigten Spektren sind Differenzspektren der linksdrehenden minus der rechtsdrehenden Extinktionswerte im Bereich von 900 bis 1300 nm.

Wie zu erkennen, weisen alle Spektren ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis auf, wobei vor allem die geringe absolute Intensität der Daten auffällt. Im Vergleich zu den gemessenen Extinktionsspektren sind die CD-Daten um den Faktor hundert verringert. Es zeigt sich zudem, dass alle Spektren (mit geringen Ausnahmen für die 2 höchsten Konzentrationsstufen) im positiven Wertebereich liegen, die Absorption linksdrehender Messstrahlung dementsprechend stets höher ist, als die von rechtsdrehend zirkular polarisierter. In den Daten lässt sich eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit der Messsignale ablesen, wobei die Konzentrationsstufen 1 und $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ oberhalb der höher konzentrierten Stufen im zweistelligen Konzentrationsbereich liegen. Die größten Signalintensitäten sind für alle Spektren in den Bereichen von 1150 bis 1200 Nanometern, sowie (in geringerer Ausprägung) im Bereich um 950 bis 1000 nm angesiedelt. Von den übrigen Kurven stark abweichend präsentiert sich die Konzentrationsstufe $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ im Bereich von 1050 bis 1060 nm.

5.2.6.3 Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten

Analog zu den vorherigen Kapiteln werden im Folgenden zunächst Rohspektren gezeigt, gefolgt von den erstellten Regressionsmodellen. Die im nah-infraroten Spektral-

bereich mit Hilfe polarisierter Messstrahlung gemessenen Rohspektren sind anhand von je drei Beispielen in Abbildung 5.45 sowie Abbildung 5.46 dargestellt.

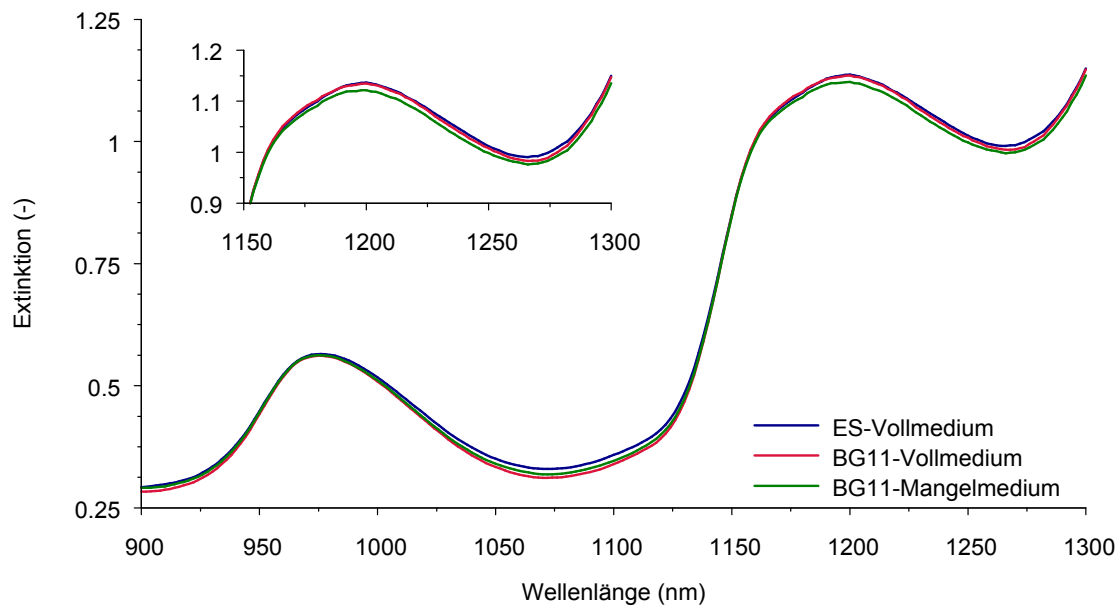


Abbildung 5.45: NIR-Extinktionsspektren verschiedener Kulturen von *N. muscorum*, aufgenommen nach einer Kulturdauer von 3 Wochen mittels linksdrehend zirkular polarisierter Strahlung. Die gezeigten Spektren stammen von Proben mit einem PHB-Anteil von 10,34 (ES-Vollmedium), 7,68 (BG11-Vollmedium) sowie 16,19 (BG11-Mangelmedium) Gewichtsprozent bezogen auf die jeweilige Probentrockenmasse.

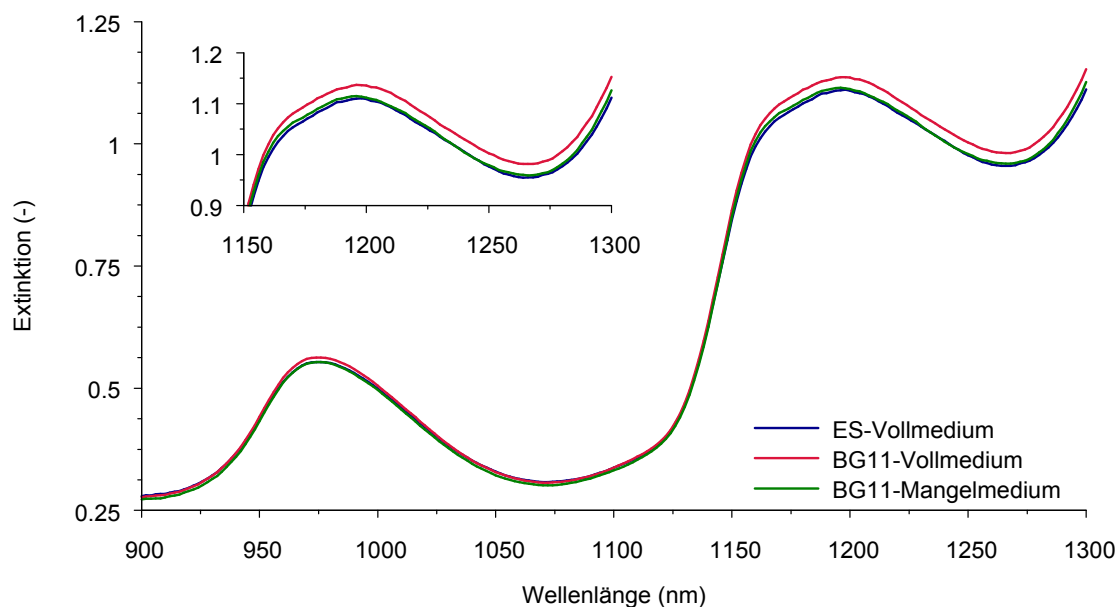


Abbildung 5.46: NIR-Extinktionsspektren verschiedener Kulturen von *N. muscorum*, aufgenommen nach einer Kulturdauer von 3 Wochen mittels rechtsdrehend zirkular polarisierter Strahlung. Die gezeigten Spektren stammen von Proben mit einem PHB-Anteil von 10,34 (ES-Vollmedium), 7,68 (BG11-Vollmedium) sowie 16,19 (BG11-Mangelmedium) Gewichtsprozent bezogen auf die jeweilige Probentrockenmasse.

In beiden Darstellungen sind jeweils die charakteristischen Extinktionsmuster von Wasser zu erkennen, die sich durch Absorptionsmaxima im Bereich von 950 bis 100, sowie von 1150 bis 1200 Nanometern manifestieren. Auffällig ist die starke visuelle Ähnlichkeit aller Spektren, unabhängig sowohl von der verwendeten Polarisation als auch vom physiologischen Zustand der vermessenen Proben. Auch in den vergrößert dargestellten Bereichen von 1150 bis 1250 nm sind keine distinkten Extinktionsmuster erkennbar.

Nach Berechnung der Differenzspektren, welche in Abbildung 5.47 dargestellt sind, lassen sich hingegen vorhandene Unterschiede in der Extinktion von links- und rechtsdrehend polarisierter Strahlung erkennen.

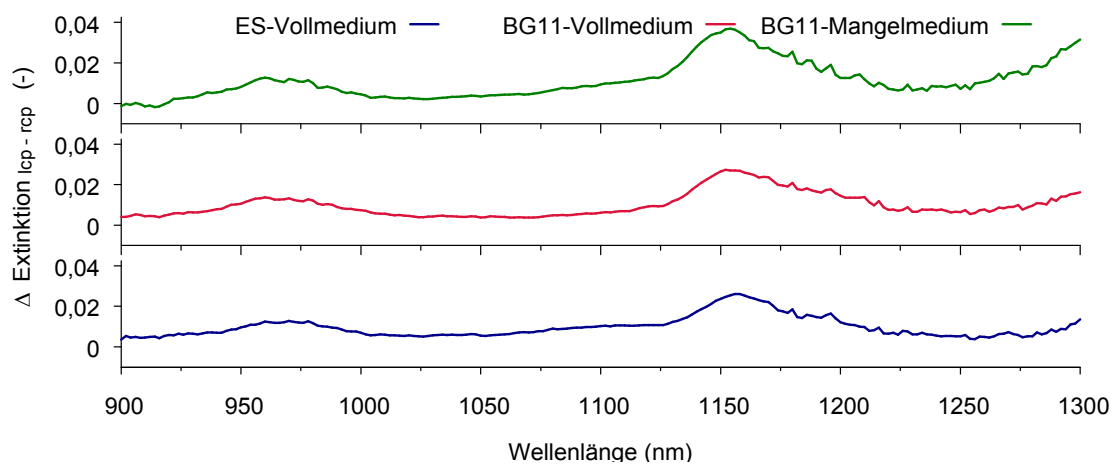


Abbildung 5.47: Berechnete NIR-Circulardichroismen verschiedener Kulturen von *N. muscorum*, aufgenommen nach einer Kulturdauer von 3 Wochen. Die Messungen erfolgten in geschlossenen Reaktoren bei Verwendung links- (lcp) sowie rechtsdrehend (rcp) zirkular polarisierter Messstrahlung. Die gezeigten Spektren sind Differenzspektren der linksdrehenden minus der rechtsdrehenden Extinktionswerte. Die gezeigten Spektren stammen von Proben mit einem PHB-Anteil von 10,34 (ES-Vollmedium), 7,68 (BG11-Vollmedium) sowie 16,19 (BG11-Mangelmedium) Gewichtsprozent bezogen auf die jeweilige Probentrockenmasse.

Die NIR-CD-Spektren von Kulturen, welche ohne Mangelbedingungen angezogen wurden sind in ihrem Verlauf sehr ähnlich, einzig im Bereich von 1050 bis 1130 nm sind höhere Intensitäten bei der ES-Variante zu erkennen. Unter Mangelbedingungen sind im Bereich von ca. 950 nm leicht höhere Intensitäten zu erkennen und auch im Bereich von 1000 bis 1150 nm steigt die relative Intensität zum langwelligen Bereich stärker an als in den zwei anderen Spektren. In allen Spektren ist zudem ein erhöhtes Rauschen ab einer Wellenlänge von ca. 1170 nm zu erkennen, welches sich bis zum langwelligen Ende der Spektren erstreckt.

Mit den aufgenommenen Spektraldaten wurden nachfolgend Regressionsmodelle erstellt, was sowohl anhand der Rohdaten, als auch nach Anwendung verschiedener, im Material-und-Methoden-Teil dieser Arbeit aufgeführter Vorbehandlungen geschah. Die folgende Abbildung 5.48 zeigt die Ergebnisse der anhand mittels polarisiertem sichtbaren Licht gemessenen und berechneten Rohspektren durchgeführten PLS-Regressionen des 4. Versuchsdurchlaufs

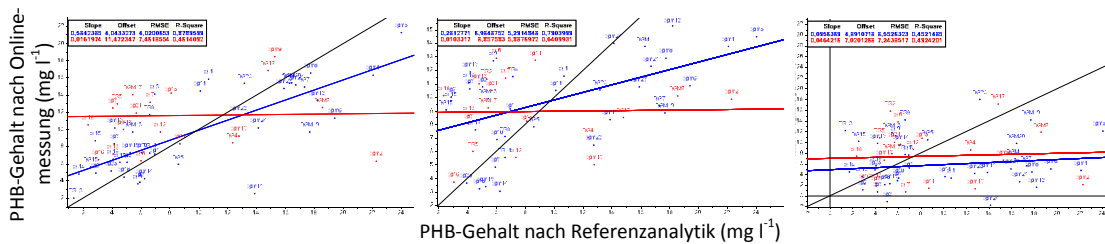


Abbildung 5.48: Übersicht der PLS-Regressionsergebnisse des 4. Versuchsdurchlaufs bei Verwendung der polarisierten NIR-Rohspektren als Vorhersagewerte. Links: linksdrehend zirkular polarisiertes Messlicht; Mitte: rechtsdrehende Polarisation; Rechts: berechnete CD-Spektren als Datengrundlage. Gezeigt ist jeweils die Gegenüberstellung der per Referenzanalytik ermittelten PHB-Gehalte (Abszisse) mit den Vorhersagewerten des Regressionsmodells (Ordinate). Die PLS wurden mit 7 Faktoren ohne Zentrierung berechnet. Die Kalibrierdatensätze (blau) umfassten jeweils 40, 40 bzw. 40 Proben, die Validierdatensätze (rot) umfassten 20, 19 bzw. 19 Proben. In schwarz eingezeichnet ist die Winkelhalbierende, in blau die Regressionsfunktion der Kalibrierdaten, in rot jene der Validierdaten. Die Proben wurden in ES-Vollmedium („ES“), BG11-Vollmedium („BG11“) und BG11-Mangelmedium („BGM“) kultiviert.

Auffallend ist in jenen Regressionsmodellen, welche anhand von Spektren berechnet wurden die mittels links- sowie rechtsdrehend polarisierter NIR-Strahlung aufgenommen wurden, dass die Kalibrierdaten relativ gut approximiert werden während die Validierdaten schlecht vorhergesagt werden. Die in rot eingezeichneten Regressionsgeraden der Validierdaten in beiden Modellen zeigt einen quasi waagerechten Verlauf, wobei keine systematische Fehler sichtbar sind, sondern alle Proben des Validierdatensatzes schlecht approximiert werden. Bei Betrachtung des CD-Spektren-Modells ist ein ähnliches Verhalten zu beobachten, jedoch wird hier zusätzlich auch der Kalibrierdatensatz schlecht wiedergegeben.

Der Einfluss der einzelnen Wellenlängen auf die Regressionsmodelle ist der Übersichtlichkeit halber in der folgenden Abbildung 5.49 für alle drei Modelle zusammengefasst.

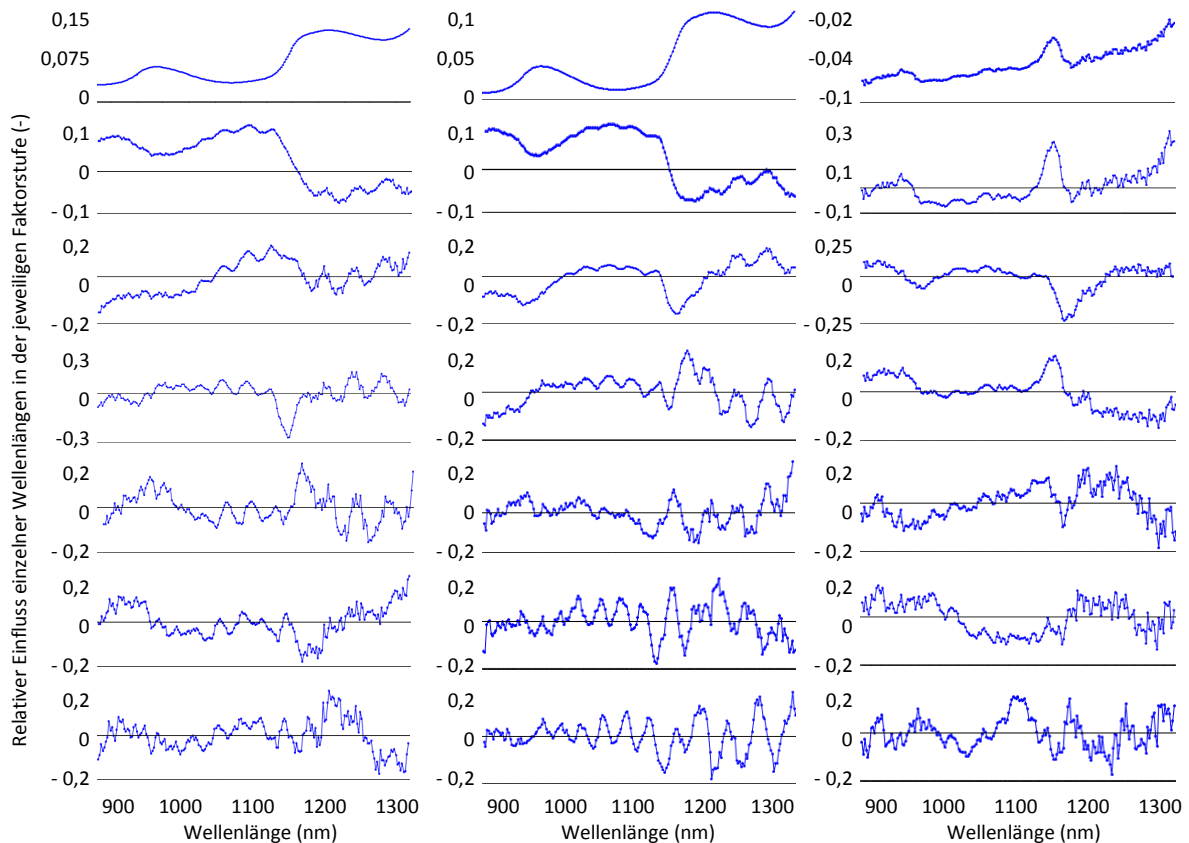


Abbildung 5.49: Relativer Einfluss der NIR-Spektraldaten auf die Vorhersagemodelle. Links: Linksdrehend zirkular polarisierte Messstrahlung; Mitte: Rechtsdrehende Polarisation; Rechts: berechnete CD-Spektren als Datengrundlage. Gezeigt sind die Faktorstufen 1 - 7 der PLS-Modelle (jeweils von oben nach unten), wobei größere Werte einen größeren relativen Einfluss bedeuten.

Bei Betrachtung der relativen Wellenlängeneinflüsse zeigt sich ein nahezu identisches Bild, wie es auch im unpolarisierten NIR-Bereich gefunden wurde (vgl. Abbildung 5.28), dies sowohl bei links- als auch bei rechtsdrehend zirkular polarisierter Messstrahlung. Der erste Faktor ist von Einflüssen bei 950, sowie von 1150 bis 1200 nm dominiert. Im zweiten Faktor, welcher vertikal zum Ersten gespiegelt erscheint, zeigt sich ebenso ein Einfluss des gesamten Spektrums, wobei bei 1150 nm die positive Faktorladung in eine negative übergeht. Der dritte Faktor bei linksdrehender Polarisationsrichtung weist eine Bande bei ca. 1100 nm auf, während die gleiche Faktorstufe bei rechtsdrehender Polarisation einen klaren Einflusssschwerpunkt bei 1145 nm zeigt. Diese Beobachtung lässt sich analog bei linksdrehender Strahlung in der vierten Faktorstufe machen. Alle weiteren Stufen zeigen lediglich Wellenlängeneinflüsse, welche um die Nullachse schwanken, wobei jeweils verstärkte Einflüsse bei 1145 nm erahnbar sind.

Bei Betrachtung des auf CD-Spektren basierenden Regressionsmodells zeigt sich direkt in der ersten Faktorstufe ein starker Einfluss bei 1146 nm. Dies manifestiert sich auch

in höheren Faktorstufen, wobei die entscheidenden Wellenlängen zwischen 1146 und 1156 Nanometern schwanken. Ab der fünften Faktorstufe ist zudem ein stark verstärktes Rauschen zu beobachten.

5.2.6.4 Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im polarisierten NIR-Bereich

Analog zu den vorangegangenen Kapiteln soll im Folgenden ein Überblick über mehrere Versuchswiederholungen gegeben werden. Hierfür sind in Tabelle 5.10, Tabelle 5.11 und Tabelle 5.12 die gesammelten Ergebnisse der für den sichtbaren Spektralbereich bei polarisierter Messstrahlung erstellten Regressionsmodelle aufgeführt.

Tabelle 5.10: Vergleich der NIR-Regressionsmodelle, welche auf linksdrehend zirkular polarisiert gemessenen Spektraldaten beruhen

Versuchsreihe	PHB-Gehalte ^a (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^c (%)	RMSEP ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEP ^c (%)	R ² Kalibrierung	R ² Validierung	Modellfaktoren
1 (Küvette)	3,375 - 31,719	3,2053	11,31	4,4150	15,58	0,941	0,877	7
2 (Reaktor, vertikal)	7,804 - 87,379	10,5933	13,31	10,4742	13,16	0,868	0,858	3
4 (Reaktor, vertikal)	0,678 - 24,042	4,0201	17,21	7,4619	31,94	0,879	0,461	7

Anzahl Kalibrier-/Validierproben: 59/39, 48/32, 40/20 (jeweils für Versuchsreihe 1, 2, 4)

Tabelle 5.11: Vergleich der NIR-Regressionsmodelle, welche auf rechtsdrehend zirkular polarisiert gemessenen Spektraldaten beruhen

Versuchsreihe	PHB-Gehalte ^a (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^c (%)	RMSEP ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEP ^c (%)	R ² Kalibrierung	R ² Validierung	Modellfaktoren
1 (Küvette)	3,375 - 31,719	4,8146	16,99	4,7739	16,84	0,867	0,856	3
2 (Reaktor, vertikal)	7,804 - 87,379	6,2242	7,82	9,2565	11,63	0,955	0,889	7
4 (Reaktor, vertikal)	0,678 - 24,042	5,5936	23,94	5,1817	22,18	0,766	0,722	3

Anzahl Kalibrier-/Validierproben: 59/39, 48/32, 40/19 (jeweils für Versuchsreihe 1, 2, 4)

Tabelle 5.12: Vergleich der NIR-Regressionsmodelle, die auf den CD-Spektren beruhen, welche aus links- und rechtsdrehend zirkular polarisiert gemessenen Spektraldaten berechnet wurden

Versuchsreihe	PHB-Gehalte ^a (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^c (%)	RMSEP ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEP ^c (%)	R ² Kalibrierung	R ² Validierung	Modellfaktoren
1 (Küvette)	3,375 - 31,719	4,9666	17,52	6,6552	23,48	0,858	0,720	7
2 (Reaktor, vertikal)	7,804 - 87,379	6,7454	8,48	13,5108	16,98	0,947	0,764	7
4 (Reaktor, vertikal)	0,678 - 24,042	8,5526	36,61	7,2439	31,00	0,452	0,492	4

Anzahl Kalibrier-/Validierproben: 59/39, 48/32, 40/19 (jeweils für Versuchsreihe 1, 2, 4)

^a Aufgeführt sind minimale und maximale PHB-Gehalte der Probengesamtheit jeder Versuchsreihe

^b Die aufgeführten absoluten RMSECs und RMSEPs sind jene der Rohdaten-basierten Modelle

^c Die prozentualen Werte sind berechnet anhand der absoluten RMSECs und RMSEPs bezogen auf die absoluten PHB-Gehaltsspannen

In den Rohspektren-Modellen fällt auf, dass (analog zu den anhand von polarisiert gemessenen Spektren erstellten Modellen im sichtbaren Spektralbereich; vgl. Tabelle 5.7 bis Tabelle 5.9) die spektralen Messungen in Küvetten stets die geringsten absoluten Vorhersagefehler liefern. Die Bestimmtheitsmaße der Validierungen sind in allen Versuchsreihen annähernd vergleichbar, einzig die vierte Versuchsreihe zeigte hierbei verringerte Werte. Als Modellumfang ist kein konsistentes Optimum ersichtlich, die Schwankungen reichen hier von 3 bis 7 Faktoren.

Auch für die polarisiert gemessenen NIR-Spektren wurden Modelle erstellt, nachdem die Rohdaten verschiedenen Vorbehandlungsmethoden unterworfen wurden. Diese Modellstatistiken sind zusammengefasst in Abbildung 5.50, Abbildung 5.51 und Abbildung 5.52 dargestellt.

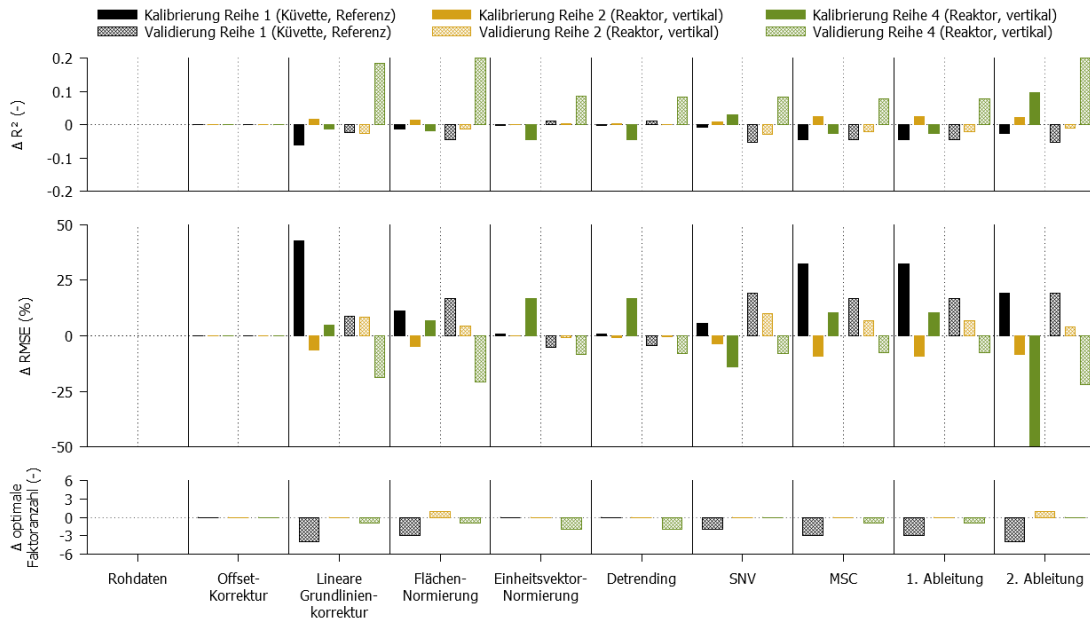


Abbildung 5.50: Übersicht aller für den linksdrehend zirkular polarisierten NIR-Bereich erstellten Regressionsmodelle bei Anwendung verschiedener Vorbehandlungen der spektralen Rohdaten. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse der Rohdaten-Regressionen als auf null gezogene Referenzen (für die erreichten Modellparameter siehe oben Tabelle 5.10 bis Tabelle 5.12) sowie die (prozentualen oder absoluten) Differenzen der Modellparameter bei Nutzung der vorbehandelten Spektraldaten.

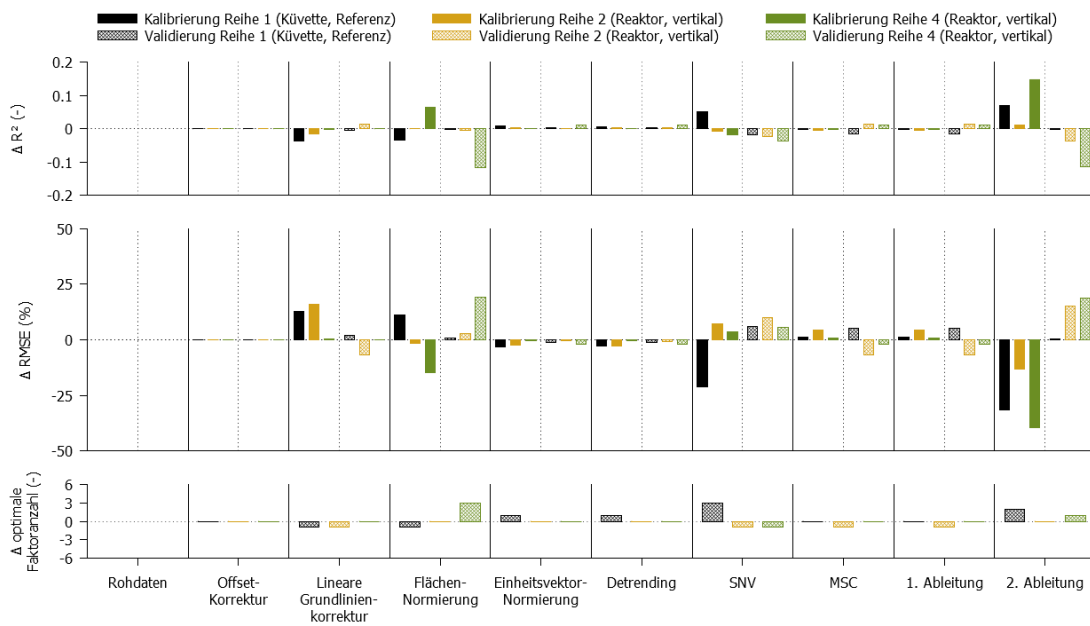


Abbildung 5.51: Übersicht aller für den rechtsdrehend zirkular polarisierten NIR-Bereich erstellten Regressionsmodelle bei Anwendung verschiedener Vorbehandlungen der spektralen Rohdaten. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse der Rohdaten-Regressionen als auf null gezogene Referenzen sowie die (prozentualen oder absoluten) Differenzen der Modellparameter bei Nutzung der vorbehandelten Spektraldaten.

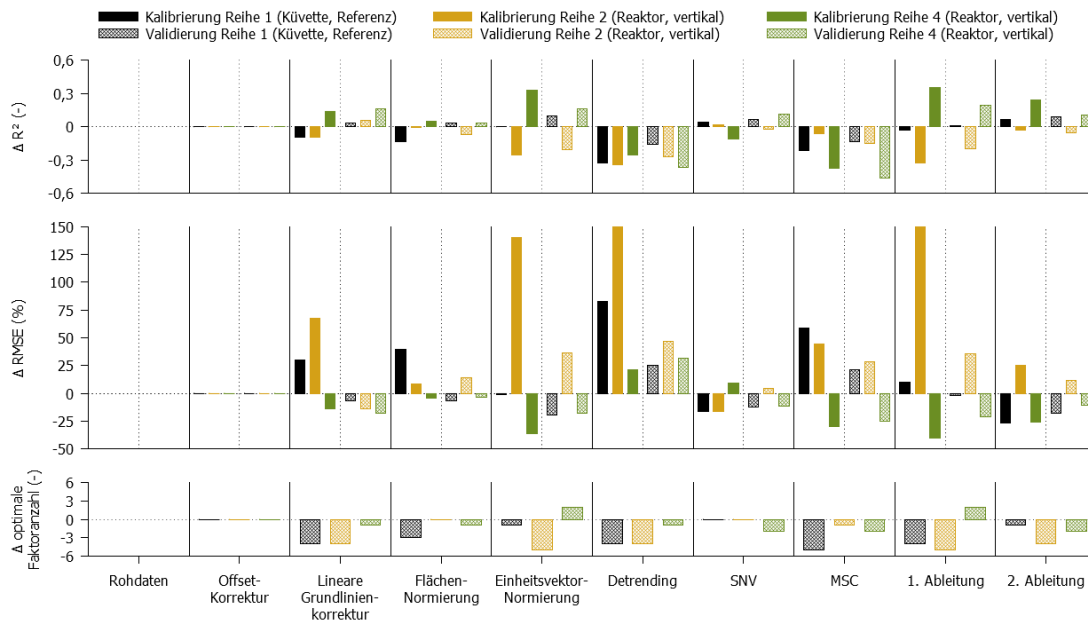


Abbildung 5.52: Übersicht aller anhand von NIR-CD-Spektren erstellten Regressionsmodelle bei Anwendung verschiedener Vorbehandlungen der spektralen Rohdaten. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse der Rohdaten-Regressionen als auf null gezogene Referenzen sowie die (prozentualen oder absoluten) Differenzen der Modellparameter bei Nutzung der vorbehandelten Spektraldaten.

Wie bereits für den sichtbaren Spektralbereich zeigt sich auch bei Anwendung der Vorbehandlungen auf die polarisierten NIR-Daten ein sehr uneinheitliches Bild bezogen auf die Effekte der jeweiligen Methoden. So zeigen lediglich Modelle, welche anhand von Ableitungsspektren zweiter Ordnung berechnet wurden relativ konsistente Verringerungen der Modellfehler bei gleichzeitig leicht erhöhten Bestimmtheitsmaßen der Regression. Auch der Umfang der optimalen Modellfaktoren variiert zwischen den einzelnen Versuchsreihen. Anzumerken ist, dass die auf CD-Spektren basierten Modelle generell ein chaotisches Verhalten zeigen und generell eher eine Vergrößerung der Vorhersagefehler durch die Anwendung der Vorbehandlungen aufweisen.

5.2.7 Konfokale Raman-Mikrospektroskopie

Um zunächst Referenz-Raman-Spektren von reinem PHB zu erhalten, wurden Messungen an einem konfokalen Mikroskop durchgeführt. Das so gemessene Raman-Spektrum von pulverförmigem PHB ist in Abbildung 5.53 dargestellt.

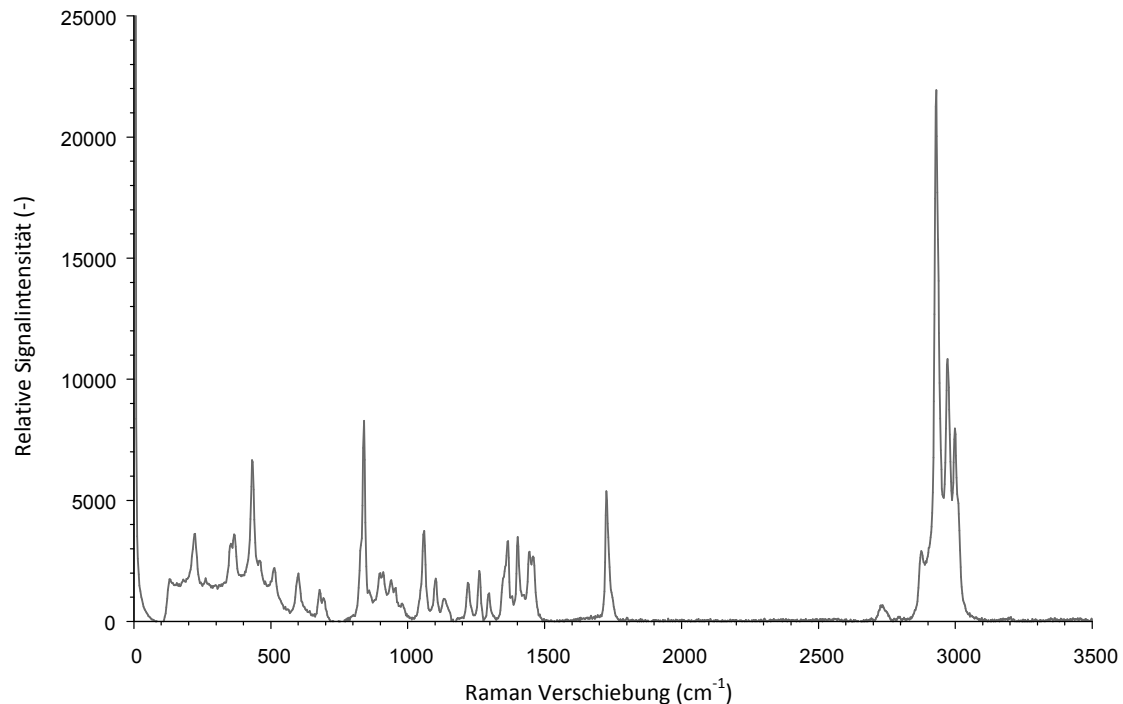


Abbildung 5.53: Mittels konfokalem Mikroskop aufgenommenes, grundlinienkorrigiertes Raman-Spektrum von pulverförmigem PHB bei 532 nm Anregungswellenlänge. Die Strahlintensität beträgt ca. 37 mW bei einer Integrationsdauer von 0,5 Sekunden.

Das gemessene Spektrum zeigt ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis und im Bereich von 100 bis 1800 Wellenzahlen $\cdot \text{cm}^{-1}$ zeigen sich fein aufgelöste Raman-Peaks. Ein zweites Peakfenster ist im Bereich von 2700 bis 3100 Wellenzahlen $\cdot \text{cm}^{-1}$ erkennbar, während im Bereich geringer Verschiebungen (nahe des Koordinatenursprungs) der Rayleigh-Peak des Anregungslasers erahnbar ist.

5.2.8 VIS-Raman-Spektroskopie

Prinzipiell gibt das Raman-Spektrum einer Verbindung über einen Großteil ihres chemischen Aufbaus eine Auskunft. So sind die auftretenden Raman-Peaks lediglich von der Polarisierbarkeit einzelner Molekülbindungen, der so genannten Raman-Aktivität, abhängig. Obwohl die Anregungswellenlänge für den Raman-Effekt prinzipiell irrelevant ist, gibt es neben der wellenlängenabhängigen Signalintensität der auftretenden Banden mögliche Resonanzeffekte, die zu einer Verstärkung der Raman-Signale um mehrere Größenordnungen führen können. Dies tritt vor allem dann auf, wenn die zur Anregung gewählte Wellenlänge der Lichtquelle nahe an einer Absorptionsbande der zu untersuchenden Substanz liegt.

Somit galt es zunächst, eine geeignete Anregungswellenlänge für die Versuchsdurchführung zu finden. Hierfür wurden leere Reaktorgefäße sowie eine *Nostoc*-Beispielkultur in Glasküvetten vermessen. Die Ergebnisse der Messungen an leeren Reaktorschalen sind in Abbildung 5.54 dargestellt:

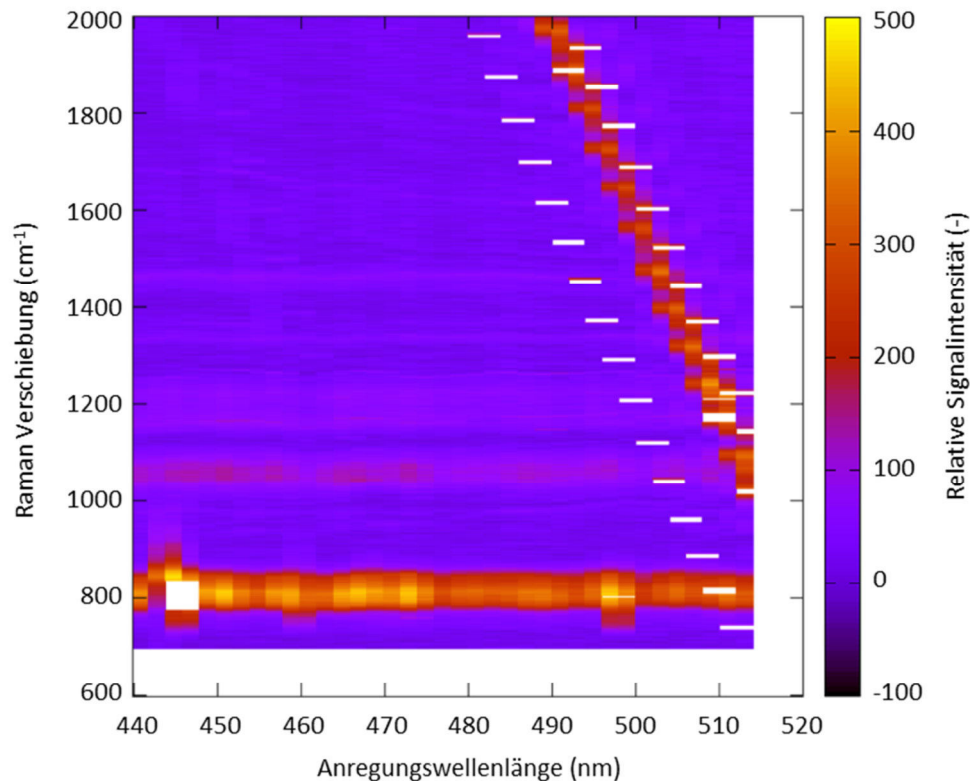


Abbildung 5.54: Raman-Resonanzkarte eines leeren Reaktorgefäßes. Die Grafik zeigt Daten für einen Anregungsbereich von 440 bis 514 nm, die Anregungsaufösung betrug 2 nm pro Messschritt. Die Farbskala am rechten Bildrand gibt dabei Aufschluss über die wellenlängenabhängige Intensität des Messsignals. Der nicht aufgeführte Nullwert der Verschiebungsskala entspricht jeweils der Wellenlänge des Anregungslasers. Bei 488 nm Anregungswellenlänge resultiert eine Verschiebung von 700 cm^{-1} in einer Absolutwellenlänge von 505 nm, 2000 cm^{-1} Verschiebung entsprechen 541 nm.

Wie zu erkennen, zeigen die Reaktorschalen aus Polypropylen eine starke Raman-Bande im Verschiebungsbereich von 810 cm^{-1} . Bei circa 1050 sowie 1180 cm^{-1} sind zudem schwache Raman-Signale erkennbar, deren Intensitäten mit zunehmender Anregungswellenlänge augenscheinlich schwächer werden. Weitere mögliche Banden bei 1300 - 1350 sowie 1450 cm^{-1} sind lediglich zu erahnen und erscheinen nicht als klare Signale.

Die Ergebnisse der *Nostoc*-Messungen, anhand derer die Wellenlängenauswahl stattgefunden, sind in Abbildung 5.55 und Abbildung 5.56 dargestellt.

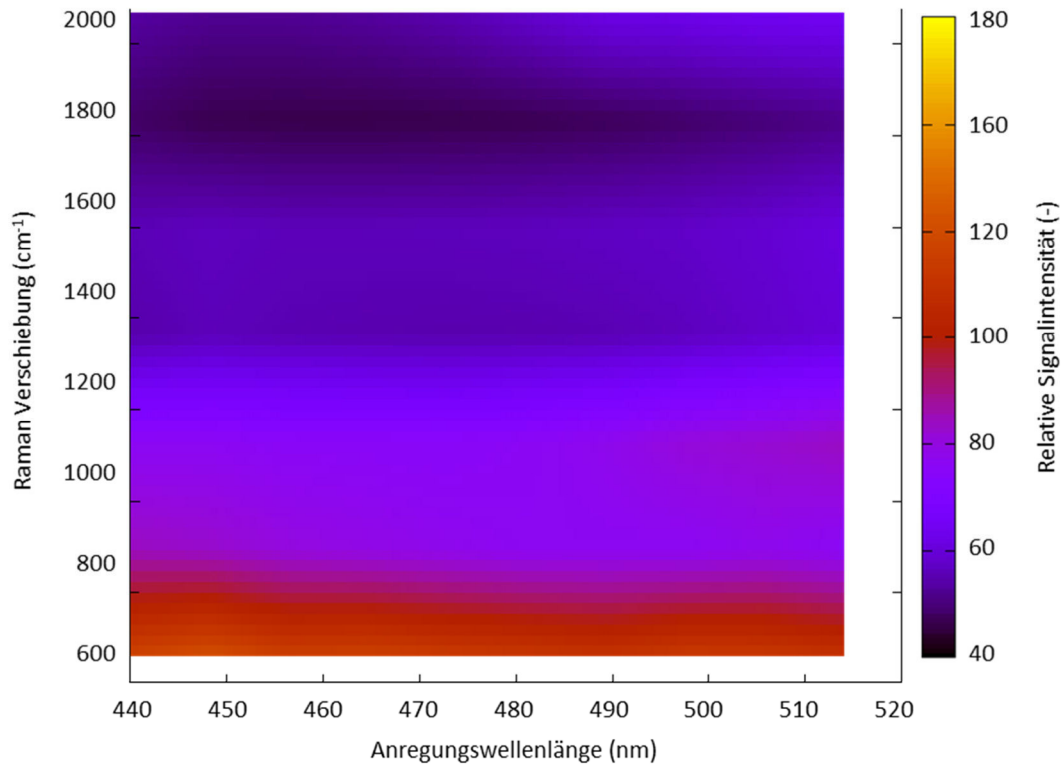


Abbildung 5.55: Raman-Resonanzkarte einer Probe von *Nostoc muscorum*. Die Grafik zeigt Daten für einen Anregungsbereich von 440 bis 514 nm, die Anregungsaufösung betrug 2 nm pro Messschritt. Die Farbskala am rechten Bildrand gibt dabei Aufschluss über die wellenlängenabhängige Intensität des Messsignals. Der nicht aufgeführte Nullwert der Verschiebungsskala entspricht jeweils der Wellenlänge des Anregungslasers. Bei 488 nm Anregungswellenlänge resultiert eine Verschiebung von 700 cm^{-1} in einer Absolutwellenlänge von 505 nm, 2000 cm^{-1} Verschiebung entsprechen 541 nm.

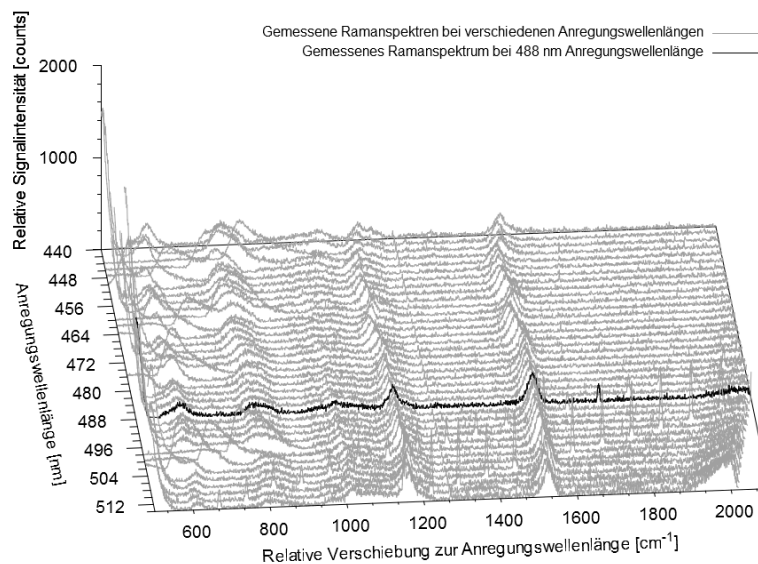


Abbildung 5.56: Raman-Spektren einer Probe von *Nostoc muscorum* aufgenommen bei verschiedenen Anregungswellenlängen. In schwarz hervorgehoben ist die für alle nachfolgenden Versuche ausgewählte Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Darstellung ist inhaltlich äquivalent mit der vorherigen Abbildung 5.55 und dient nur der detaillierteren Visualisierung im Hinblick auf unten folgende Beschreibungen der Spektraldaten. Bei 488 nm Anregungswellenlänge resultiert eine Verschiebung von 700 cm^{-1} in einer Absolutwellenlänge von 505 nm, 2000 cm^{-1} Verschiebung entsprechen 541 nm.

Wie zu erkennen, gibt es verschiedene Eigenschaften der Spektraldaten:

- Banden im Bereich geringer Wellenzahlenverschiebungen relativ zur Anregungswellenlänge
- Eine in allen Spektren vorhandenen „Spitze“ bei circa 1255 cm^{-1}
- Einen Peak, welcher bei Anregungswellenlängen ab circa 480 nm auftaucht, und der sich bei langwelligerer Anregung an die Laser-Wellenlänge annähert
- Eine Bande im Bereich von circa 1020 cm^{-1} , welcher bei Anregungen oberhalb von 480 nm vorhanden ist
- Zwei konsistente Raman-Banden in den Bereichen 1150 und 1550 cm^{-1} , welche in allen Spektren mehr oder minder stark ausgeprägt sind

Wie zu erkennen, weisen alle Spektren keine ausgeprägten Raman-Peaks auf. Lediglich die bereits erwähnten Banden bei 1150 und 1550 cm^{-1} sind als konsistente Raman-Signale sichtbar. Zudem sind in allen Spektren in Bereichen geringer Wellenzahlenverschiebungen inkonsistente Banden erkennbar, sowie ein starker Anstieg des Messsignals im Bereich unter 600 Wellenzahlen.

Da im Spektrum, welches bei 488 nm aufgenommen wurde die geringsten Störeinflüsse zu erkennen sind, wurde diese Anregungswellenlänge für alle weiteren Versuche ausgewählt.

Um Grundlinien und Fluoreszenzsignale aus den gemessenen Spektren zu entfernen, wurde die von Koch *et al.* (2017a) beschriebene iterative Grundlinienkorrektur verwendet. Abbildung 5.57 zeigt den Effekt dieser Vorbehandlungsmethode. Alle im Weiteren gezeigten und für die Regressionsmodelle verwendeten Spektren sind derart prozessiert.

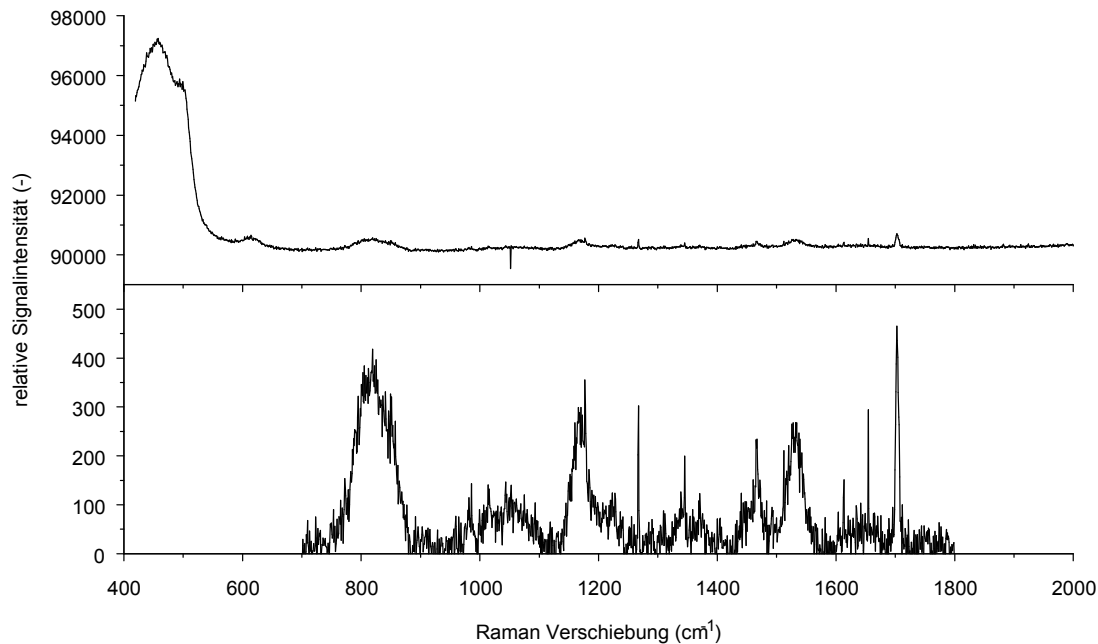


Abbildung 5.57: Gestapelte Raman-Spektren einer Probe von *Nostoc muscorum*, gemessen im geschlossenen Reaktorsystem bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Oben: Gemessenes Rohspektrum. Unten: Mittels Grundlinienkorrektur prozessiertes Spektrum, welches auf einen verwertbaren Messbereich von 700 bis 1800 cm^{-1} zugeschnitten wurde. Der nicht aufgeführte Nullwert der Verschiebungsskala entspricht jeweils der Wellenlänge des Anregungslasers. Bei 488 nm Anregungswellenlänge resultiert eine Verschiebung von 700 cm^{-1} in einer Absolutwellenlänge von 505 nm, 1800 cm^{-1} Verschiebung entsprechen 535 nm.

Wie zu erkennen, liegen die Rohspektren in einem Intensitätsbereich von 90000 bis ca. 97000 counts und es sind keine distinkten Raman-Peaks erkennbar, während im geringen Verschiebungsbereich bis 600 cm^{-1} sehr hohe Messwerte sichtbar sind. Infolge der Prozessierung sind die Grundliniensignale entfernt und das gesamte Spektrum „auf null gezogen“, sodass die tatsächlich relevanten Informationen besser erkennbar werden. Auffällig sind breite Banden bei ca. 810, 1180 und 1520 cm^{-1} . Zusätzlich sind einzelne Spitzen erkennbar (z.B. jene bei ca. 1280 cm^{-1}), während jedoch ein sehr hoher Rauschanteil in den Spektren sichtbar ist und die Signalintensitäten insgesamt relativ gering sind. Es sei zudem auf den bei ca. 1705 cm^{-1} auftretenden Peak hingewiesen, welcher in allen aufgenommenen Spektren auftaucht.

5.2.8.1 PHB-Referenzspektren für den VIS-Raman-Bereich

Unter Wahl der in obigen Versuchen ermittelten optimalen Anregungswellenlänge wurden Referenzspektren von in H_2O suspendiertem PHB in verschiedenen Konzentra-

tionsstufen am fasergestützten Messsystem aufgenommen, welche in Abbildung 5.58 dargestellt sind.

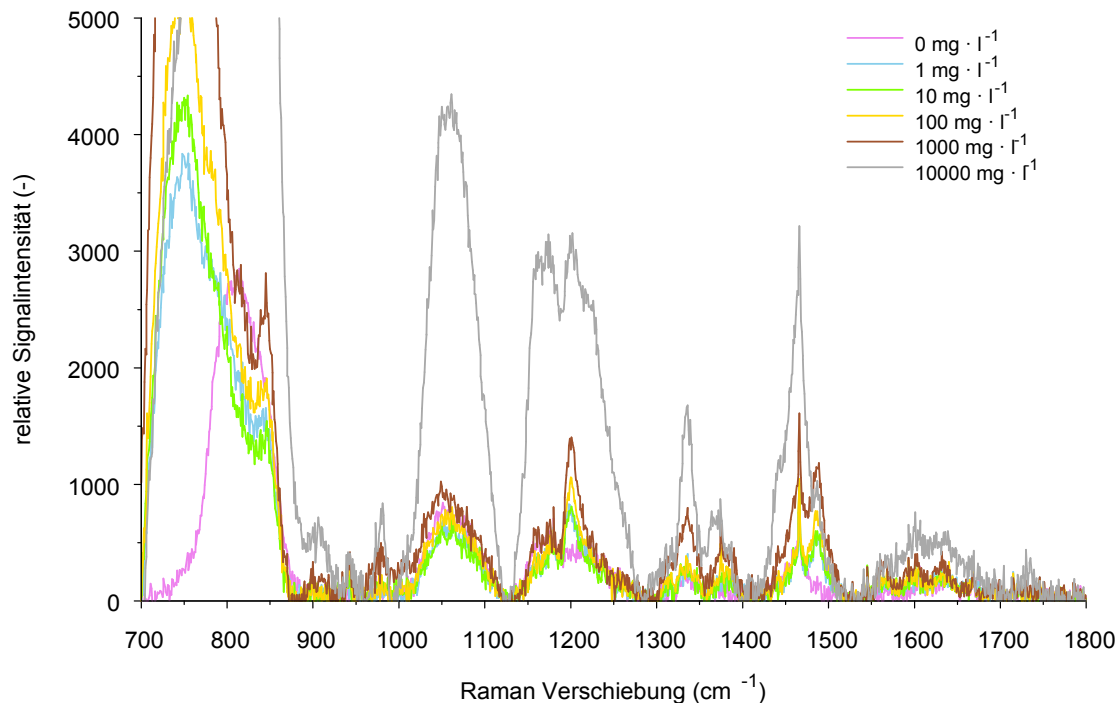


Abbildung 5.58: Raman-Spektren verschieden konzentrierter PHB-Suspensionen in H₂O. Die Messungen erfolgten in geschlossenen Reaktoren bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer über wiederholte Lichtpulse summierte Gesamtlaserintensität von 2 J. Bei 488 nm Anregungswellenlänge resultiert eine Verschiebung von 700 cm⁻¹ in einer Absolutwellenlänge von 505 nm, 1800 cm⁻¹ Verschiebung entsprechen 535 nm.

Die im Faser-Aufbau gemessenen Raman-Spektren zeigen sehr hohe Signale im Bereich geringer Raman-Verschiebungen bis 900 Wellenzahlen · cm⁻¹ und bei der höchsten PHB-Konzentration zusätzlich bei 1000 bis 1300 cm⁻¹. Alle übrigen Konzentrationsstufen zeigen zudem unter den erkennbaren Peaks teilweise starke Banden in den Grundlinien. Generell fällt auf, dass alle Peaks wesentlich unschärfer sind als jene, welche in den konfokal aufgenommen Raman-Spektren (Abbildung 5.53) erscheinen. Zur Verbesserung der Spektrenqualität wurde nachfolgend von allen Konzentrationsstufen ein Blindwert abgezogen, welcher aus im geschlossenen Reaktor vermessenem Wasser bestand. Die derart um mögliche Raman-Signale der Reaktoren bereinigten PHB-Spektren sind in Abbildung 5.59 gezeigt.

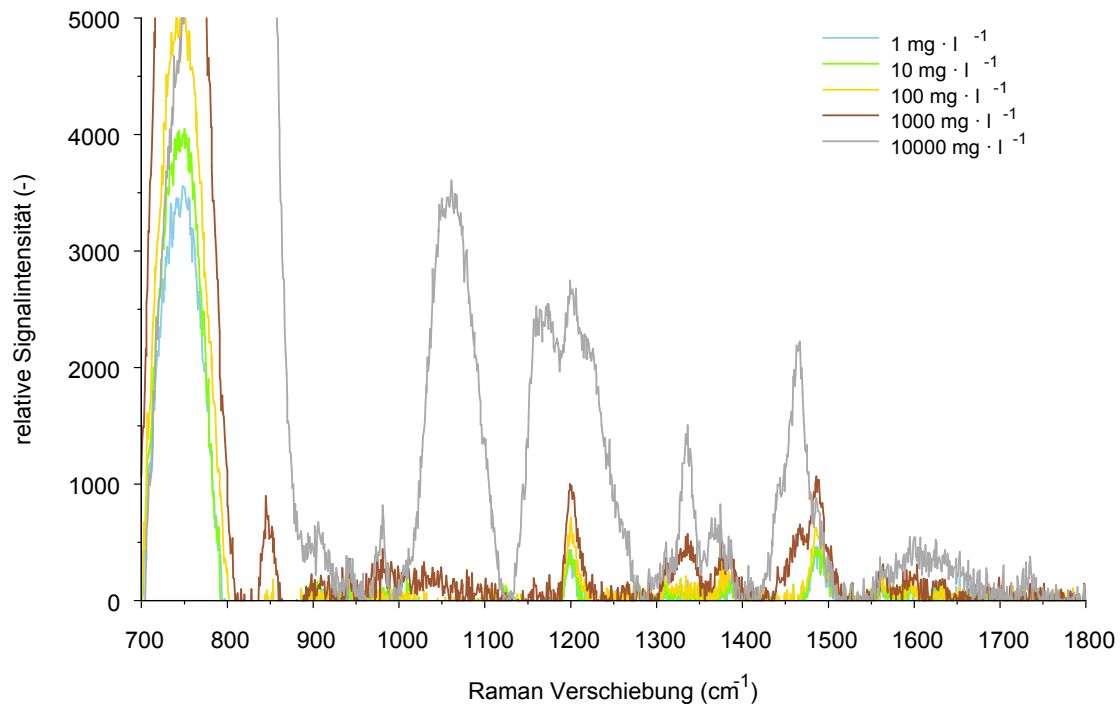


Abbildung 5.59: Blindwertbereinigte Raman-Spektren verschieden konzentrierter PHB-Suspensionen in H_2O . Die Messungen erfolgten in geschlossenen Reaktoren bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer über wiederholte Lichtpulse summierte Gesamtlaserintensität von 2 J. Die gezeigten Spektren sind gemessene Raman-Spektren der unterschiedlichen PHB-Verdünnungsstufen, von denen ein im Reaktor gemessenes Spektrum von reinem Wasser subtrahiert wurde. Bei 488 nm Anregungswellenlänge resultiert eine Verschiebung von 700 cm^{-1} in einer Absolutwellenlänge von 505 nm, 1800 cm^{-1} Verschiebung entsprechen 535 nm.

Wie erkennbar, zeigen sich deutliche Unterschiede im Vergleich zu den ungeblankten Raman-Spektren. Vor allem fällt auf, dass die Grundlinie beinahe deckungsgleich mit der Abszisse ist und breitbandige Untergrundsignale im Bereich von 1000 bis 1500 Wellenzahlen $\cdot \text{cm}^{-1}$ stark minimiert sind. Zudem fehlen in den bereinigten Spektren ein Raman-Peak bei 1467 cm^{-1} und eine Peakflanke bei 1160 bis 1170 cm^{-1} sowie eine breite Bande bei ca. 1640 cm^{-1} . Auch die geblankten Spektren zeigen insgesamt relativ breite Raman-Peaks und sind wesentlich ärmer an klaren Raman-Signalen als per konfokalem Versuchsssetup gemessene Spektren. Jedoch sind Raman-Peaks bei ca. 840, 960, 1210, 1330 & 1360, 1480 sowie 1740 cm^{-1} erkennbar.

5.2.8.2 Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten

Um eine begründete Diskussion der Regressionsmodelle führen zu können, sind in der folgenden Abbildung 5.60 zunächst einige Raman-Spektren aufgeführt, welche im geschlossenen Reaktor gemessen wurden.

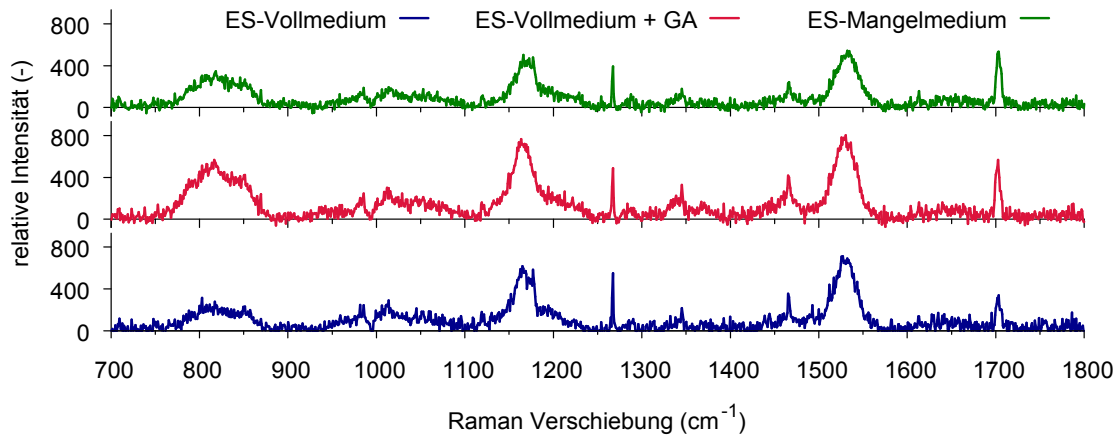


Abbildung 5.60: Raman-Spektren verschiedener Kulturen von *N. muscorum*, aufgenommen nach einer Kulturdauer von 8 Tagen. Die Messungen fanden im geschlossenen Reaktor statt mit einer Anregungswellenlänge von 488 Nanometern. Die gezeigten Spektren stammen von Proben mit einem PHB-Anteil von 8,73 (ES-Vollmedium), 4,91 (ES-Vollmedium + jeweils 2 % w/v Glucose & Acetat) sowie 15,34 (ES-Stickstoffmangelmedium) Gewichtsprozent bezogen auf die jeweilige Probentrockenmasse. Bei 488 nm Anregungswellenlänge resultiert eine Verschiebung von 700 cm⁻¹ in einer Absolutwellenlänge von 505 nm, 2000 cm⁻¹ Verschiebung entsprechen 535 nm.

In allen gezeigten (sowie in den weiteren im Versuch aufgenommenen) Spektren zeigen sich einige konsistente Signale:

- Eine Bande bei ca. 850 Wellenzahlen
- Ein Doppelpeak bei ca. 983 und 1007 cm⁻¹
- Breite Raman-Banden bei ca. 1160 und 1523 Wellenzahlen
- Eine Signalspitze bei 1267 cm⁻¹
- Ein Peak bei 1705 cm⁻¹
- Sowie Signale bei 1345 und 1465 Wellenzahlen.

Auffällige und miteinander direkt korrelierte Intensitätsunterschiede zeigen sich vor allem bei den Banden um 850, 1007, 1160 und 1523 Wellenzahlen. Bei dem Peak welcher bei 1705 auftritt sowie der Signalspitze bei 1267 cm⁻¹ lässt sich eine derartige Kopplung der Signalintensität an das übrige Spektrum nicht erkennen.

In der folgenden Abbildung 5.61 ist das anhand der grundlinienkorrigierten Raman-spektren berechnete PLS-Regressionsmodell gezeigt.

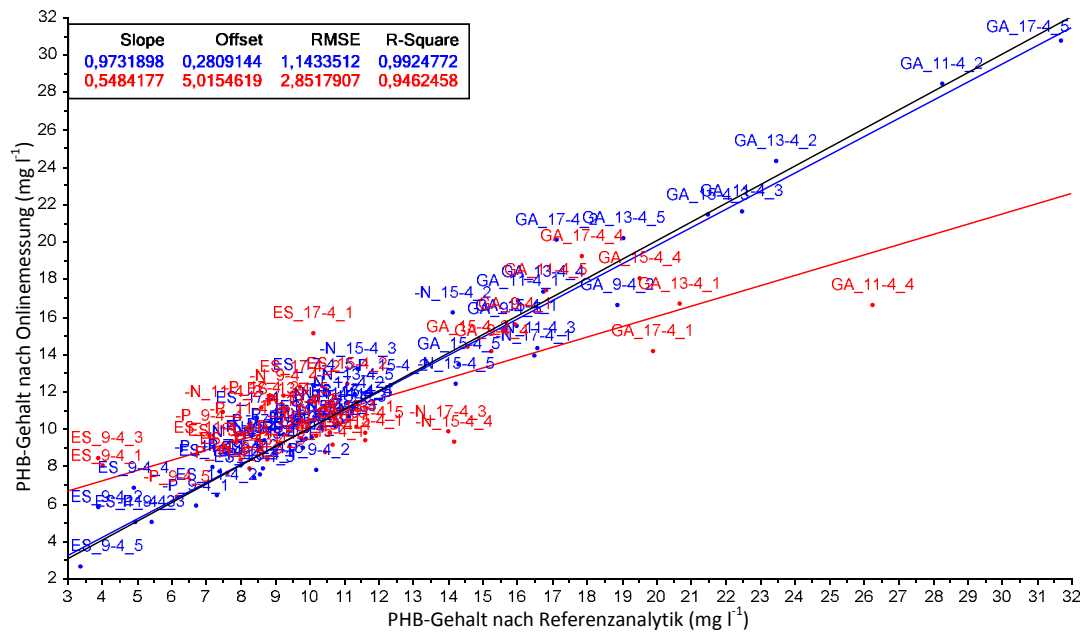


Abbildung 5.61: Übersicht der PLS-Regressionsergebnisse des 1. Versuchsdurchlaufs bei Verwendung der grundlinienkorrigierten Ramanspektren als Vorhersagewerte. Gezeigt ist die Gegenüberstellung der per Referenzanalytik ermittelten PHB-Gehalte (Abszisse) mit den Vorhersagewerten des Regressionsmodells (Ordinate). Die PLS wurde mit 7 Faktoren ohne Zentrierung berechnet. Der Kalibrierdatensatz umfasste 57 Proben (blau), der Validierdatensatz 39 Proben (rot). In schwarz eingezeichnet ist die Winkelhalbierende, in blau die Regressionsfunktion der Kalibrierdaten, in rot jene der Validierdaten. Die Proben wurden in ES-Vollmedium („ES“), ES-Vollmedium mit Glucose und Acetat („GA“), ES-Stickstoffmangelmedium („-N“) und ES-Phosphatmangelmedium („-P“) kultiviert.

Das erstellte PLS-Modell umfasst einen Datensatz von insgesamt 96 Proben, welche einen PHB-Gehalt von 1,37 bis 24,02 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ abdecken. Wie erkennbar, ist die Vorhersage im Bereich geringer PHB-Konzentrationen teilweise relativ ungenau, wobei im gesamten Modell geringe PHB-Gehalte prinzipiell überschätzt und einzelne hohe Gehalte unterschätzt werden. Um die Spezifität des Verfahrens beurteilen zu können wurden die wellenzahlenabhängigen Einflüsse auf die Berechnung der einzelnen Faktoren betrachtet. Eine Zusammenfassung ist in Abbildung 5.62 gegeben.

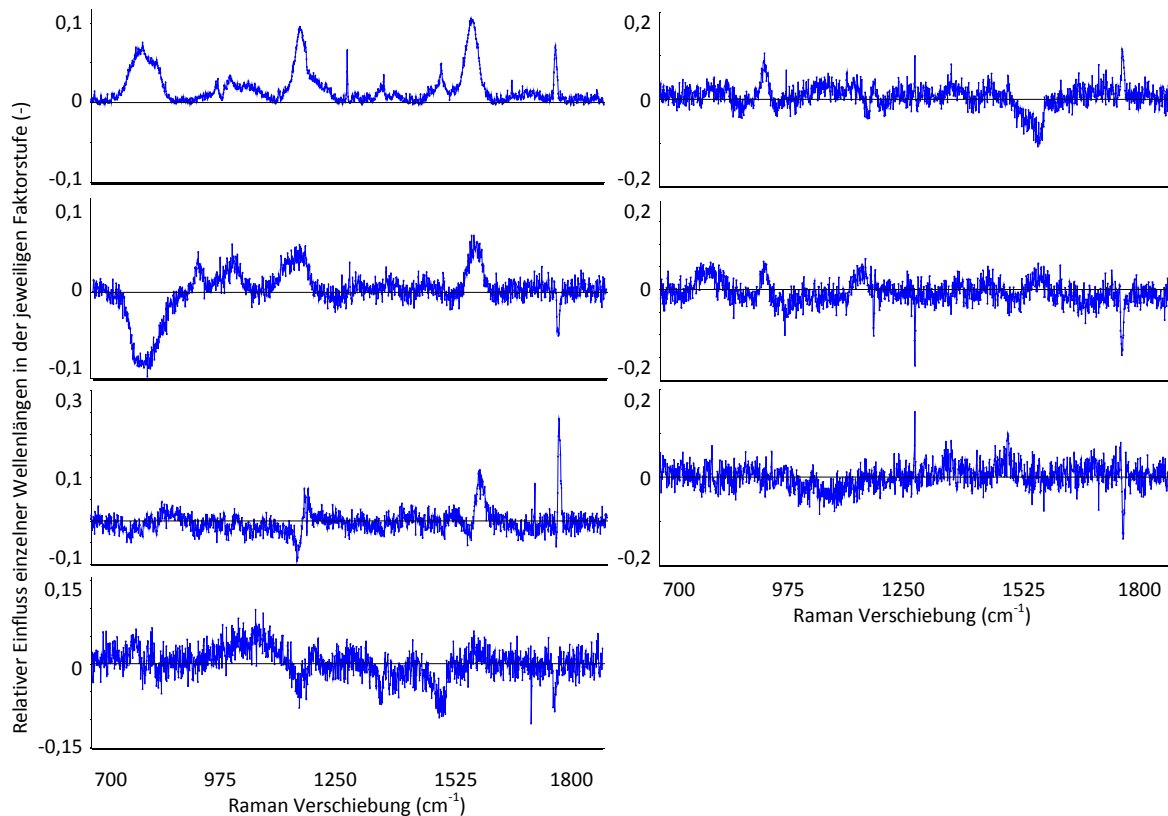


Abbildung 5.62: Relativer Einfluss der Raman-Spektraldaten auf das Vorhersagemodell. Gezeigt sind die Faktorstufen 1 - 7 (1 & 2 in der ersten Zeile, 3 & 4 in der zweiten, usw.), wobei größere Werte einen größeren Einfluss bedeuten.

Bereits die erste Faktorstufe erklärt einen hohen Anteil der spektralen Varianz. Zudem sind Bereiche um 815, 1165 sowie 1530 cm^{-1} in besonderem Maße zur PHB-Vorhersage relevant. Gleiches gilt für die dritte Stufe. In der zweiten Faktorstufe lässt sich ein geringer Einfluss im Bereich von 938 sowie 1530 cm^{-1} erkennen, während bei Stufe 4 vor allem die engbandigen Peaks bei 1267 und 1705 cm^{-1} bedeutsam scheinen. In der fünften Stufe hat der Peak bei 1705 nm den größten Einfluss, während (wie auch in den Faktorstufen sechs und sieben) jedoch bereits unspezifische Rauschanteile in den Daten erkennbar sind.

5.2.8.3 Übersicht multipler Versuchsdurchläufe der Raman-Messungen

Es wurde lediglich eine komplette Versuchsreihe Raman-spektroskopisch vermessen. Ein Überblick über die Qualitätsparameter des erstellten Regressionsmodells ist in Tabelle 5.13 gegeben.

Tabelle 5.13: Übersicht des Regressionsmodells, welches anhand der Raman-Spektren berechnet wurde

Versuchsreihe	PHB-Gehalte ^a (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEC ^c (%)	RMSEP ^b (mg · l ⁻¹)	RMSEP ^c (%)	R ² Kalibrierung	R ² Validierung	Modellfaktoren
1 (Reaktor)	3,375 - 31,719	1,1434	4,03	2,8518	10,60	0,992	0,946	5

Anzahl Kalibrier-/Validierproben: 57/39

^a Aufgeführt sind minimale und maximale PHB-Gehalte der Probengesamtheit jeder Versuchsreihe

^b Die aufgeführten absoluten RMSECs und RMSEPs sind jene der Rohdaten-basierten Modelle

^c Die prozentualen Werte sind berechnet anhand der absoluten RMSECs und RMSEPs bezogen auf die absoluten PHB-Gehaltsspannen

Wie erkennbar, liegt der mittlere Modellfehler der Kalibrierung bei ca. 1,14 mg · l⁻¹ und jener der Validierung deutlich höher bei ca. 2,85 mg · l⁻¹. Bei einer Spannbreite der PHB-Konzentration von 28,34 mg · l⁻¹ im betrachteten Versuch liegt der mittlere Vorhersagefehler somit in einer Größenordnung von 10 % der Grundgesamtheit. Für die Kalibrierung ist ein Bestimmtheitsmaß von 0,99 gegeben, während in der Validierung ein Wert von 0,95 erreicht wird. Für die PHB-Vorhersage anhand der Raman-Spektren erweist sich ein Modellumfang von 5 berechneten Hauptkomponenten als optimal.

Die folgende Abbildung 5.63 zeigt die Entwicklung der Modellparameter nach Anwendung verschiedener Vorbehandlungen auf die (bereits grundlinienkorrigierten; vgl. Abschnitt 4.4.7.2) Rohdaten.

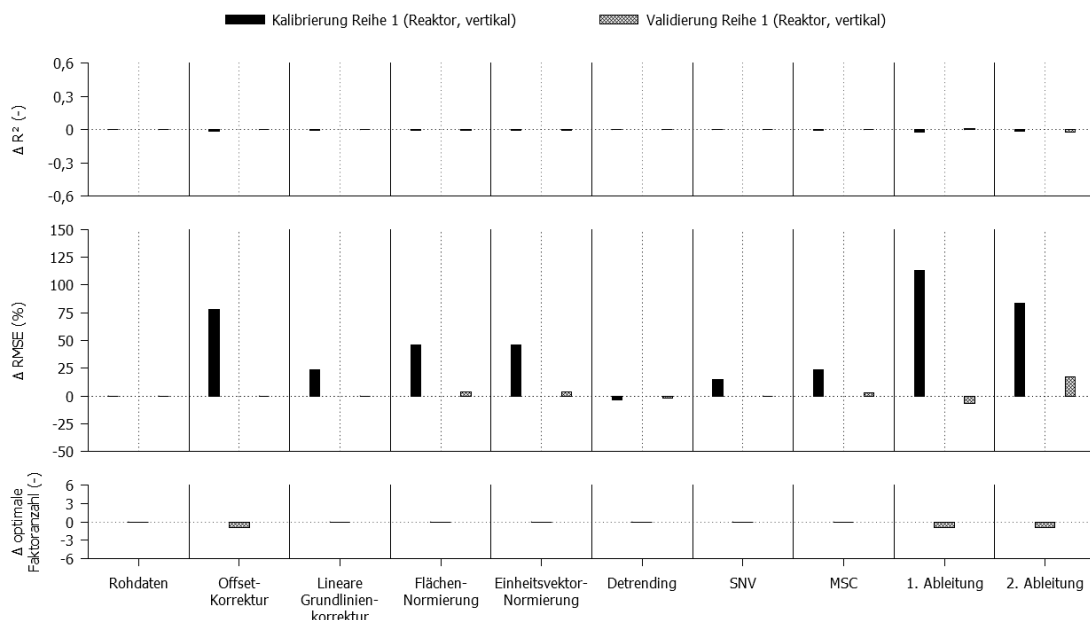


Abbildung 5.63: Übersicht der Regressionsmodelle, welche auf Basis der Raman-Spektraldaten bei Anwendung verschiedener Vorbehandlungen erstellt wurden. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse der Rohdaten-Regressionen als auf null gezogene Referenzen (für die erreichten Modellparameter siehe vorherige Tabelle 5.13) sowie die (prozentualen oder absoluten) Differenzen der Modellparameter bei Nutzung der vorbehandelten Spektraldaten.

Durch keine der getesteten Methoden zur Grundlinien- sowie zur Streulichtkorrektur kann der Vorhersagefehler entscheidend (wenn überhaupt) verringert werden. Einzig bei der Erstellung von Regressionsmodellen anhand von Ableitungsspektren 1. Ordnung, welche eine optimale Faktorenanzahl von 4 ergeben, sinkt der RMSEP minimal auf $2,65 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ bei einem R^2 von 0,95, wobei jedoch der Kalibrierfehler um das Doppelte ansteigt.

5.2.9 NIR-Raman-Spektroskopie

Da bei der Verwendung von Laserquellen, welche im sichtbaren Spektralbereich emittieren, in den durchgeführten Versuchen starke Fluoreszenzsignale auftraten, wurde erprobt, inwiefern die Verwendung von Laserlichtquellen, welche im NIR-Bereich emittieren, eine Verbesserung der Spektrenqualität mit sich bringt. In Abbildung 5.64 ist ein Raman-Spektrum von PHB dargestellt, aufgenommen bei einer Anregungswellenlänge von 1064 nm.

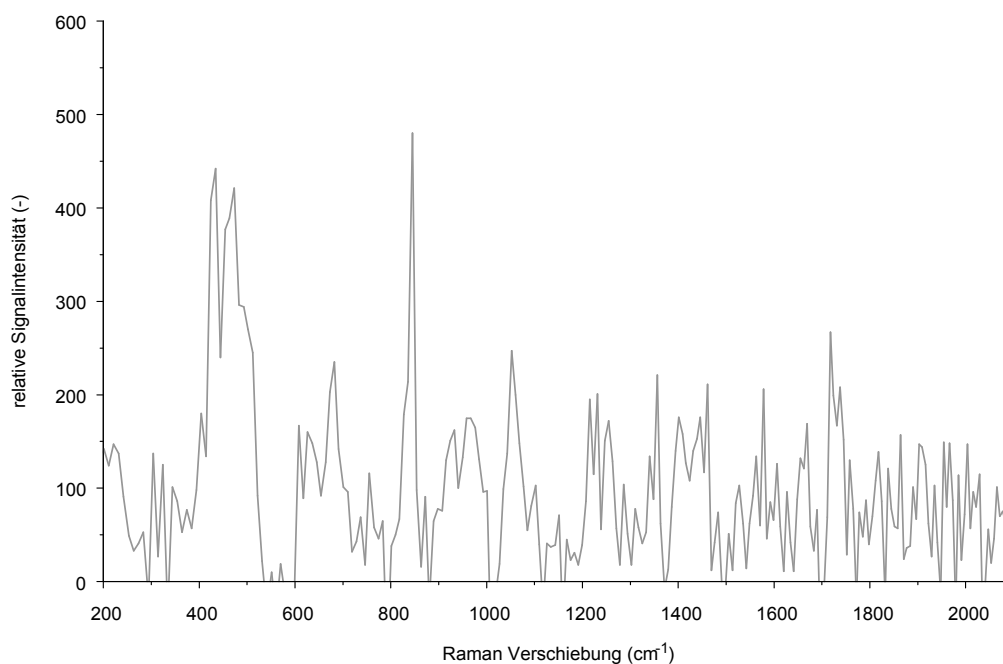


Abbildung 5.64: Raman-Spektrum von pulverförmigem PHB bei 1064 nm Anregungswellenlänge. Die Strahlintensität betrug ca. 490 mW bei einer Integrationsdauer von 10 Sekunden.

Wie zu erkennen, weist das Spektrum ein extrem schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis auf. Im Bereich von 400 bis 500 cm^{-1} ist ein Doppelpeak erkennbar und ein weiterer klarer Peak ist bei 840 cm^{-1} sichtbar. Im übrigen Spektralbereich ist eine klare Unterscheidung zwischen Untergrundrauschen und Raman-Signalen kaum möglich. Deshalb wurde von weiteren Raman-Messungen im NIR-Bereich abgesehen.

6 Diskussion

Dieser Abschnitt umfasst die Diskussion der Ergebnisse, die im Laufe dieser Arbeit erzielt wurden.

6.1 Entwickelter Einwegreaktor

Um Versuche mit Mikroalgen und Cyanobakterien in einem abgeschlossenen System durchführen zu können, galt es zunächst das System als solches zu etablieren. Die Verwendung von Einwegmaterialien aus dem Lebensmittelbereich erwies sich hierbei aus mehreren Gründen als gute Wahl. So zeigten die genutzten Polypropylenbecher durch ihr geringes Gewicht und ihre Bruchsicherheit eine gute Einsetzbarkeit in Versuchen, welche auf klassischen Orbitalschüttlern durchgeführt werden. Durch die Gewichtsverminderung im Vergleich zu Glaskolben können bei gleicher Schüttleranzahl wesentlich mehr Proben parallel mit einem Antrieb bewegt werden. Als essentiell für die Einsetzbarkeit bei Versuchen mit biologischen Proben ist anzusehen, dass keine Beeinflussung der Organismen durch eventuell aus dem Polymermaterial auswaschende Stoffe entsteht. Laut Konformitätserklärung zu den verwendeten PP-Bechern sind diese explizit für die Befüllung mit wässrigen, alkoholischen, sauren und fettigen Substanzen geeignet. Die Befüllung mit Mikroalgen oder Cyanobakterien, die in wässrigem Medium suspendiert sind, entspricht somit dem regulären Verwendungszweck der Becher. Als einziges Dual-Use-Additiv (d.h. Stoffe, die sowohl als Additive für Kunststoffe als auch als Lebensmittelzusatzstoffe zugelassen sind) ist in den Bechern Glycerolmonostearat (GMS) enthalten, welches als nicht-ionisches Antistatikum bei der Polymerverarbeitung zugegeben wird (AICMA, 2014, Stand 06.04.2014). Für diesen Stoff sind keine aquatischen Toxizitätsangaben vorhanden, jedoch werden für Ratten hohe letale Dosen (orale $LD_{50} > 5$ g/kg Körpergewicht) und für Fische hohe halbletale Konzentrationen ($LC_{50} > 100$ mg/l) angegeben (American International Chemical Inc., 2012). Insgesamt ist GMS als nicht gewässergefährdend eingestuft (Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, 2014). Zudem ist der Stoff bioabbaubar und kann, sofern er von Zellen aufgenommen werden sollte, im Fettsäurestoffwechsel metabolisiert werden (Widianingsih *et al.*, 2013; Los & Mironov, 2015).

Eine Beeinflussung von Versuchskulturen durch GMS ist letztlich aufgrund verschiedener Ursachen sehr unwahrscheinlich:

- Die im Material eingesetzten GMS-Konzentrationen sind aufgrund der Lebensmittelverträglichkeit sehr gering, generell werden weniger als 3 % w/w GMS zum PP-Rohpolymer hinzugegeben (Pionteck & Wypych, 2007, S. 179)
- Die Reinheit des Additivs ist mit 90 % sehr hoch, so dass keine Verunreinigungen mit potenziell toxischen Stoffen wie beispielsweise Schwermetallen zu erwarten sind
- Der Stoff migriert zwar relativ schnell an die Polymeroberfläche (Barnes, 1997), verbleibt jedoch mit seinem hydrophoben Teil im Material verankert und wird passiv kaum an die Umgebung abgegeben (Sakhalkar *et al.*, 2002)
- GMS ist wasserunlöslich (American College of Toxicology, 1982), wodurch ein Auswaschen aus dem Polymer durch wässrige Anzuchtmedien stark erschwert wird

Die oben genannten Faktoren gelten analog für die verwendeten Siegfolien. Auch wenn für diese keine verlässlichen Informationen zu bekommen waren, welche Stoffe außer den ausgewiesenen Polymer-Grundmaterialien in ihnen möglicherweise vorhanden sind, sind alle für die Verwendung im Bereich der Lebensmittelverpackung ausgewiesen. Somit sind u.U. enthaltene Additive höchstens in Spuren enthalten und sollten auch hier maximal an die Polymeroberfläche migrieren, ein Entweichen von Additiven aus dem Polymerverbund ist somit vernachlässigbar. Hinzu kommt, dass die Flüssigphase im Reaktor (die Kultursuspension aus Anzuchtmedium und Mikroorganismen) so abgemessen wurde, dass kein Kontakt zwischen Flüssigkeit und Verschlusspolymer bestand, wodurch ein Auswaschen von Additiven vermieden wurde.

Generell ist zu konstatieren, dass bei der Verwendung von Materialien, die im Nahrungsmittelbereich eingesetzt werden, keine toxischen Einflüsse auf Kulturen von Mikroalgen und Cyanobakterien zu erwarten sind.

Als problematisch erwies sich in den ersten Versuchen jedoch eine (gerade bei höheren Beleuchtungsdichten) zum Teil sehr starke Kondensation von Anzuchtmedium an der Innenseite der Verschlussfolie, welche durch die Wirkung des Anzuchtssystems als Strahlenfalle hervorgerufen wurde. Während sichtbares Licht nahezu ungehindert die Reaktormaterialien passieren konnte, stellten diese für langwellige Wärmestrahlung eine unüberwindbare Hürde dar, was in Abbildung 6.1 gut zu erkennen ist.

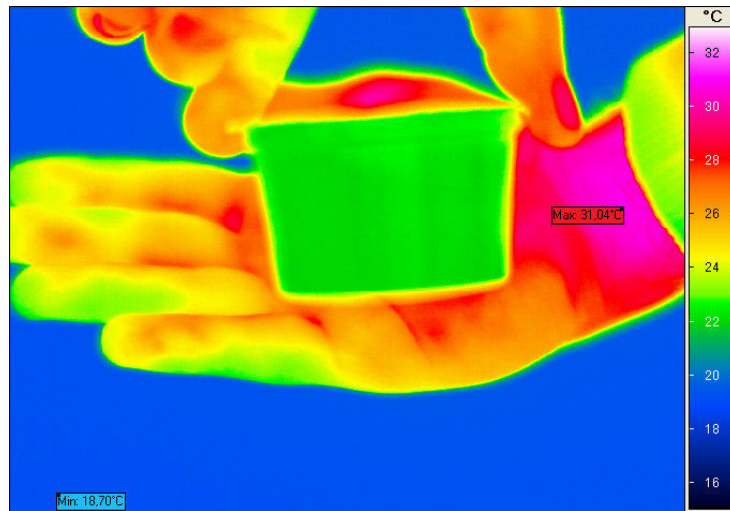


Abbildung 6.1: Wirkung der Reaktorgefäße als Strahlungsfalle. Wie ersichtlich, lässt das Gefäßpolymer langwellige Wärmestrahlung nicht passieren. Die Aufnahme wurde mit einer Varioscan 3021-ST der Firma InfraTec gemacht, im Messbereich von 7.000 bis 14.000 nm und einem angenommenen Flächenemissionskoeffizienten von 1, weshalb Haut- und Gefäßtemperaturen in der Darstellung verfälscht wiedergegeben sind.

Dies führte dazu, dass sich das Medium durch Strahlungsabsorption der oberseitig einfallenden Beleuchtung erwärmte, während die Verschlussfolie aufgrund ihrer geringen Absorption auf einem geringeren Temperaturniveau blieb. In Kombination mit den geringen Permeabilitäten aller Verschlussmaterialien für Wasserdampf kondensierte als Konsequenz das Medium an der oberen Reaktorinnenseite aus, was neben einer verringerten Strahlungsdurchlässigkeit der Verschlussfolie vor allem zu einem verringerten Gaswechsel zwischen Systeminnen- und -außenseite führte. Da die Kondensation nicht reproduzierbar ablief, ergab sich hierdurch eine starke Beeinflussung der Systemeigenschaften, welche zu ungewollten Verfälschungen von Versuchsergebnissen führte. Als Lösung wurde hierfür ein abgewandelter bottom-cooling-Ansatz aus der *In-vitro*-Kulturtechnik verwendet. Bei der Vermehrung von Pflanzen mittels *In-vitro*-Techniken werden diese in geschlossenen Containern kultiviert was zu hohen Luftfeuchten führen kann, da die im Anzuchtmedium enthaltene Flüssigkeit durch thermischen Energieeintrag aufgrund der Beleuchtung evaporisiert. Um die Luftfeuchte zu senken, gibt es den Ansatz des bottom cooling, bei dem die Versuchskulturen mit ihren Containern auf eine im Vergleich zur Umgebungsluft kühleren Fläche platziert werden, so dass übermäßige Luftfeuchte im System an der Oberseite des festen Anzuchtmediums kondensiert (Vanderschaeghe & Debergh, 1987). In Anlehnung an diese Technik wurde auch für die in dieser Arbeit verwendeten, geschlossenen Reaktoren ein auf

Temperaturdifferenzen beruhender top-heating-Ansatz verfolgt. Im Gegensatz zum bottom cooling wurde jedoch die Reaktoroberseite erwärmt. Dies geschah durch einen Luftstrom, welcher von oben auf die Kulturgefäße geblasen wurde und dessen Temperatur 2 °C über der Temperatur im restlichen Kulturraum lag. Auf diese Weise wurde bevorzugt die Verschlussfolie erwärmt, wodurch die Kondensationsraten in den folgenden Versuchen minimiert bis eliminiert wurden. Abbildung 6.2 zeigt einen Vergleich von zwei Anzuchtbechern, wobei einer ohne und einer mit top heating kultiviert wurde.

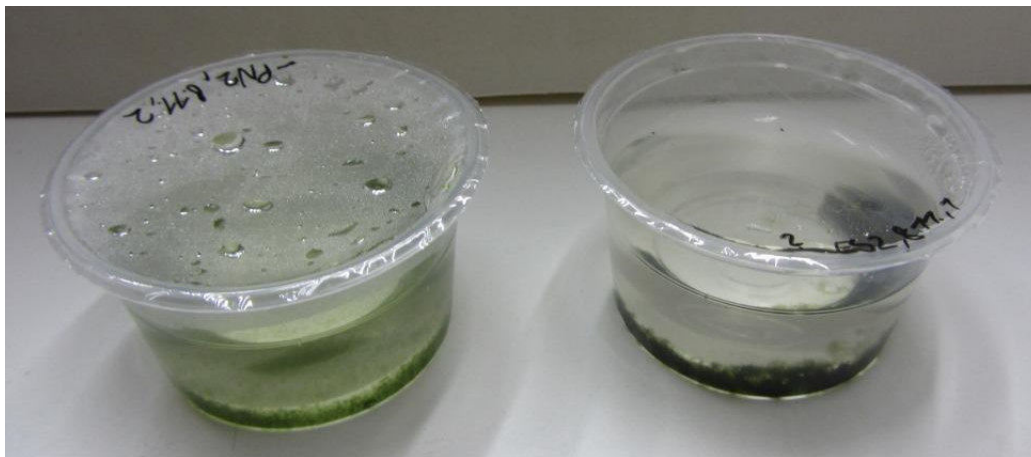


Abbildung 6.2: Seitenansicht von zwei Cyanobakterienkulturen, welche bei einer Raumtemperatur von 24 °C kultiviert wurden. Links: Anzucht ohne top heating, Kondensation an der Reaktoroberseite ist stark vorhanden. Rechts: Anzucht mit top heating bei einer Temperaturdifferenz von + 2 °C der von oben zugeführten Luft im Vergleich zur Umgebungstemperatur, Kondensation ist nicht vorhanden

Wie zu erkennen, führte die Verwendung des top-heating-Ansatzes zu einer nahezu kompletten Eliminierung von Kondensat an der inneren Verschlussfolienseite. Bei Verwendung des geschlossenen Einweg-Systems für Versuche mit Flüssigkulturen ist der Einsatz luftfeuchtesenkender Maßnahmen zwingend erforderlich um einen guten Gas-transfer durch den Verschluss zu ermöglichen. Die hier verwendete Methode zeigte sich als praxistauglich und leicht umzusetzen und sei für weitere Versuche empfohlen.

6.1.1 Spektrale Transmissionseigenschaften der Reaktormaterialien

Die Reaktoren wurden stets auf Orbitalschüttlern kultiviert, wodurch eine unter Umständen leicht inhomogene Lichtverteilung innerhalb der Gefäße durch die stete Durchmischung der Kultursuspension ausgeglichen werden kann. Da jedoch aus der in vitro Kultur von Mikrostecklingen bekannt ist, dass eine runde Gefäßgeometrie zu ho-

mogeneren Lichtverteilungen führt als solche, die auf einer rechteckigen Grundfläche aufbauen (Huang & Chen, 2005), wurde durch die konische Reaktorform bereits eine gute Voraussetzung für eine gleichmäßige Belichtung der kultivierten Organismen geschaffen.

Um zu klären, welcher Wellenlängenbereich von den verwendeten Materialien transmittiert wird, wurden alle Polymermaterialien im Bereich von 200 bis 2600 nm spektrometrisch vermessen. Die gemessenen Transmissionsspektren (siehe Abbildung 5.2) zeigen für alle Materialien ähnliche Verläufe. Unterhalb von ca. 300 nm ist die Absorption durch die Plastikmaterialien sehr hoch, so dass kurzwellige UV-Strahlung so gut wie nicht transmittiert wird. Dies deckt sich mit den in Abbildung 6.3 dargestellten optischen Eigenschaften von Polypropylenmaterialien und weiteren Literaturangaben (Cámara *et al.*, 2014).

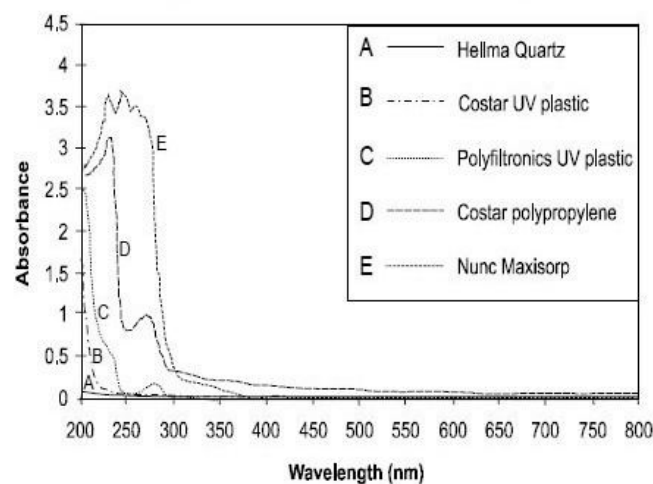


Abbildung 6.3: Extinktionsspektren verschiedener Polymer-Mikrotiterplatten (Held, 2009).

Diese sind zum einen mit koinzidierenden Quanten-Energiemengen der UV-Strahlung sowie der Dissoziierungsenergie der Bindungen des Polymers erklärbar, durch welche Photonen dieser Wellenlängen verstärkt absorbiert werden. Zwar absorbiert Polypropylen im reinsten Zustand im nahen UV kaum Strahlung, jedoch können Polymerisations- und Verarbeitungsfehlstellen sowie Katalysatorreste oder andere, für Verarbeitung und Gebrauch zugesetzte Additive, zu UV-Absorption führen (Klöppfer, 1978).

Als Konsequenz aus der hohen UV-Absorption durch die Reaktormaterialien sowie der potenziellen physiologischen Beeinflussung, welche eine UV-Exposition auf biologische Organismen hat (wie beispielsweise von Balan & Suraishkumar 2014 beschrieben) und

welche vor allem bei der laserbasierten Anregung im Zuge von Raman-Messungen sogar destruktiv wirken kann (Tanaka *et al.*, 2009), sind Messungen im Photobioreaktor im UV-Bereich nicht praktikabel.

Im sichtbaren Spektralbereich absorbieren alle Materialien jedoch nur zu einem sehr geringen Grad die einfallende Strahlung, so dass bei Transmissivitäten von ca. 90 % in diesem Bereich von einer sehr hohen Durchlässigkeit gesprochen werden kann. Photometrische Messungen in diesem Wellenlängenbereich sind deshalb sehr gut durchführbar und die durch die Eigenabsorption der Materialien hervorgerufenen Messsignale sind sehr gering. Zudem zeigten sich in den Ergebnissen der Materialmessungen hohe Reproduzierbarkeiten einzelner Messungen, was auf äußerst konstante Materialeigenschaften zwischen einzelnen Folienstücken schließen lässt. Da alle Folienproben jeweils von derselben Produktionscharge stammen, entspricht dies den Erwartungen. Auch im NIR-Bereich weisen die Materialien extrem hohe Transmissivitäten auf und auch für diesen Bereich zeigten sich äußerst robuste spektrale Eigenschaften verschiedener Folienstücke. Die hohen Absorptionssignale im Bereich von 1700 bis 1800 nm sind dabei auf Oberton-Streckschwingungen der vorhandenen CH₂- und CH₃-Gruppen der Polymermaterialien zurückzuführen (Furukawa *et al.*, 2002).

Die auftretenden Wellenmuster in den Transmissionsspektren sind auf die glatten Oberflächen der Folien zurückzuführen, wodurch es zwischen den Grenzflächen der Folieninnen- und Außenseiten zu wellenlängenabhängigen Interferenzeffekten kommt (Larena & Pinto, 1992). Diese können zwar bei geringen Konzentrationen eines Zielanalytes dessen Spektrum überdecken und somit die Auswertung erschweren. Da im verwendeten System jedoch Materialien derselben Produktionschargen verwendet wurden, welche konstante Transmissionseigenschaften aufwiesen, ist eine negative Beeinflussung der spektralen Messungen unwahrscheinlich. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Eigenextinktionen der verschlossenen Reaktorgefäße einen derart konsistenten Verlauf haben, dass sie beinahe als interne Standards angesehen werden können. In den Versuchen, welche in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde zwar mit PHB ein Biopolymer als Zielanalyt ausgewählt, dessen Absorptionsbanden sich mit jenen der Reaktorgefäße in gewissen Spektralbereichen leicht überlagern, denkt man jedoch den obigen Gedanken konsequent weiter, so könnten die (wenngleich schwach ausgeprägten) Extinktionseigenschaften der Reaktorgefäße in Versuchen mit anderen Orga-

nismen oder Inhaltsstoffen als verlässliche Standards dienen, welche eine genauere Inhaltsstoffbestimmung ermöglichen könnten.

6.1.2 Gaswechsel-Messungen

Die Auswertung der durchgeführten Gaswechselfmessungen zeigte deutliche Unterschiede in den Gasdurchlässigkeiten der verschiedenen Folienmaterialien. Wie in Abbildung 5.3 ersichtlich, wiesen einige Folientypen relativ geringe CO₂-Durchlässigkeit auf, einige Folien hatten höhere Permeationskapazitäten und zudem gab es mit der verwendeten Haftsichtfolie ein Material, welches eine sehr hohe CO₂-Durchlässigkeit aufwies. Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen und lassen sich sowohl mit den Eigenschaften der Folienmaterialien selbst, den bei einigen Folientypen aufgetragenen Beschichtungen sowie weiteren verarbeitungstechnischen Eigenschaften erklären.

Zunächst ist die molekulare Beschaffenheit des Polymers entscheidend. So hat unter anderem die Polarität der Monomere einen Einfluss darauf, welche Gase bevorzugt durch eine Folie permeieren können. Unpolare Materialien führen zu höheren Permeationsraten für unpolare Permeanden wie beispielsweise Kohlendioxid. So weisen Polyolefine (was chemisch gesehen reinen C-H-Verbindungen entspricht) generell höhere Gaspermeationsraten auf als beispielsweise Polyamide (C-H-Verbindungen mit eingelagerten Stickstoffanteilen) oder andere Polymere (McKeen, 2012, S. 135 ff.). Die für Flachfolie OPP/PEM gemessene geringe CO₂-Durchlässigkeit ist auf die Verwendung von Polypropylen im Polymerverbund zurückzuführen, welches eine weit geringere Gasdurchlässigkeit aufweist als beispielsweise reines Polyethylen geringer Dichte (McKeen, 2012, S. 150 & 157). Die Tatsache, dass reines LDPE eine ca. 15-fache Permeationskapazität für CO₂ besitzt wie PP, die in den Gaswechselfmessungen ermittelten Werte jedoch weit weniger voneinander abweichen, ist dadurch zu erklären, dass in der OPP/PEM-Folie Polypropylen lediglich als einzelne Schicht im Polymerverbund vorhanden ist und mit 2 µm eine sehr geringe PP-Schichtdicke vorhanden ist. Ähnliches gilt für die Folie Vario-Seal HB PP AF. Auch in dieser ist eine Barrierschicht aus PP eingearbeitet, welche die Gaspermeabilität herabsetzt. Die untersuchte Siegfelfolie mit Mikroperforation weist generell eine relativ hohe Durchlässigkeit für CO₂ auf, jedoch ist wie in Abbildung 5.3 ersichtlich eine große Streuung in den ermittelten Durchlässig-

keiten vorhanden. Diese sind durch die Art der Mikroperforation bedingt. Die Löcher, welches mittels Laser in die Folie eingebracht werden, weisen einen Durchmesser von 60 μm auf und erhöhen prinzipiell die Gasdurchlässigkeit im Vergleich zu einer nicht-perforierten Folie um ein Vielfaches. Jedoch wurden bei der in dieser Arbeit verwendeten Folie relativ wenige Perforationen eingebracht (lediglich drei Löcher in Querrichtung mit einem mittleren Abstand von 6 cm zueinander in einem Längsabstand von 5 cm). Die geringe Perforationsdichte und die Tatsache, dass die einzelnen Löcher mit bloßem Auge kaum zu erkennen waren, führten wahrscheinlich dazu, dass in den CO_2 -Durchlässigkeitsmessungen uneinheitliche Folienstücke vermessen wurden, welche teils mehr, teils weniger Löcher pro vermessener Fläche aufwiesen. Bedenkt man die Schwierigkeit, einheitliche Folienstücke zu erkennen, ist eine Verwendung dieser Folie für Wachstums- oder andere Versuche eher auszuschließen, da nur sehr schwer reproduzierbare Materialeigenschaften zu erzielen sind. Zudem sind die einzelnen Perforationen mit einer Lochgröße von 60 μm relativ groß und können unter Umständen ein ungewolltes Eindringen von Bakterien oder andere Verunreinigungen ermöglichen, was zusätzlich einer Verwendung dieser Folie entgegensteht. Die vermessene MRX-Folie aus PE sollte nach Herstellerangaben eine hohe Gasdurchlässigkeit aufweisen, findet sich in den Versuchen jedoch eher im Mittelfeld der verschiedenen Folien wieder. Die relativ geringen gemessenen CO_2 -Permeabilitäten sind mit den Materialeigenschaften von LDPE nicht zu erklären, auch eine Herstelleranfrage hierzu lieferte keine abschließende Erklärung. Die vermessene Haftsichtfolie aus LDPE zeigte eine hohe Permeabilität für CO_2 , was den Erwartungen für dieses Material entspricht. Aufgrund der sehr geringen Dicke dieser Folie ist jedoch ein Verschweißen schwierig und erfordert einige Übung, weshalb diese Folie im Handling als leicht problematisch anzusehen ist.

Generell zeigte sich, dass vor allem Folien, welche komplett aus LD-Polyethylen bestehen bzw. einen hohen PE-Anteil aufweisen, hohe Permeationsraten aufweisen und somit als Siegelfolie zu bevorzugen sind.

Erwähnt sei an dieser Stelle jedoch, dass lediglich Messungen mit CO_2 als Tracergas durchgeführt wurden und somit keine verlässlichen Aussagen bezüglich des Permeationsverhaltens für andere Gase getroffen werden können. Auch wenn es Faustformeln für die verhältnismäßigen Durchlässigkeiten für CO_2 , O_2 und weitere Gase gibt, so sind

diese lediglich grobe Richtwerte und können durch den Herstellungsprozess einer Folie, durch Additive oder andere Faktoren stark beeinflusst werden. Um neue Folien bezüglich ihrer Verwendbarkeit zu charakterisieren sollten deshalb neben CO₂ auch weitere Gase für Permeationsprüfungen verwendet werden, was in dieser Arbeit jedoch aus verschiedenen Gründen nicht durchgeführt wurde.

Für noch höhere Gas-Transferraten bieten sich für zukünftige Versuche prinzipiell Verschlussfolien oder Deckel an, welche über eingearbeitete Membranen verfügen, die noch höhere Gasdurchlässigkeiten aufweisen als die in dieser Arbeit verwendeten Siegfelien. Diese werden beispielsweise in der *in vitro* Kultur von Pflanzen verwendet und unter anderem von der Firma Combiness vertrieben (<http://www.microbox-container.com>). Sehr zu berücksichtigen ist hierbei jedoch, dass durch die oftmals genutzten Filter nicht nur hohe Gasaustauschraten für CO₂ und O₂ ermöglicht werden, sondern mit zunehmender Gasdurchlässigkeit auch größere Verluste von Kultursuspension bedingt durch erhöhte Evaporationsraten einhergehen, da diese Filter Wasserdampf nur in geringem Maße zurückhalten. Gerade letztgenannter Effekt kann bei längeren Kultur dauern zu starken Verfälschungen von Messergebnissen (beispielsweise Zelldichtemessungen) führen, weshalb eine Eignung solcher Systeme zur Anzucht von Mikroalgen sehr kritisch zu sehen ist.

Um den Gastransfer unter Verwendung der in dieser Arbeit genutzten Siegfelien zu erhöhen bieten sich schließlich einige Optionen an, die in den durchgeführten Versuchen auch teilweise realisiert wurden. Da die passiven Diffusionsprozesse durch die Polymerfolien stark von Konzentrationsunterschieden der Gase (wie beispielsweise CO₂) zwischen der Reaktorinnen- und -außenseite abhängig sind, können die Diffusionsraten durch Erhöhung der Konzentrationsdifferenzen beeinflusst werden (Jackson, 2005). So sorgte die zur Vermeidung von Kondensation eingesetzte Heizung über den Reaktoren dafür, dass durch den permanent über die Gefäße strömenden, warmen Luftstrom die Atmosphäre oberhalb der Siegfelien stetig durchmischt wurde. Einer CO₂-Verarmung direkt oberhalb der Gefäße wurde somit aktiv entgegengewirkt. Zudem könnten die geschlossenen Reaktoren in Klimakammern oder ähnlichen kontrollierten Umgebungen gelagert werden, in denen die CO₂-Konzentration durch Zugabe von reinem CO₂ künstlich erhöht wird. Dies würde zu einer erhöhten CO₂-Verfügbarkeit für die Organismen im Reaktor führen, wodurch höhere kultivierbare

Zelldichten möglich wären. Auf den letztgenannten Punkt wurde in dieser Arbeit jedoch verzichtet, eine künstliche CO₂-Anreicherung der Luft im Versuchsraum fand nicht statt.

6.1.3 Bestimmung der Wachstumskapazität des entwickelten Einwegreaktors

Wie in den ermittelten Wachstumskurven ersichtlich, war die Biomassezunahme im geschlossenen System in allen Varianten bis zum 10. Versuchstag gleichwertig. Bei allen Varianten, welche mit Folie versiegelt wurden, stagnierte das Wachstum jedoch im folgenden Versuchsverlauf. Da alle Materialien im VIS-Bereich eine hohe Strahlungsdurchlässigkeit aufwiesen (vgl. Abschnitt 5.1.1) ist eine Lichtlimitierung als Ursache hierfür auszuschließen. Betrachtet man zudem die für jene Materialien ermittelten CO₂-Durchlässigkeiten (vgl. Abschnitt 5.1.2), so fällt auch hier auf, dass kein direkter Zusammenhang zwischen den CO₂-Permeabilitäten und der beobachteten Wachstumskapazität (d.h. der maximal im geschlossenen System erreichbaren Zellzahl) ersichtlich ist. Als wahrscheinlichste Ursache der beobachteten Wachstumshemmung ist deshalb nicht primär ein Kohlendioxidmangel, sondern vielmehr ein Überschuss des photosynthetisch gebildeten Sauerstoffs anzusehen, da dieser in sehr viel geringerem Maße durch die verwendeten Folien permeiert als CO₂. Hierdurch akkumuliert der Sauerstoff im Reaktor, wodurch die Photosyntheseaktivität und andere Stoffwechselwege inhibiert werden können. Auch wenn das Toleranzlevel gegenüber einem vorherrschendem O₂-Überschuss stark vom jeweiligen Versuchsorganismus abhängig ist (Pope, 1975), wurden in Versuchen mit *Chlorella pyrenoidosa* bei O₂-Konzentrationen ab 50 % der Umgebungsluft teilweise irreversible Schäden an den Versuchskulturen beobachtet (Shelp & Canvin, 1980). Zudem können übermäßige O₂-Konzentrationen auch andere Stoffwechselwege wie beispielsweise die Stickstofffixierung in Cyanobakterien hemmen (Berman-Frank *et al.*, 2005), so dass sie generell zu vermeiden sind.

Reaktoren, welche lediglich mit Deckeln verschlossen wurden bieten bereits ein höheres Wachstumspotential, vermutlich bedingt durch höhere Gasaustauschraten. Einzig die dünne Adhäsionsfolie ermöglichte im Vergleich zum Referenzsystem (mit Alufolie verschlossene Erlenmeyerkolben) eine um ein Viertel höhere, maximal kultivierbare Zelldichte von ca. 1 Milliarde Zellen pro Milliliter. Diese Erhöhung der Kapazität ist zum einen auf die materialbedingt höheren Gaspermeationsraten zurückzuführen (vgl. Ab-

schnitt 6.1.2), zum anderen boten die Reaktoren durch die transparente Siegelfolie eine bessere Lichtexposition der Kulturen im Vergleich zu den durch den Aluminiumfolien-Verschluss leicht beschatteten Erlenmeyerkolben.

Hierbei sei erwähnt, dass die erreichten Kulturdichten im Vergleich mit anderen Anzuchtssystemen noch als eher gering anzusehen sind. So beschreiben beispielsweise Lee & Palsson (1994) ein aktiv belüftetes und mit LEDs beleuchtetes System, in dem Zellzahlen von bis zu 2×10^9 Zellen pro Milliliter erreicht wurden. Ein direkter Vergleich der Systeme hinkt jedoch, da in dieser Arbeit allein aufgrund des gewählten geschlossenen Konstruktionsprinzips verringerte Gastransferraten vorliegen und zudem geringere Beleuchtungsstärken genutzt wurden.

Die ermittelten signifikanten Unterschiede in den möglichen Kulturdichten bei Verwendung unterschiedlicher Verschlussmaterialien traten erst bei erhöhten Zelldichten im Laufe der durchgeführten Wachstumsversuche auf. Es lässt sich somit feststellen, dass die Wahl des Verschlussmaterials bei Versuchen kurzer Versuchsdauer bis maximal 12 Tagen, bzw. bei geringeren Biomassekonzentrationen auch über noch längere Zeiträume, keinen Einfluss auf etwaige Versuchsergebnisse hat. Bei Langzeitkultivierungen und/oder hohen Biomassekonzentrationen sollten jedoch stets dünne Folien aus Polyethylen geringer Dichte gewählt werden, um eine optimale Kulturführung zu gewährleisten.

6.1.4 Dauerkulturführung im geschlossenen Einwegreaktor

Wie aus Abbildung 5.7 und Abbildung 5.8 ersichtlich, zeigten auch Kulturen, die über mehrere Monate im geschlossenen Reaktorsystem unter diversen Bedingungen gelagert wurden (zumeist unter moderater Beleuchtung) Wachstumsaktivität sobald sie auf frische Anzuchtmedien überführt wurden. Dieser Effekt war bei Kulturen von *Chlorella vulgaris*, *Porphyridium purpureum* und *Nostoc muscorum* gleichermaßen zu beobachten. Da während der Lagerung keinerlei Nährstoffe außer CO_2 in die geschlossenen Systeme zugeführt wurde, kann mit Sicherheit behauptet werden, dass in den jeweiligen Reaktoren dauerhafte Nährstofflimitierung vorlag, welche ab einer gewissen Kulturdauer auch wachstumslimitierend auf die jeweiligen Organismen wirkte. Zudem dürften sich im Reaktor wachstumshemmende Stoffe, welche beispielsweise von

Chlorella produziert werden (Pratt & Fong, 1940), angereichert haben und zusätzlich zu einer Begrenzung der Kulturdichten geführt haben.

Nach Übergang der Kulturen in die stationäre Phase ist davon auszugehen, dass einzelne Zellen abstarben und nachfolgend lysierten. Eine Anpassung des phototrophen Stoffwechsels der Kulturen auf heterotrophe Verwertung der aus lysierten Zellen ausgetretenen Inhaltsstoffe erscheint möglich und könnte zur langen Überlebensdauer der Kulturen beigetragen haben. Auch ist die Bildung von überdauerungsfähigen Vermehrungsstadien wie Sporen in *Chlorella* eine wahrscheinliche Grundlage der beobachteten Revitalisierung. Durch die Anreicherung der oben genannten Wachstumshemmer innerhalb der Reaktoren kommt es zu einem Stop der Freisetzung solcher Sporen aus den *Chlorella*-Mutterzellen, so dass keine weitere Differenzierung dieser Sporen und somit keine Vermehrung innerhalb der Kulturen mehr stattfindet (Javanmardian & Palsson, 1992). Es ist zu vermuten, dass diese Dauerformen des Organismus nach Zugabe frischen Mediums für das beobachtete Wachstum verantwortlich waren. Die nach Lagerung ermittelten Teilungsraten der Kulturen von *Chlorella vulgaris* waren annähernd vergleichbar mit jenen originär vitaler Kulturen, was darauf hindeutet, dass es zu einer Wiedererlangung des intrinsischen Wachstumspotenzials kam. Die Teilungsraten waren dabei zwar insgesamt eher gering, aber aufgrund der geringen Photonenstromdichten bei ihrer Anzucht erklärbar und durchaus mit Werten anderer Autoren unter ähnlichen Anzuchtbedingungen vergleichbar (Manisha, 2007). Auch *N. muscorum* ist zur Ausbildung von Sporen fähig (Allison *et al.*, 1937), was in diesem Versuch das Langzeitüberleben dieser Spezies ermöglicht haben dürfte. Aus diesen Sporen dürften sich durch Anastomose im Folgenden wieder filamentöse, vitale Kolonien formieren (Lazaroff & Vishniac, 1962).

Porphyridium bildet motile Sporen aus (Pickett-Heaps *et al.*, 2001; Pringsheim & Pringsheim, 1949) und zeigt unter Stickstoffmangel eine vermehrte Akkumulation von Carotinoiden, durch welche die Zellen stark rot erscheinen, während gleichzeitig Chlorophyll und Phycoerythrine abgebaut werden (Levy & Gantt, 1990; Guihéneuf & Stengel, 2015). Nach Überführung Vollmedium regenerieren solche Kulturen ihre Chlorophyll- und Phycoerythringhalte (Guihéneuf & Stengel, 2015). Die Autoren zeigen hierbei einen Anstieg der PhycoerythrinKonzentration nach 7 Tagen, bei annähernder Wiedererlangung der ursprünglichen Zellpigmentierung. Das Regenerationsverhalten

der Kulturen in dieser Arbeit zeigte jedoch eine Grünfärbung. Möglicherweise wurden Chlophyll e eher resynthetisiert als Phycoerythrine, welche optisch entsprechend maskiert wurden, jedoch ist auch nicht auszuschließen, dass eine Kontamination der ursprünglichen Kultur vorlag, welche nach Rekultivierung bevorzugt anwuchs und die erwarteten rotgefärbten Zellen von *Porphyridium* überwucherten. Letztlich kann gesagt werden, dass es auch in dieser Kultur eine wie auch immer geartete Wiederbelebung des Wachstums gab.

Die Durchlässigkeit der verwendeten Siegelfolie für Sauerstoff und CO₂ dürfte die Überdauerung der Kulturen positiv unterstützt haben, da so zumindest in geringem Maße Stoffwechselaktivitäten dauerhaft erhalten werden konnten.

Eine Eignung des Systems für weitere Organismen analog zu Routineverfahren, wie Kryokonservierung und Gefriertrocknung (Acreman, 1994) oder die Immobilisierung in getrockneten Agarblöcken (Syiem & Bhattacharjee, 2010) ist zu erwarten. Inwiefern die genetische Stabilität der Kulturen im entwickelten Reaktorsystem mit jener der oben genannten Methoden vergleichbar ist, ist ungeklärt und wäre vor einer Anwendung des Systems zur Langzeitlagerung photoautotropher Kulturen ebenso zu untersuchen.

Insgesamt lässt sich konstatieren, dass die entwickelten Reaktoren in gewissen Grenzen neben ihrer Funktion als Anzuchtssystem auch zur Langzeitaufbewahrung von phototrophen Organismen verwendet werden können, vor allem wenn diese in der Lage sind überdauerungsfähige Zelltypen wie Sporen auszubilden.

6.2 Optische *In-situ*-Analysen

6.2.1 NIR-Messungen optischer Dichten

Durch die Verwendung eines extinktionsbasierten Messprinzips ergeben sich stets gewisse Vor- und Nachteile. Vorteilhaft ist die schnelle Messdauer für eine einzelne Probe, welche bei fünf bis sieben Sekunden liegt. Hierdurch ist ein sehr hoher Probenumsatz von bis zu 20 Proben pro Minute möglich, was für den praktischen Einsatz in Experimenten mit hohen Probenzahlen unabdingbar ist.

Als nachteilig ist anzusehen, dass es gewisse Grenzen gibt, in denen das System arbeitet. Bei zu geringen Zellzahlen sind die Messwerte vom Medium-Blindwert praktisch nicht unterscheidbar. Auch zu hohe Zellzahlen sind ein Problem, da der nach dem Lambert-Beerschen Gesetz gegebene lineare Zusammenhang zwischen Extinktion und Zellkonzentration ab einer gewissen Kulturdichte in eine nicht-lineare Korrelation übergeht. Sättigungseffekte bei der Strahlungsaufnahme der Kultur führen hierbei unter Umständen zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Zellkonzentration. Der tatsächlich nutzbare Messbereich ist somit beidseitig eingeschränkt und muss für jede Kultur neu bestimmt werden. Diese Einschränkung kann durch die Auswahl entsprechender Messwiderstände jedoch zumindest teilweise aufgehoben werden.

Durch Veränderungen in den Umweltbedingungen (beispielsweise eine qualitative Änderung im Beleuchtungsspektrum) verändert sich der zelluläre Pigmentapparat unter Umständen stark (Grossman, 2003), was bei Zelldichtemessungen im sichtbaren Spektralbereich zu falschen Messergebnissen führen kann. Durch die Verwendung von optischen Komponenten, die vor allem im nah-infraroten Spektralbereich arbeiten, konnten Absorptionseffekte durch Pigmente vermieden werden und eine verlässlichere Kulturdichtemessung wird, wie bereits von anderen Autoren ausführlich beschrieben (Myers *et al.*, 2013), generell ermöglicht. Zudem wurde durch den Fit einer Logarithmusfunktion an Stelle einer linearen Funktion, wie u.a. von Ribeiro Rodrigues *et al.* (2011) vorgeschlagen, der durch Beschattungseffekte einzelner Zellen bei hohen Zelldichten verringerten Extinktion Rechnung getragen und somit die Genauigkeit der online-Zelldichtenbestimmung optimiert. Die bereits von anderen Autoren beschriebene Problematik der temperaturbedingten Emissionsintensität von LED-Lichtquellen (Sandnes *et al.*, 2006) und der daraus u.U. resultierenden Verfälschung von Messwer-

ten wurde in dieser Arbeit durch Relativmessungen umgangen, indem die gemessenen Extinktionen stets auf einen Blankwert (mit Anzuchtmedium gefüllte Reaktorschale) bezogen wurden.

Es zeigte sich, dass das entwickelte System verlässliche, nicht-invasive Messungen von Kulturdichten über einen breiten Messbereich im laufenden Reaktorbetrieb ermöglicht, welche mit konventionellen, invasiven Spektrometernmessungen gut korrelieren.

Kritisch sei an dieser Stelle die Bezugsgröße der Zelldichte in Zellen pro Milliliter zu hinterfragen, da sich die Größe einzelner Zellen im Kulturverlauf und auch bedingt durch Umwelteinflüsse verändern kann (Lee & Palsson, 1994; Kim *et al.*, 2014). Eine Kalibrierung der online erfassten Extinktionssignale auf gravimetrische Biomasseangaben in Gramm pro (Milli-) Liter Kultursuspension erscheint für zukünftige Anwendungen als robustere Alternative.

6.2.2 Chlorophyllfluoreszenz-Messungen

Generell erlauben Chlorophyllfluoreszenzmessungen eine Aussage, über die momentane Leistungsfähigkeit eines Organismus, einfallende Lichtenergie in photochemischen Prozessen zu verwerten (Baker, 2008). Im Vergleich mit dunkeladaptierten Pflanzen, welche bei optimaler Fotosyntheseleistung Werte von 0,8 für die maximale Quantenausbeute erreichen können, sind diese Werte bei Cyanobakterien weitaus geringer und liegen im Bereich von 0,4 bis 0,6 (Campbell, 1998) oder sogar darunter (Schuurmanns *et al.*, 2015). Ursächlich hierfür ist vor allem, dass die in Cyanobakterien enthaltenen Phycobilline hochgradig fluoreszent sind (Beutler, 2003) und vor allem zur gemessenen Grundfluoreszenz (F_0) beitragen, während die variable Fluoreszenz ausschließlich vom Photosystem II herrührt (Campbell, 1998). Dies erklärt, warum die gemessenen Quantenausbeuten-Werte (siehe Abbildung 5.13) auch bei Versuchskulturen, welche unter keinerlei Mangelsymptomen litten, nie höher als 0,4 lagen. Da zudem die Kulturdichte Einfluss auf das Ergebnis der gemessenen Ausbeuten hat (Ting & Owens, 1992) und vor allem die Varianten, welche unter Mangelbedingungen angezogen wurden, geringe Frischmassegehalte hatten, ist nicht auszuschließen, dass diese geringen Probenmengen (im genutzten Versuchsaufbau) die Ergebnisse verfälscht haben. Der sichtbare Pigmentabbau in einigen Mangelkulturen bei längeren Kultur dauern trug dazu bei, dass einige der Messwerte mit äußerster Vorsicht zu betrachten sind. Ein

ursächlicher Zusammenhang zwischen intrazellulären PHB-Gehalten und gemessenem maximaler photosynthetischer Quantenausbeute war letztlich nicht erkennbar, so dass zumindest reine Effizienzmessungen dunkeladaptierter Kulturen ohne die Aufnahme detaillierterer Kinetiken über längere Messzeiträume nicht sinnvoll erscheinen.

Messungen dieser Kinetiken und deren Verwendung als Vorhersagedaten zur PHB-Bestimmung brachten jedoch auch keine stabilen Ergebnisse, weshalb sie in dieser Arbeit nicht weiter vertieft wurden. Ursächlich für die schlechten Korrelationen zwischen Fluoreszenzdaten und PHB-Gehalten könnten auch bei den Kinetikmessungen die oben genannten geringen Biomasse-mengen in einigen Reaktoren im betrachteten Versuchslauf gewesen sein, Veränderungen in der Zellpigmentierung, sowie eventuell eine nicht auf Cyanobakterien optimierte Auswahl der Anregungswellenlänge gewesen sein. Die (in anderen Versuchen) beobachtete enge Korrelation zwischen Carotinoid- und PHB-Gehalten war in diesem Fall nicht hilfreich, da mögliche Fluoreszenzsignale von Carotinoiden um den Faktor 10^2 bis 10^3 geringer sind als jene der Chlorophylle (Kleinegris *et al.*, 2010) und von diesen maskiert wurden.

Die Nutzung von Chlorophyllfluoreszenz-Messsystemen mit mehrfarbigen Anregungslichtquellen könnte deshalb unter Umständen zu valideren Ergebnissen führen.

Insgesamt seien an dieser Stelle jedoch Schuurmans *et al.* (2015) zitiert:

“Based on the above observations we recommend that PAM measurements in cyanobacteria are interpreted only qualitatively.”

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass eine negative Beeinflussung der Fluoreszenzmessungen durch die Reaktorgefäße durch die Wahl des Versuchssetups minimiert wurde. Wie in Abbildung 6.4 ersichtlich, unterschieden sich Messungen, welche durch die Reaktorschale hindurch geschahen von jenen, welche in einem Versuchsaufbau durchgeführt wurden, in dem keinerlei Plastikmaterial im Strahlengang vorhanden war. Wurden die Messungen jedoch durch die Siegfelfolie realisiert, ergaben sich lediglich Abweichungen, welche im Bereich der Messungenauigkeit lagen.

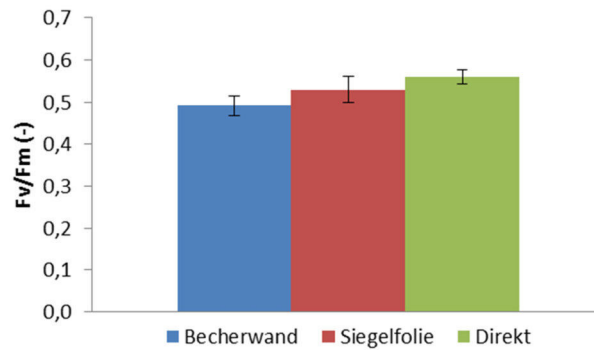


Abbildung 6.4: Ergebnisse von Chlorophyllfluoreszenzmessungen an derselben Kultur von *Chlorella vulgaris*. Die Messungen fanden direkt an der Kultursuspension statt (grün) bzw. durch die Reaktorschale (blau) sowie die Siegelfolie (rot) hindurch. Gezeigt ist jeweils der Quotient aus variabler und maximaler Chlorophyllfluoreszenz der Proben bei Messung nach 30 Minuten Dunkeladaptation. Es wurden je Variante 3 Wiederholungen vermessen.

6.2.3 VIS-Spektroskopie

6.2.3.1 Vergleich von Küvetten- und *In-situ*-VIS-Spektren

Aufgrund der äußerst unterschiedlichen Geometrie der geschlossenen Reaktoren im Vergleich mit Küvetten galt es zu klären, inwiefern im Reaktor aufgenommene Spektren mit solchen, die in Küvetten gemessen wurden, direkt vergleichbar sind. Hierbei zeigte sich, dass Spektren, die in Küvetten aufgenommen wurden höhere Extinktionen zeigten als solche, die direkt im Reaktor gemessen wurden. Dieser Effekt war umso stärker, je näher die Reaktorbehälter an der Detektoröffnung des Spektrometers platziert wurden. Da in den gemessenen Extinktionsspektren neben Absorptionssignalen¹⁸ auch Streulichtverluste enthalten sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass vor allem verschieden hohe Intensitäten dieser Streueffekte zu den beobachteten Unterschieden führten. In der folgenden Abbildung 6.5 ist das bereits in Abbildung 4.5 gezeigte Versuchsetup inklusive vermuteter Wege für Streulichtverluste dargestellt.

¹⁸ Auf eine explizite Zuordnung der beobachteten Extinktionspeaks in den Algensuspensionen, welche auf die Absorption durch Chlorophylle und Carotinoide zurückzuführen ist, sei an dieser Stelle verzichtet, da dies ausführlich für die in späteren Versuchen untersuchten *Nostoc*-Kulturen in Abschnitt 6.2.3.4 geschieht und die zugrunde liegenden Pigmente in weiten Teilen die gleichen sind.

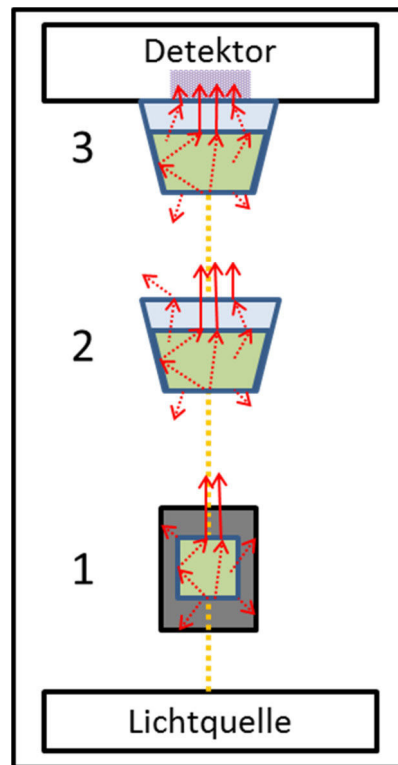


Abbildung 6.5: Übersicht der Probenpositionierung innerhalb des verwendeten Spektrometers bei Durchführung von Extinktionsmessungen in Küvetten (1), in einer Halterung fixierter Reaktorbehälter (2) sowie bei Platzierung der Reaktorgefäße direkt vor der Detektoröffnung (3). In Gelb ist die Richtung des Strahlenganges skizziert, in Rot mögliche Richtungen von Streulichtverlusten.

Wie ersichtlich, ist der Strahlengang bei Durchtritt durch die Küvette sehr eingengt, da hinter der Probe ein Austrittsschlitz in der Küvettenhalterung vorhanden ist, welcher lediglich eine Breite von ca. 5 mm hat. Hierdurch bleibt ein Großteil des Streulichts in der Halterung „gefangen“. Dies betrifft vor allem rück- und seitwärts gestreutes Licht, welches lediglich nach mehrfachen Streuvorgängen wieder in den Detektor gelangen kann. Vorwärts gestreutes Licht ist zu einem geringen Teil betroffen, jedoch dürften auch hiervon Teile in der Küvettenhalterung verbleiben.

Bei Messungen in Reaktorbehältern, welche in mittlerer Position im Spektrometer fixiert wurden (Position 2 in obiger Abbildung 6.5), sind die Extinktionen insgesamt geringer. Vor allem die Betrachtung der in Abbildung 5.14 gezeigten Tusche-Spektren, welche lediglich im blauen Spektralbereich Absorptionsbanden zeigen und vor allem Anstiege zum Kurzwelligen über den gesamten Messbereich zeigen, legen den Schluss nahe, dass dies auf verminderte Streulichtverluste zurückzuführen ist, da Lichtstreuung mit abnehmender Wellenlänge in der Regel zunimmt (Cox *et al.*, 2002). Diese Vermutung wird unterstützt durch die Beobachtung, dass bei einer Platzierung der Probe di-

rekt vor der Detektoröffnung die Signalintensität der Spektren weiter abnimmt. Durch die Detektornähe werden Streulichtverluste minimiert, da auch seitwärts gestreutes Licht nach Reflektion an der Innenseite der Reaktorwände in die als Ulbrichtkugel konzipierte Detektorkammer gelangt. Dieser Einfluss der Probenplatzierung auf die resultierenden Spektren wurde auch von Gaigalas *et al.* (2009) beobachtet, wobei die Autoren zudem eine theoretische Betrachtung und Modellierung der Streulichtverluste in ihrer Arbeit inkludieren.

Durch eine gezielte Auswahl der Probenplatzierung kann somit eine Minimierung von Streulichtverlusten erfolgen und so verhältnismäßig reine Absorptionsspektren aufgenommen werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass auch die in Extinktionsspektren inkludierten Streulichtsignale unter Umständen wertvolle Informationen über die Morphologie der zu vermessenden Probe enthalten können und ihre Eliminierung somit nicht a priori wünschenswert ist (Spear *et al.*, 2009). So hat beispielsweise die Partikelgröße in einer Probe starken Einfluss auf das wellenlängenabhängige Streuverhalten derselben, wodurch starke Streulichtvariation in den Messergebnissen hervorgerufen werden können (Lasch, 2012), welche in extremen Fällen bis zu 99 % der Varianz zwischen verschiedenen Messspektren ausmachen können (Stark *et al.*, 1986).

Die in den Spektren zudem beobachtete relative Verringerung der Extinktionsintensitäten an Extinktionspeaks ist vor allem auf probeninhärente Effekte wie beispielsweise Sieb- und Packungseffekte von Suspensionen vor allem in Bereichen von starker Pigmentabsorption zurückzuführen, welche durch Selbstbeschattung innerhalb der Proben entstehen (Das *et al.*, 1967).

6.2.3.2 Reproduzierbarkeit der *In-situ*-VIS-Spektroskopie

Bei der Durchführung von Extinktionsmessungen sind generell immer leichte Abweichungen zwischen Wiederholungen einzelner Messungen an derselben Probe zu beobachten, welche auf verschiedenste Ursachen zurückzuführen sein können. Um die Stärke dieses Effekts bei Messungen im geschlossenen Reaktorsystem abschätzen zu können wurden Wiederholungsmessungen an derselben Probe durchgeführt und die Abweichungen zwischen den Wiederholungen betrachtet. Die in Abbildung 5.15 und Abbildung 5.16 dargestellten Spektren zeigen, dass diese Abweichungen bei Küvet-

tenmessungen am geringsten sind, während dieser Messfehler bei Messungen direkt im Reaktor auf das Vierfache ansteigen kann.

Generell sind Inhomogenitäten in der Partikelverteilung innerhalb von Suspensionen eine der Hauptursachen für divergierende Ergebnisse bei der wiederholten Vermessung derselben Probe. Ursächlich hierfür ist das Absinken einzelner Zellen innerhalb der Kultursuspension im Laufe der Messungen. Hierdurch kann sich die tatsächliche Partikelkonzentration im Strahlengang der Messlichtquelle über die Zeit ändern und somit gestörte Extinktionsspektren bedingen. Diesem Effekt wurde durch einen Versuchsaufbau mit vertikalem Strahlengang begegnet, in welchem die einzelnen Zellen auch bei Absinken im Strahlengang verbleiben, wodurch Störungen zwar nicht ausgeschlossen, jedoch weitestgehend minimiert wurden.

Auch kann eine nicht komplett akkurat reproduzierte Einbringung der Probengefäße in den Strahlengang zu leichten Messfehlern geführt haben. Während dieser Effekt bei Messungen in Küvetten minimal war, da der Küvettenhalter eine gute Fixierung der Probe garantierte, ist es vor allem der Einfluss dieser Fehlerquelle, der bei Messungen im Reaktorgefäß deutlich wird. Das in Abbildung 5.16 gezeigte Ausreißerspektrum wurde hierfür gezielt erzeugt, um diesen Effekt zu verdeutlichen. So erhöhen sich die gemessenen Extinktionswerte drastisch, wenn die Reaktorbehälter schief in den Strahlengang eingebracht werden und zeigen die eminente Bedeutung einer akkuraten Probenausrichtung für die Durchführung reproduzierbarer Messungen. Bei korrekter Reaktorfixierung im Strahlengang lag der Messfehler in Spektralbereichen mit geringer Extinktion ungefähr bei der doppelten Spannbreite der Küvettenmessungen, was angesichts der bisher nicht gegebenen Standardisierung des entwickelten Reaktorsystems im Vergleich zu kommerziellen Systemen als sehr gut anzusehen ist. Kritisch ist hingegen, dass sich der Fehler in Bereichen starker Absorptionssignale auf das Dreifache des Küvettenwertes erhöht. Die Inhomogenität über den VIS-Bereich ist zwar aufgrund ihrer sehr geringen Intensität bei reinen Extinktionsmessungen in der Praxis vernachlässigbar, gerade jedoch bei der Durchführung polarisationsspektroskopischer Messungen welche (besonders im Fall der CD-Spektroskopie) auf sehr geringen Signalintensitäten beruhen kann dies jedoch zu einer Verzerrung der gemessenen Spektren führen. Wie gesehen gilt dies jedoch auch in geringerem Maße für Messungen in

Küvetten und ist somit kein rein reaktorspezifisches Problem und kann bei korrekter Probenfixierung minimal gehalten werden.

6.2.3.3 PHB-Referenzspektren für den unpolarisierten VIS-Bereich

Anhand der Extinktionsspektren reiner PHB-Suspensionen sollten zunächst jene sichtbaren Spektralbereiche identifiziert werden, in denen PHB eine selektive Absorption aufweist. Bei Betrachtung der in Abbildung 5.17 dargestellten Extinktionsspektren zeigte sich jedoch, dass keinerlei Extinktionspeaks gefunden wurden.

Dies war zu erwarten, da PHB keine konjugierten Doppelbindungssysteme oder andere Molekülstrukturen aufweist, welche eine starke Absorption sichtbaren Lichts ermöglichen. Dass trotz allem eine Konzentrationsabhängigkeit der spektralen Intensitäten beobachtbar war, liegt vor allem am Streuanteil der Extinktionssignale, welcher durch die feinen PHB-Partikel in den vermessenen Suspensionen verursacht wurde. Es zeigte sich in allen Spektren mit Ausnahme der höchsten Konzentrationsstufe ein typischer, zum kurzwelligen Spektralbereich hin leicht ansteigender Extinktionsverlauf, welcher auf eine Kombination von Mie- und Rayleigh-Streuung zurückzuführen sein dürfte. Der PHB-selektive Anteil der Rayleigh-Streuung ist hierbei zweitrangig, da diese vor allem von solchen Partikeln hervorgerufen wird, welche sehr viel kleiner sind als die Größe der Wellenlängen im sichtbaren Spektralbereich. Solche Partikel sind beispielsweise PHB-Monomere, welche in den hergestellten PHB-Suspensionen jedoch nur einen sehr geringen Stoffanteil ausmachen. Den Hauptanteil bilden höhermolekulare PHB-Polymere, welche für Mie-Streueffekte verantwortlich sind. Zwar weist diese Art der Streuung eine geringere Wellenlängenabhängigkeit auf als Rayleigh-Streuung, doch auch sie bedingt leicht zum kurzwelligen Spektralbereich ansteigenden Extinktionswerte (Cox *et al.*, 2002).

Bei Betrachtung der Extinktionsspektren sowie der berechneten Extinktionskoeffizienten (Daten nicht gezeigt) fällt auf, dass sehr hohe Konzentrationen zu abweichenden Ergebnissen führten. Dies ist durch eine Unterschätzung der Extinktion bei hochkonzentrierten Proben bedingt, welche durch Mehrfachstreuung innerhalb der Suspension erklärbar ist (Cox *et al.*, 2002). Dass auch geringe Konzentrationsstufen zu stark abweichenden Extinktionskoeffizienten führten ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Sensitivität des verwendeten Versuchsaufbaus zu gering war, um derart schwach

konzentrierte Suspensionen (welche per bloßem Auge durchsichtig erschienen) quantitativ zu vermessen. Die vorliegenden Ergebnissen legen somit nahe, dass mit dem genutzten Versuchsaufbau ein Konzentrationsbereich von ca. 10 - 250 mg · l⁻¹ verlässlich quantitativ auswertbar ist.

Erschwert werden die Analysen jedoch durch die im Bereich von 550 bis 800 nm auftretenden Wellenmuster in den Extinktionsspektren. Diese sind auf Interferenzeffekte innerhalb der Becher- und Siegelfolien zurückzuführen und können (wenngleich sie sehr geringe Absolutintensitäten aufweisen) gerade bei extrem gering konzentrierten Analyten eine Quantifizierung erschweren. Es zeigte sich jedoch, dass die beobachteten Interferenzsignale und deren probenspezifische Variation derart gering waren, dass sie bei der Vermessung der für diese Arbeit relevanten PHB-Konzentrationsbereiche lediglich als Rauschanteil in den im weiteren Versuchsverlauf erstellten Regressionsmodellen auftauchten.

Im Hinblick auf eine *In-vivo*-Quantifizierung von PHB sei anzumerken, dass intrazelluläres PHB an Enzyme und Biomembranen gebunden vorliegt. In Kombination mit der Tatsache, dass bereits die Zellmembranen und andere Komponenten der untersuchten Organismen Licht streuen, führt dies dazu, dass die an reinem PHB aufgenommenen Extinktionsspektren als Referenz für spätere Quantifizierung direkt im Organismus nicht 1:1 verwendbar sind, da PHB-spezifische Absorptionssignale fehlen und die Streuung der Reinsubstanz sich stark von der in zellulären Organismen unterscheidet. Eine direkte und nicht-invasive Quantifizierung von intrazellulärem PHB im sichtbaren Spektralbereich im geschlossenen Reaktorsystem scheint somit kaum möglich.

6.2.3.4 Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten

Anhand der in Abbildung 5.18 dargestellten Spektren sollen zunächst die ersichtlichen Veränderungen der Rohspektren im Kulturverlauf diskutiert werden. Als „Referenz“ ist hierbei die Variante anzusehen, welche in ES-Medium unter optimalen Kulturbedingungen angezogen wurde. Sichtbar sind hier die Q_Y-Banden des Chlorophylls bei ca. 680 nm und Ausläufer der Soret-Bande bei Wellenlängen unter 450 nm, welche jedoch mit den Absorptionsbanden der intrazellulären Carotinoide überlappen, die bis in den Bereich von 500 nm hineinragen (Canto de Loura *et al.*, 1987). Des Weiteren tragen Phycobilline zur Absorption der Zellen bei, wodurch eine ausgeprägte Bande bei ca.

620 nm zu sehen ist, welcher auf phycocyaninbedingte Absorption zurückzuführen ist, sowie eine erahnbarere Bande bei ca. 560 nm, der auf Absorption durch Phycoerythrin basiert (Ranjitha & Kaushik, 2005). Der in allen Spektren beobachtbare leichte, lineare bis exponentielle Anstieg in den Extinktionswerten im kurzwelligen Wellenlängenbereich ist auf Streueffekte zurückzuführen, welche bei kleinen Partikeln in Suspension stets zu beobachten sind (Merzlyak *et al.*, 2008). Zusätzlich zu den erwähnten spezifischen Absorptionssignalen, sowie der nicht-selektiven, der Mie- und der Rayleigh-Streuung sind in allen gemessenen Extinktionsspektren spezifische Streulichtsignale enthalten. Diese sind wellenlängenabhängige Intensitätsunterschiede der Streulichtanteile, welche in biologischen Systemen an die Absorptionseigenschaften der Pigmente gekoppelt sind und vor allem in langwelliger Nachbarschaft zu Bereichen mit hoher Absorption zu überproportional hoher Lichtstreuung führen (Latimer & Rabinowitch, 1959). Diese selektiven Streulichteinflüsse auf die gemessenen Extinktionsspektren wären zwar mit Hilfe einer Ulbrichtkugel und entsprechenden Versuchssetups zu eliminieren gewesen, jedoch war dies in den durchgeführten Versuchen aufgrund der großen Reaktorgefäßvolumina nicht praktikabel, weshalb in allen Spektren diese nicht weiter aufgeschlüsselten Streulichteffekte enthalten waren.

Bei Versuchsvarianten, welche unter optimalen Kulturbedingungen angezogen wurden, veränderte sich das Aussehen der Extinktionsspektren im Kulturverlauf nur sehr geringfügig, was vor allem durch die Zunahme an Biomasse begründet ist. Bei den Mangelvarianten kam es zu einer verringerten Extinktion im Bereich der roten Chlorophyllbande sowie vor allem im Bereich der phycobillinbedingten Absorptionsmaxima. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Canto de Loura *et al.* (1987), wonach Cyanobakterien unter Stickstoffmangel zum Abbau ebenjener Pigmente neigen, bzw. wonach speziell in *Nostoc muscorum* der Chlorophyllgehalt nur gering variiert, während vor allem Phycocyaningehalte unter Stressbedingungen stark verringert sind (Srivastava, 2010).

Da *Nostoc* die Fähigkeit zur Stickstofffixierung besitzt, welche in speziell differenzierten Heterozysten stattfindet, ist zudem ein morphologischer und physiologischer Umbau der Organismen unter entsprechenden Mangelbedingungen zu erwarten. Bei dieser Umdifferenzierung werden zum einen stark verdickte Zellwände gebildet (Almon & Böhme, 1980), was die Streueigenschaften der Kultursuspension beeinflussen kann.

Zum anderen finden auch Pigmentveränderungen statt, wobei vor allem am Photosystem II verringerte Chlorophyllgehalte und beinahe keine Phycobilline zu messen sind (Almon & Böhme, 1980), wodurch sich auch die Absorptionseigenschaften verändern. Wenngleich das Auftreten von Heterozysten nicht explizit untersucht wurde, dürften sich die optischen Eigenschaften der Kultursuspension auch durch eventuell vermehrt auftretende Heterozysten verändert haben. Abschließend sei auf das Vorkommen von photorezeptiven Pigmenten wie Cyanobacteriochromen hingewiesen, welche zwar in Cyanobakterien weit verbreitet sind und je nach Pigment vom UV-Bereich bis in den roten Spektralbereich an verschiedensten Wellenlängen Licht absorbieren können (Hirose *et al.*, 2016), aufgrund ihrer rezeptiven Funktion jedoch in eher geringem Maße intrazellulär vorkommen und die gemessenen Extinktionsspektren nur minimal beeinflusst haben dürften. Über das genaue quantitative Vorkommen dieser Pigmente unter verschiedenen Anzuchtbedingungen kann jedoch nur gemutmaßt werden, weshalb diese im Folgenden nicht weiter betrachtet werden.

Eine Veränderung in den gemessenen Spektren, welche direkt auf den PHB-Gehalt schließen lässt, war somit nicht erkennbar, vielmehr waren lediglich generelle Stresseffekte und dadurch hervorgerufene Veränderungen der Zellmorphologie sowie im Pigmentapparat der Zellen vorhanden. Dies deckt sich mit den aus den erstellten Regressionsmodellen herausgearbeiteten Ergebnissen, welche im Folgenden diskutiert werden.

Die im ausführlich beschriebenen 4. Versuchsdurchgang erreichte Vorhersagegüte von $3,75 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ist, bei einer insgesamt vorhandenen Bandbreite der im Reaktor vorherrschenden PHB-Konzentrationen von $22,65 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ als annehmbar anzusehen.

Betrachtet man die Einflüsse der verschiedenen Wellenlängenbereiche auf das Regressionsergebnis (Abbildung 5.20), so fällt auf, dass in der ersten Faktorstufe (welche in ihrer Form in etwa dem Mittelwertspektrum aller vermessenen Proben entspricht) vor allem Informationen zu den gemessenen Streulichtanteilen enthalten sind, was sich durch den quasi linearen Anstieg zum kurzwelligen Spektralbereich begründen lässt, welcher charakteristisch für reine Streuung ist (Merzlyak *et al.*, 2008). Der Verlauf der zweiten Faktorstufe ist physiologisch nicht sinnvoll zu erklären, was sich mit der Tatsache deckt, dass die zweite Komponente nur einen geringen Teil der Gesamtvarianz des Datensatzes erfasste (siehe Abbildung 5.20). In den Komponenten drei und vier sind

vor allem jene Regionen effektiv, in denen die intrazellulär vorhandenen Pigmente absorbieren. Für die Komponente 3 ist dies vor allem der Bereich von 470 bis 600 nm, in dem die in *Nostoc* vorhandenen Phycobilline absorbieren (Ranjitha & Kaushik, 2005). Für die Komponenten drei und vier ist zudem der Bereich der Q_Y -Bande des Chlorophylls wichtig, welcher bei 680 nm liegt (Canto de Loura *et al.*, 1987). Nichts desto trotz ermöglichen diese Bereiche keine direkte PHB-Quantifizierung. Die fünfte Faktorstufe trägt hingegen einen größeren Teil zur Varianzbeschreibung bei. Betrachtet man jedoch worauf dieser beruht, so fällt auf, dass vor allem unspezifische Rauschsignale als wichtig für das Regressionsmodell hervorstachen.

Es zeigte sich, dass keine der verwendeten Vorbehandlungsmethoden zu einer Verringerung des Vorhersagefehlers führte. Dies ist insofern schlüssig, da beispielsweise Verfahren zur Grundlinien- oder Streulichtkorrektur eben jene Streulichtanteile eliminieren, die sich als wichtig bei der chemometrischen PHB-Bestimmung erwiesen. Eine detailliertere Erörterung der verschiedenen Vorbehandlungen und ihrer erzielten Effekte findet im folgenden Abschnitt statt.

6.2.3.5 Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im unpolarisierten VIS-Bereich

Bei der kumulativen Betrachtung der einzelnen Versuchsdurchläufe fällt zunächst auf, dass sich die erzielten Kalibrations- und Vorhersagefehler in ihren Absolutwerten voneinander unterscheiden. Dies liegt in den unterschiedlichen PHB-Gehalten begründet, welche in den verschiedenen Versuchsreihen innerhalb der Reaktoren erzielt wurden, und ist somit nicht weiter verwunderlich, da es sich bei den Fehlerwerten um mittlere und nicht um minimale Modellfehler handelt, welche vor allem durch höhere Vorhersagefehler im Bereich sehr geringer und sehr hoher PHB-Konzentrationen (negativ) beeinflusst werden. Während deshalb generell konstatiert werden kann, dass bei insgesamt größeren PHB-Spannbreiten auch die Modellfehler höher liegen, zeigt sich, dass es nach unten eine Begrenzung des mittleren Vorhersagefehlers auf ca. $3,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ gibt (siehe Tabelle 5.5).

Besonders hervorzuheben ist hierbei, dass vor allem zwischen der ersten Versuchsreihe, welche in Quarzküvetten vermessen wurde, und der dritten, welche bei vertikalem Versuchssetup im geschlossenen Reaktor vermessen wurde, und die sich in den Konzentrations-Spannbreiten ähneln, nur geringe Unterschiede in allen Modellparametern

gibt. Dies deutet auf eine Äquivalenz der Güte der gemessenen Spektraldaten hin, welche im geschlossenen Reaktorsystem aufgenommen wurden, zu jenen, welche nach vorher erfolgter Probenentnahme bestimmt wurden.

Während der minimale Vorhersagefehler für einzelne Proben innerhalb der Modelle tatsächlich geringer ist, bedeutet der oben genannte Wert von ca. $3,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ jedoch praktisch die verlässliche Auflösungsgrenze für online detektierbare Konzentrationsunterschiede mittels der verwendeten Kombination aus Reaktor und Messtechnik unabhängig vom betrachteten PHB-Konzentrationsbereich.

Die in Abbildung 5.21 dargestellte Übersicht aller Regressionsmodelle nach Verwendung verschiedener Vorbehandlungen der spektralen Rohdaten zeigt zudem, dass sich dieser Vorhersagefehler nicht wesentlich verringern ließ.

Dass sich durch beinahe alle Vorbehandlungen die Anzahl optimaler Modellfaktoren verringerte, lässt sich durch ihre Funktionsweise einigermaßen schlüssig erklären:

- Die Verfahren zur Grundlinienkorrektur entfernten Intensitätsverschiebungen der gesamten Spektren, welche sonst in den ersten Hauptkomponenten enthalten wären
- Verfahren zur Normierung glichen lediglich die Gesamtintensitäten aller Spektren weitestgehend an, welche wiederum vor allem in den ersten Faktoren enthalten waren. Wie weiter oben beschrieben, war zwar vor allem das Verhältnis der Carotinoide zu den übrigen Pigmenten innerhalb der Zellen für die chemometrische Quantifizierung anhand der VIS-Daten entscheidend, die teilweise beobachtbare Tatsache, dass keine Verringerung des Modellumfangs möglich war zeigt jedoch bereits, dass diese Absolutinformationen zur Quantifizierung notwendig waren. Zudem werden durch Normierungsschritte unter Umständen Spektralbereiche, die nur Rauschen enthalten ähnlich stark bewertet wie jene Bereiche, die chemische Informationen enthalten, wodurch das Signalrauschen überproportional verstärkt wird (Kessler, 2007, S. 183).
- Verfahren zur Streulichtkorrektur entfernten prinzipiell streuungsbedingte Signalanteile, jedoch ging auch hier die Vereinfachung der Modelle zu Lasten der biologischen Plausibilität der Vorhersagen, da auch die durch Lichtstreuung bedingten Extinktionsanteile (wie weiter oben in Abschnitt 6.2.3.4 beschrieben) einen erheblichen Anteil am Gesamtinformationsgehalt der vorliegenden Spektraldaten hatten.
- Zu den Ableitungsverfahren ist analog zu den Grundlinienkorrekturverfahren anzumerken, dass sie unter anderem Grundliniensignale herausfilterten, wodurch der Mo-

dellumfang verringert werden konnte. Jedoch können auch minimale Veränderungen der Pigmentzusammensetzungen, welche in den unbehandelten Extinktionsspektren lediglich als leicht veränderte Extinktionsschultern sichtbar sind und kaum ins Gewicht fallen, in den Ableitungsspektren zu erheblichen Unterschieden führen, da z.B. verschobene Wendepunkte der Originalspektren extrem prononciert werden. In dieser Arbeit wurde zur Berechnung der Ableitungsspektren eine Fensterbreite von 15 Datenpunkten (was 3 Nanometern entsprach) gewählt. Bei Bildung der zweiten Ableitung von Spektraldaten werden aus diesen zwar Steigungen der Originalspektren entfernt, wie sie beispielsweise durch Streulichtsignale auftreten können (Kohler *et al.*, 2007). Dass Ableitungsspektren zweiter Ordnung jedoch Eigenschaften der klassischen Spektrometrie wie die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes sowie der Signaladditivität einzelner Komponenten besitzen (Karpinska, 2012, S. 254), ermöglicht ihre Verwendung zur Erstellung quantitativer Regressionsmodelle. Die Wahl der Fensterbreite hat einen starken Einfluss auf die Form der berechneten Ableitungsspektren, da beispielsweise eine zu weite Fensterbreite für den Polynomfit zu einer Wellenlängenverschiebung sowie zu Intensitätsverfälschungen der kalkulierten Minima und Maxima in Relation zu den Originaldaten führen kann, während durch zu schmale Fenster Rauschanteile in Spektraldaten extrem verstärkt werden (Mark & Workman, 2007, S. 345 ff.). Geringe Verbesserungen der finalen Regressionsmodelle wären u.U. mittels einer Fensterbreitenoptimierung möglich, jedoch wurden hierzu keine weiteren Untersuchungen angestellt. Da zudem aufgrund der breiten Extinktionspeaks wie von Karpinska (2012, S. 255) vorgeschlagen lediglich Ableitungen geringer Ordnung gebildet wurden, ist davon auszugehen, dass die gewählten Parameter der Ableitungsbildung kaum Raum für Optimierungen lassen. Die von einigen Autoren beschriebene pigment-spezifische Prononciierung von Absorptionsmaxima durch die Bildung von Ableitungsspektren vierter Ordnung (z.B. Millie *et al.*, 1997, Aguirre-Gomez *et al.*, 2001 oder Barsanti *et al.*, 2007) erbrachte in Voruntersuchungen keine verbesserten Vorhersagegüten im Vergleich zu anderen Methoden. Da zudem methodeninhärent auch geringe Rauschanteile der Originalspektren immer stärker in Erscheinung treten (Yeow *et al.*, 2005) wurden keine höheren Ableitungen der Spektren gebildet.

Betrachtet man nun die Vorhersagefehler jener Modelle, welche anhand der vorbehandelten Daten erstellt wurden, so fällt vor allem auf, dass die einzelnen Methoden

zu äußerst inkonsistenten Ergebnisse führten. Gemeinsam ist ihnen lediglich, dass alle Methoden insgesamt zu einer Verschlechterung der PHB-Vorhersage führten. Wie oben anhand der Diskussion der Modellumfänge ausgeführt, wurden oft elementare Bestandteile der spektralen Rohdaten (Absolutintensitäten, Streulichtanteile, etc.) entfernt, wodurch zwar die Robustheit der Modelle zunahm, gleichzeitig jedoch zur Vorhersage notwendige Informationen verloren gingen. Für den sichtbaren Spektralbereich ist somit zu konstatieren, dass eine Vorbehandlung der Spektraldaten nicht notwendig bzw. sogar nicht empfehlenswert ist.

Da (wie in Abschnitt 6.2.3.4 beschrieben) lediglich eine indirekte Quantifizierung der PHB-Gehalte anhand der Daten des sichtbaren Spektralbereiches erfolgte, ist die Tatsache, dass einzelne Versuchsreihen unterschiedlich auf dieselben Vorbehandlungen reagierten, zum einen dahingehend zu erklären, dass die Varianz innerhalb der Spektraldaten nicht in allen Versuchsdurchläufen homogen war (was durch die unterschiedlichen Anzuchtbedingungen und die dadurch hervorgerufenen differierenden physiologischen Zellzustände schlüssig begründbar ist). Letztendlich dürfte jedoch gerade der fehlende direkte Zusammenhang zwischen PHB-Gehalten und Extinktionsspektren der Suspensionen zu den chaotisch anmutenden Veränderungen der Vorhersagefehler geführt haben. Es lässt sich somit sagen, dass im sichtbaren Spektralbereich (wenn überhaupt) eine indirekte und unsichere PHB-Vorhersage aufgrund der variierenden Zellpigmentierung erfolgte, jedoch kein spezifischer PHB-Nachweis im geschlossenen Reaktor möglich war.

Insgesamt zeigte sich in den Versuchen, dass direkt im geschlossenen Reaktor qualitativ hochwertige VIS-Spektren aufgenommen werden konnten, die eine große Bandbreite physiologischer Zellzustände verlässlich abbildeten und diese Technik somit durchaus zur Anwendung im geschlossenen Reaktor geeignet ist.

6.2.4 NIR-Spektroskopie

6.2.4.1 Vergleich von Küvetten- und *In-situ*-NIR-Spektren

Bei Betrachtung des in Abbildung 5.22 dargestellten NIR-Bereiches zeigt sich erneut ein globaler Anstieg der Signalintensität zum Kurzwelligen. Auch dieser ist auf Streulichtverluste zurückzuführen, wobei deren Intensitäten analog zum sichtbaren Spektralbereich in Küvetten am stärksten ausgeprägt waren und vor allem bei einer Probenplat-

zierung direkt vor der Detektoröffnung minimal werden. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind dabei dieselben, wie bereits für den VIS-Bereich beschrieben.

Auffällig sind die sehr undifferenzierten Gesamtspektren, welche kaum spektrale Signaturen aufweisen. Die in den *In-situ*-Spektren schwach sichtbaren Signalabschwächungen bei ca. 980 und 1160 nm sind höchst wahrscheinlich auf Eigenabsorptionen des Reaktormaterials zurückzuführen, welche im Zuge der Blindwertbereinigung auch aus den gemessenen Spektren subtrahiert wurden. Dass diese Signale überhaupt sichtbar sind deutet leider auf eine nicht zu 100 % gegebene Homogenität der Reaktormaterialien hin, welche damit durchaus *in situ* aufgenommene Spektren verfälschen können.

Insgesamt ist zu konstatieren, dass direkt im geschlossenen Reaktorsystem aufgenommene Spektren zwar nicht dieselben Verläufe zeigen wie Referenzmessungen in Küvetten, die messbaren Spektren jedoch von guter Qualität sind und für phototrophe Organismen charakteristische Extinktionspeaks und -banden vor allem im sichtbaren Spektralbereich sauber detektiert werden können.

6.2.4.2 Reproduzierbarkeit der *In-situ*-NIR-Spektroskopie

Im NIR-Bereich (Abbildung 5.23 und Abbildung 5.24) liegt der Messfehler bei den durchgeführten *In-situ*-Messungen in Reaktoren in derselben Größenordnung wie bei der Verwendung von Küvetten, was als sehr gut zu bewerten ist. Zur Vermeidung von Dopplungen sei an dieser Stelle für eine weitere Diskussion zur Reproduzierbarkeit der durchgeführten *In-situ*-Messungen auf Diskussionsabschnitt 6.2.3.2 der VIS-Messungen verwiesen.

6.2.4.3 PHB-Referenzspektren für den unpolarisierten NIR-Bereich

Wie in Abbildung 5.25 erkennbar, zeigten sich in den aufgenommenen Extinktionspektren klare Konzentrationsabhängigkeiten in den Messsignalen. Wie zu erwarten, zeigen alle Spektren einen Anstieg der Extinktion, je kurzwelliger der NIR-Bereich ist. Dieser ist vor allem durch Streueffekte an den PHB-Mikrokristallen zu erklären (Klein, 2012, S. 49). Zusätzlich zeigten sich bei PHB-Konzentrationen ab 250 mg pro Liter visuell erkennbare Extinktionssignale im Bereich von 1150 bis 1190 Nanometern. Nach Abzug der beinahe linear verlaufenden Streusignale ist das übrig bleibende Doppelpeakmuster in den Spektren relativ engbandig und resultiert aus Obertonschwingun-

gen der Carbonylgruppen von PHB, welche im Bereich von 1140 bis 1170 Nanometern liegen, sowie aus zusätzlich auftretenden Streckschwingungen zweiter Ordnung der Methylgruppen, welche bei ca. 1190 nm auftreten (Workman & Weyer, 2008, S. 98). Die lediglich bei der höchsten Konzentration auftretende Bande zwischen 940 und 980 nm ist nicht eindeutig zuzuordnen, da in diesem Wellenlängenbereich Signale der zweiten Obertonschwingungen von O-H-Bindungen auftreten (Workman & Weyer, 2008, S. 98), welche in PHB-Monomeren durchaus vorhanden sind, in teilkristallinen bzw. polymerisierten PHB-Verbindungen jedoch nicht existieren.

Vor allem die (bei höheren Konzentrationen) direkt sichtbaren Signale im Bereich von 1150 bis 1190 nm sollten somit eindeutig auf PHB-bedingte Absorptionswirkungen zurückzuführen sein und noch auch bei geringeren Konzentrationen mittels chemometrischer Verfahren separierbar sein. Als Konsequenz ist zu erwarten, dass diesen Wellenlängenbereichen bei den erstellten und im nachfolgenden Kapitel diskutierten Vorhersagemodellen zur nicht-invasiven PHB-Bestimmung eine erhöhte Bedeutung für die PHB-Quantifizierung zukommt.

6.2.4.4 Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten

Im Gegensatz zu jenen Spektren, welche im sichtbaren Spektralbereich aufgenommen wurden und in welchen vor allem pigmentbedingte Absorptionsmuster erkennbar sind, sind alle aufgenommenen NIR-Spektren durch zwei ausgeprägte und sehr breite Wasser-Absorptionsbanden dominiert. Die extreme Breite der Wasserbanden resultiert aus der hohen Polarität der einzelnen Wassermoleküle, welche zur Ausbildung starker Wasserstoffbrückenbindungen führt. Durch diese „kleben“ die einzelnen Moleküle derart stark aneinander, dass Schwingungen der Bindungen einzelner Moleküle sich stets auch auf benachbarte Wassermoleküle auswirken¹⁹. Letztlich entsteht eine durch Kombinationen aus Obertönen von symmetrischen und asymmetrischen Streck-schwingungen bedingte Bande bei ca. 980 nm sowie eine durch Kombinationen von symmetrischen und asymmetrischen Streck-schwingungen sowie Deformationsschwingungen hervorgerufene Bande bei ca. 1180 nm (Workman & Weyer, 2008, S. 64).

¹⁹ Ob hierzu für Wasser als Strukturtheorie das Mischungs- oder das Kontinuums-Modell zugrunde gelegt wird, soll an dieser Stelle aufgrund fehlender Relevanz für die weiteren Diskussionsabschnitte nicht weiter erörtert werden. Für eine einführende Beschreibung der verschiedenen Theorien sei auf Geiseler und Seidel (1977, S. 177 ff.) verwiesen.

Zwar ist die genaue Form und Lage dieser Banden temperaturabhängig (Souza Da Fonseca Ramos, 2005, S. 149 f.), wodurch sich bei inkonsistenten Messbedingungen Messfehler ergeben können, praktisch wurden in den durchgeführten Versuchen jedoch stets alle Proben bei nahezu gleichen Raumtemperaturen vermessen, so dass Bandenverschiebungen oder andere Temperatureffekte vernachlässigbar waren. Da eine gegenseitige Beeinflussung von Wasser- und (intrazellulären) Molekülschwingungen zum einen nicht auszuschließen war und zum anderen möglichst originäre Spektraldaten für die chemometrische Auswertung verwendet werden sollten, wurde auf eine Entfernung der wasserbedingten Absorptionen aus den Messspektren verzichtet.

Hierdurch wurden die wasserbedingten Absorptionsintensitäten mit in die PLS-Modelle integriert, wodurch evtl. vorhandene geringe Unterschiede in den Kulturvolumina (z.B. durch ungenaue Befüllung der Reaktorgefäße hervorgerufen) detektiert und rausgerechnet werden konnten.

Während sich (wie in Abbildung 5.26 ersichtlich) visuell keine interpretierbaren Unterschiede innerhalb der Rohspektren erkennen lassen, wurden Unterschiede in den NIR-Spektren mittels der chemometrischen Auswertungen hingegen ersichtlich.

So zeigen sich (wie in Abbildung 5.28 dargestellt) in den PLS-Modellen der Rohspektren dann auch die ersten Faktorstufen stark vom Hintergrundspektrum des wässrigen Kulturmediums dominiert, jedoch haben diese Faktoren einen sehr geringen Einfluss auf die chemometrische PHB-Quantifizierung, was sich mit den Erwartungen an diese Kombination aus Messtechnik und Regression deckt, da das Medium zwar ein starkes aber zugleich auch konstantes Hintergrundsignal liefert. Die in der zweiten Faktorstufe relevanten Bereiche decken sich mit der Eigenabsorption der Reaktormaterialien, welche für Polypropylen um 1150 und 1220 nm liegen (Furukawa *et al.*, 2002), jedoch leisteten auch diese Signale analog zur Wasserabsorption keinen Beitrag zur PHB-Vorhersage. In höheren Faktorstufen zeigten sich jene Wellenlängenbereiche als regressionsrelevant, die auch bei der Vermessung der PHB-Konzentrationsreihen als wichtig für die Quantifizierung identifiziert wurden. So hatte vor allem der Bereich von 1140 bis 1200 nm entscheidenden Einfluss auf die Quantifizierung mittels PLS. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, liegen hier Obertonschwingungen der Carbonylgruppen von PHB (im Bereich von 1140 bis 1170 Nanometern), sowie zusätz-

lich auftretende Streckschwingungen zweiter Ordnung der Methylgruppen, welche bei ca. 1190 nm auftreten (Workman & Weyer, 2008, S. 98).

Die im ausführlich beschriebenen 4. Versuchsdurchgang erreichte Vorhersagegüte von ca. $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ anhand der NIR-Rohspektren ist, bei einer insgesamt vorhandenen Bandbreite der im Reaktor vorherrschenden PHB-Konzentrationen von $22,65 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ als schlecht anzusehen.

Eine detailliertere Erörterung der verschiedenen Vorbehandlungen und ihrer erzielten Effekte findet im folgenden Abschnitt statt.

6.2.4.5 Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im unpolarisierten NIR-Bereich

Bei der Betrachtung multipler Regressionsmodelle im NIR-Bereich zeigt sich, dass zwar Messungen in Quarzküvetten die besten Ergebnisse ergaben, jedoch zeigt vor allem der dritte Versuchslauf, dass auch Messungen im geschlossenen Reaktor prinzipiell nur eine minimale Verschlechterung brachten. Demgegenüber fiel jedoch die vierte Versuchsreihe ab, mit einem um fast 65 % erhöhten Vorhersagefehler. Dies schlüssig zu begründen ist schwierig und deutet auf Probleme bei der Aufnahme der Spektraldaten hin, die jedoch nicht identifiziert werden konnten. Die Anwendung verschiedener Datenvorbehandlungsmethoden zeigte demgegenüber ein recht konsistentes Verhalten über alle Messreihen.

- So führten Verfahren zur Grundlinienkorrektur zu keinen Verbesserungen, was insofern schlüssig ist, als die Intensität der Gesamtspektren Informationen über Füllstand und tatsächliche Extinktion der Kultursuspension enthalten und deren Variabilität zudem in der ersten Modellkomponente abgebildet wird.

- Bei den Normierungsverfahren zeigte sich in allen Versuchsläufen, dass eine Einheitsvektornormierung vorteilhaft ist. Dem gegenüber brachte eine Flächennormierung keinerlei Verbesserung. Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass die Einheitsvektornormierung auf einer separaten Neuskalierung jedes einzelnen Spektrums ohne Einbeziehung weiterer Messspektren beruht, wodurch sie eine kaum verzerrte Spektrenge-samtheit produziert und somit globaler anwendbar ist als andere Normierungsverfahren, welche stets alle Messspektren verrechnen.

- Bei den Verfahren zur Streulichtkorrektur zeigte ein Detrending mit Polynomen zweiter Ordnung gute Ergebnisse. Demgegenüber hatten SNV und MSC eher Verschlechterte-

rungen zur Folge, was zumindest für die multiplikative Streulichtkorrektur dadurch zu erklären ist, dass sie am besten bei Gruppen ähnlicher Spektren optimal funktioniert, in den durchgeführten Versuchen jedoch aufgrund der verschiedenen Zellmorphologien Unterschiede im Streulichtanteil zu inhomogenen Spektrengruppen geführt haben. Da die gewählten Kulturbedingungen jedoch notwendig waren um unterschiedliche intrazelluläre PHB-Gehalte zu erzeugen und aufgrund der nicht-Invasivität der Messungen (außer makroskopisch durch Homogenisierung per Schütteln) nicht beeinflusst werden konnten, ist dies ein Faktor, der die Genauigkeit der PHB-Bestimmung mittels NIR-Spektroskopie beschränkt haben dürfte. Insgesamt war eine Entfernung von Streulichtanteilen vor der Erstellung chemometrischer Modelle in dieser Arbeit nicht vorteilhaft.

- Ableitungsspektren als Modellgrundlage führten zu sehr inhomogenen Effekten, mit teilweisen Verbesserungen, aber auch Verschlechterungen der Modellfehler, was sowohl die Modellkalibrierung als auch die -validierung betraf. Diese inhomogene Wirkung ist nicht schlüssig zu erklären, da die Nutzung von Ableitungsspektren in der NIR-Spektroskopie aufgrund ihrer separierenden Wirkung überlappender peaks weit verbreitet ist (Brereton, 2007, S. 138 ff.) und sich dieser positive Nutzen auch in den durchgeführten PLS-Berechnungen zeigen sollte. Anscheinend wirkte der verwendete PLS-Algorithmus bereits gut genug, um diese Auslösung relevanter Informationsbereiche aus den Vollspektren zu vollziehen. Zwar wurden (wie bereits im VIS-Teil beschrieben) aufgrund der Struktur der Spektraldaten lediglich Ableitungen geringer Ordnung gebildet, jedoch ist davon auszugehen, dass die gewählten Parameter auch im NIR kaum Raum für Optimierungen lassen.

Eine allgemeingültige Empfehlung einer optimalen Datenvorbehandlung anhand des oben Beschriebenen ist schwierig, da wie bereits von anderen Autoren gezeigt wurde (z.B. Challagulla *et al.*, 2014), sich die resultierenden Effekte derselben Vorbehandlung auf verschiedene Spektraldatensätze durchaus unterscheiden können. Analog zum sichtbaren Spektralbereich scheint auch im NIR die Nutzung von unprozessierten Rohspektren zur Erstellung chemometrischer Modelle optimal zu sein.

Wie bereits in anderen Abschnitten erwähnt, gab es durch den Versuchsaufbau bedingte Fehlerquellen, welche die gemessenen Spektren beeinflusst haben könnten:

- Inhomogene Befüllung der Reaktorgefäße und daraus resultierende Unterschiede in den vermessenen Kultur-Schichtdicken. Dies wurde durch exaktes Arbeiten jedoch so gut wie ausgeschlossen. Zudem sollte dieser Effekt in den erstellten Modellen als nicht für die PHB-Quantifizierung relevanter Signalanteil in den niederen Faktoren eliminiert werden.

- Inhomogene Zellagglomerate. Wie oben genannt, ist dies eine mögliche Fehlerquelle wenn es darum geht, Spektren von gesunden Kulturen und solche, die unter Mangelbedingungen angezogen wurden und demnach unter Umständen ihre Morphologie verändert haben, direkt zu vergleichen. Wie gesagt war dieser Fehler nicht zu eliminieren. Er könnte jedoch durch NIR-Messungen in Integrationssphären, in denen Streulichtverluste minimiert werden, in künftigen Messungen umgangen werden.

- Beeinflussung der Messergebnisse durch gerätebedingte Drift innerhalb der Strahlungsstärke der Messlichtquelle. Dies ist durch Aufwärmen des Spektrometers vor den Messungen sowie konstante Umgebungsbedingungen als vernachlässigbar anzusehen. Sicherlich wäre durch Messungen im langwelligeren NIR-Bereich vermutlich eine noch stoffspezifischere und genauere PHB-Quantifizierung möglich, jedoch steigt die Eigenabsorption von Wasser von 1300 nm auf 1400 nm ca. um den Faktor 20 an (Curcio & Petty, 1951), so dass eine Ausweitung des Messbereiches, wenngleich wünschenswert, bei den im Reaktorsystem vorherrschenden großen Schichtdicken der zu vermessenden Kultursuspension nicht möglich ist. Zwar sind so aufgrund der komplexen Probenzusammensetzung Überlappungen mit Signalen anderer Metabolite nicht auszuschließen, jedoch lässt sich konstatieren, dass im NIR-Bereich eine (zumindest grundsätzlich) selektive PHB-Quantifizierung stattfand.

Aufgrund der starken Signalanteile der Kulturmedien im Vergleich zu jenen der zellulären Suspensionsanteile sowie aufgrund der oben genannten Erkenntnisse lässt sich konstatieren, dass die Anwendung NIR-spektroskopischer Techniken im geschlossenen Reaktor prinzipiell durchaus möglich ist, jedoch starke Einschränkungen im nutzbaren Wellenlängenbereich bestehen und zudem eine höhere Fehleranfälligkeit im Vergleich zu VIS-Messungen oder NIR-Messungen an getrockneten Proben besteht. Wie in der Arbeit von Brown *et al.* (2014) konstatiert, wiesen generell Modelle, welche anhand von Reflexionsspektren getrockneter bzw. leicht wässriger Proben aufgenommen wurden geringere Vorhersagefehler auf als solche, die anhand von Transmissionsmessun-

gen an Suspensionen generiert wurden. Wenngleich dies nicht mit dem Anspruch dieser Arbeit vereinbar ist, nicht invasive Messungen *in situ* durchzuführen, so ist dies zumindest ein Ansatz zur Verbesserung der Vorhersagen für weitere Arbeiten.

6.2.5 VIS-Polarisationspektroskopie

Nachfolgend werden alle Ergebnisse der Messungen diskutiert, welche unter Verwendung polarisierter Messstrahlung im sichtbaren Spektralbereich erzielt wurden. Da oftmals dieselben oder vergleichbare Effekte und Ergebnisse vorliegen, welche auch schon für den unpolarisierten VIS-Bereich besprochen wurden, wird in diesem Abschnitt vermehrt auf entsprechende Textstellen von Abschnitt 6.2.3 verwiesen.

6.2.5.1 Polarisationsabhängiges Absorptionsverhalten der Polymermaterialien im sichtbaren Spektralbereich

Wie in Abbildung 5.30 ersichtlich, ist unter kreuzpolarisierten Filtern keine Transmission der Lichtquelle sichtbar. Gleiches gilt bei Einbringung von Glasmaterialien, welche den Polarisationszustand nicht verändern. Werden jedoch verschiedene Plastikmaterialien zwischen die gekreuzten Filter eingebracht, so ist aufgrund unterschiedlich stark ausgeprägter Doppelbrechungen transmittierte Strahlung sichtbar. Durch die sichtbaren Farben, welche auf Interferenzen innerhalb der Materialien beruhen, ist auf eine wellenlängenabhängige Phasenverschiebung des transmittierten Lichts zu schließen. Diese wellenlängenabhängige Phasenverschiebung resultiert aus verschiedenen Ausbreitungsgeschwindigkeiten von ordentlichen und außerordentlichen Lichtstrahlen innerhalb von doppelbrechenden Materialien. Dieser Effekt ist direkt von der Schichtdicke des zu untersuchenden Materials abhängig, was in der folgenden Abbildung 6.6 anhand von mehrlagigem Tesafilm dargestellt ist.

Wie zu erkennen, wirken sich die polarisationsmodulierenden Effekte additiv aus, wodurch mit zunehmender Schichtdicke die Stärke der Beeinflussung zunimmt. Während in der gezeigten Darstellung lediglich die Schichtdicke ausschlaggebend für die unterschiedlichen zu beobachtenden Färbungen ist, wirken bei den verwendeten Polymeren zusätzlich deren Materialeigenschaften mit ein.

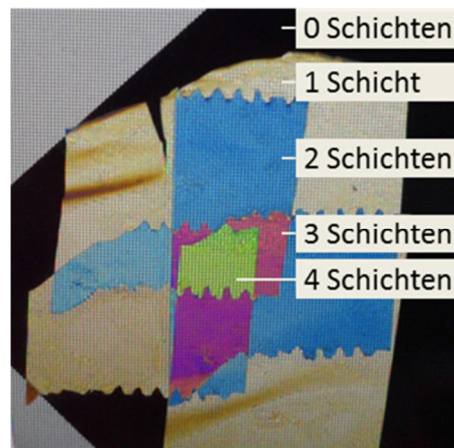


Abbildung 6.6: Mehrere Lagen Tesafilm unter gekreuzten Polarisationsfiltern. Die Filter sind als schwarze Fläche sichtbar, die farbigen Flächen zeigen das (in mehreren teilweise überlappenden Schichten) zwischen die Filter eingebrachte Tesafilm. Erkennbar ist der additiv wirkende, schichtdickenabhängige Materialeinfluss des Tesafilms auf die Ursprungspolarisation.

Zur Abschätzung des doppelbrechenden Potenzials der verwendeten Polymere ist in der folgenden Abbildung 6.7 ein Raith-Sørensen Diagramm gezeigt anhand dessen die beobachteten Interferenzeffekte quantitativ eingeordnet werden sollen. Wie im Diagramm ersichtlich, ist das Auftreten verschiedener Färbungen unter Kreuzpolarisation vom materialinhärenten doppelbrechenden Potenzial der Polymere abhängig.

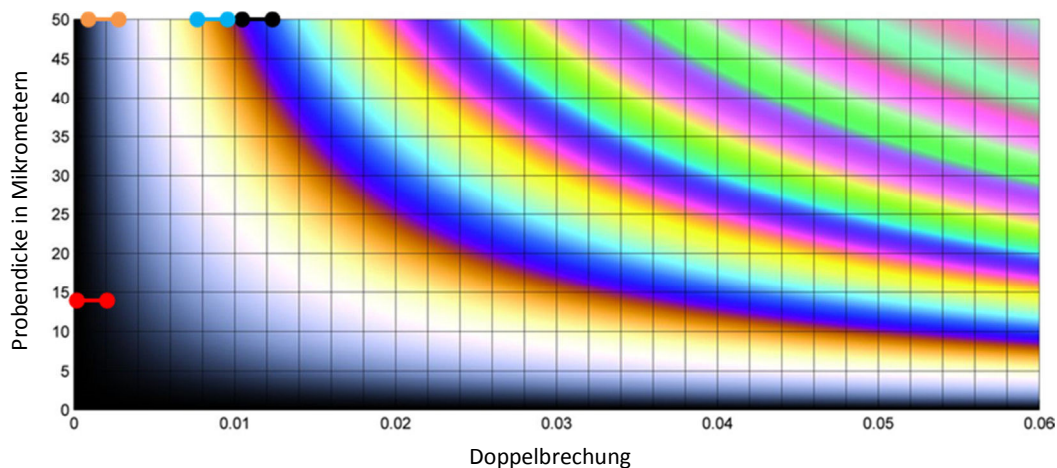


Abbildung 6.7: Raith-Sørensen Diagramm zur direkten Darstellung von Interferenzmusterfarben in Abhängigkeit von Doppelbrechung und Probendicke (Quelle: Nach Sørensen, 2013). Die Doppelbrechung entspricht hierbei der Differenz der Brechungsindizes von ordentlichem und außerordentlichem Lichtstrahl. Eingezeichnet sind ungefähre Einordnungen der Polymermaterialien anhand ihrer unter Kreuzpolarisation bestimmten Färbung. Orange: Flachfolie OPP/PEM 2/50; Türkis: Vario-Seal HB 64 PP AF; Schwarz: Vario-Seal Mikroperforiert; Rot: MRX 2145 & Adhäsionsfolie. Zu beachten ist, dass einige Folienmaterialien eine größere Schichtdicke als 50 μm aufwiesen und deshalb außerhalb der Skala lägen, zur generellen Beurteilung ihrer Eigenschaften aber bei 50 μm Schichtdicke eingezeichnet wurden. Die Reaktorbecher konnten aufgrund ihrer hohen Schichtdicken nicht eingezeichnet werden, lägen aber am linken Bildrand.

Unter Zuhilfenahme eines Michel-Lévy-Diagramms, welches in Abbildung 6.8 dargestellt ist, lässt sich auf die resultierende Änderung der Richtung des elektrischen Feldvektors schließen und somit eine Aussage über den Polarisationszustand der originär zirkular polarisierten Strahlung nach Durchtritt der verschiedenen Materialien treffen.

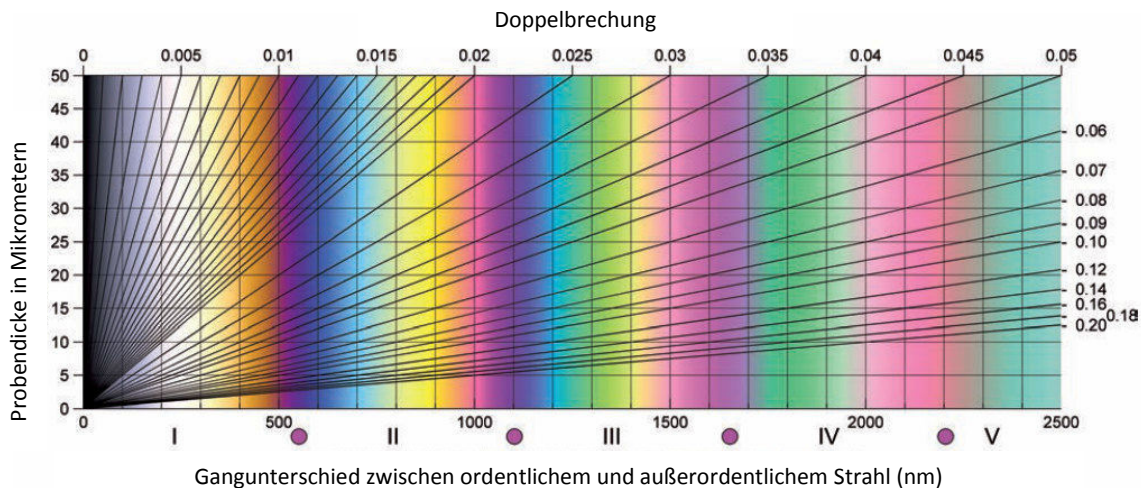


Abbildung 6.8: Berechnetes Michel-Lévy-Diagramm anhand dessen aufgrund der Materialdicke und der beobachtbaren Lichtfarbe nach Probendurchtritt des weißen Messlichts auf die induzierte Drehung des elektrischen Feldvektors geschlossen werden kann. Die lila eingezeichneten Punkte unterhalb des Diagramms markieren Gangunterschiede (des Vielfachens) einer kompletten Wellenlänge und entsprechen einer Drehung der Polarisationsrichtung um jeweils 360° (Quelle: Sørensen, 2013).

Da die beobachtbaren Farben direkt von der Schichtdicke des untersuchten Materials abhängen, einige der verwendeten Materialien jedoch dicker waren als die im Diagramm maximal aufgeführten $50 \mu\text{m}$, sind die im Folgenden angenommenen Drehungen der Polarisationsrichtung lediglich bestmögliche Näherungen! Die tatsächlichen Polarisationszustände können sich somit (gerade bei Materialien mit einer Dicke größer als $50 \mu\text{m}$) von den hier deduzierten unterscheiden. In der folgenden Tabelle 6.1 sind die hergeleiteten Polarisationszustände je Material aufgeführt.

Tabelle 6.1: Anhand der unter gekreuzten Polfiltern beobachteten Interferenzfarben verschiedener Polymermaterialien hergeleitete Polarisationszustände von originär zirkular polarisierter Strahlung nach Durchtritt durch ebenjene Polymere. Die Werte sind bestmögliche Näherungen, Abweichungen zu tatsächlich vorherrschenden Polarisationszuständen sind möglich.

Betrachtetes Material	Dicke (μm)	Beobachtete Farbe unter Kreuzpolarisation	Angenommenes Doppelbrechungspotenzial ($\Delta n = n_{ao} - n_o$) ²⁰	Vermutete Phasenverschiebung zwischen den Wellenfronten (nm)	Deduzierter resultierender Polarisationszustand
Becherboden	250 ± 10	dunkelblau	ca. 0,010	$\pm 4/5 \lambda$	Elliptisch, nahe zirkular
Vario-Seal HB 64 PP AF	64	orange	0,012	$\pm 6/5 \lambda$	Elliptisch, nahe zirkular
MRX-Folie & Adhäsionsfolie	14	schwarz	0,001	$\pm 1/20 \lambda$	Beinahe originär zirkular

Wie anhand der obigen Tabelle aufgeführt, dürfte zirkular polarisierte Strahlung nach Durchdringung des Bechermaterials sowie der Vario-Seal HB 64 PP AF Folie weniger leicht veränderte Polarisationsseigenschaften haben. Dem zirkularen Ausgangszustand am nächsten kommt Strahlung, welche MRX oder Adhäsionsfolien passiert hat, womit diese Materialien für polarisationsspektroskopische Anwendungen als optimal erscheinen. Leider waren diese Materialien nicht verlässlich siegelfähig, so dass trotz alledem Polarisationsmessungen durch den Becherboden durchgeführt wurden. Dadurch wurde zwar das potenziell vorhandene CD-Spektrum in seiner Intensität beeinflusst (da nur bei exakter, relativer 90° Verschiebung der links- und rechtsdrehenden Strahlung der maximale CD gemessen werden kann), jedoch sollte auch leicht elliptisch polarisiertes Licht als Messstrahlung in differentieller Absorption resultieren. Während die äußeren Bereich des Reaktorschalenbodens zudem inhomogene Doppelbrechung über die gesamte Fläche zeigten, war das Maß der Doppelbrechung im zentralen Bereich als relativ konstant anzusehen, weshalb die spektroskopischen Messungen stets durch den Mittelpunkt der Bodenfläche stattfanden. Obgleich sich der Brechungsindex außerhalb von Absorptionsbanden nur gering verändert (Larena & Pinto, 1992), sind kurzwellige Spektralbereiche stärker betroffen als langwellige, und da das Ausmaß der beobachteten Doppelbrechung zudem wellenlängenabhängig ist, ist der

²⁰ An dieser Stelle ist Die Differenz der außerordentlichen (n_{ao}) und der ordentlichen (n_o) Brechungsindizes das Maß für die Stärke der Doppelbrechung innerhalb der Materialien.

angegebene Polarisationszustand lediglich eine grobe Näherung über den gesamten Spektralbereich.

Ein Einfluss auf den Polarisationsgrad innerhalb der Reaktoren, bedingt durch die optischen Eigenschaften der verwendeten Materialien ist somit gegeben, wenngleich die absolute Einflusstärke nicht abschließend bestimmt werden konnte. Dieser Effekt ist dabei den verwendeten Materialien inhärent und konnte deshalb nicht eliminiert werden.

6.2.5.2 PHB-Referenzspektren für den polarisierten VIS-Bereich

Wie in Abbildung 5.33 ersichtlich, zeigte sich kein verlässlicher Zusammenhang zwischen den Konzentrationen in reinen PHB-Suspensionen und den jeweiligen CD-Spektren. In den mittels links- sowie rechtsdrehend zirkular polarisierter Strahlung aufgenommenen Spektren (Abbildung 5.31 und Abbildung 5.32) ist dieser Zusammenhang lediglich ansatzweise gegeben, wobei einzelne Konzentrationsstufen aus der Reihe fallen. Dies lässt vermuten, dass polarisationssensitive PHB-Quantifizierungen im VIS-Bereich nicht sehr verlässlich sind. Da wie in Abbildung 5.31 und Abbildung 5.32 ersichtlich, keine distinkten Extinktionsmuster erkennbar sind, ist die konzentrationsabhängige Signalintensität der Messspektren vermutlich auf Streueffekte an PHB-Partikeln zurückzuführen (vgl. Abschnitt 6.2.3.3). Diese Streueffekte sollten aufgrund der Chiralität der PHB-Moleküle zwar polarisationsspezifische Intensitätsunterschiede zeigen, tatsächlich jedoch war dies in den berechneten CD-Spektren (Abbildung 5.33) nicht der Fall, vielmehr schwankten diese Spektren vor allem um den Nullwert.

Analog zu unpolarisierten VIS-Messungen reiner PHB-Suspensionen scheint eine direkte und nicht-invasive Quantifizierung von intrazellulärem PHB im sichtbaren Spektralbereich im geschlossenen Reaktorsystem auch bei der Verwendung polarisierter Messstrahlung kaum möglich.

6.2.5.3 Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten

Wie bereits im Diskussionsabschnitt zum unpolarisierten VIS-Bereich genannt, sind die beobachteten Extinktionsbanden in den Cyanobakterienspektren auf Pigmente wie Chlorophylle (680 sowie 450 nm), Carotinoide (bis 500 nm) und Phycobilline (560 und 620 nm) zurückzuführen (vergleiche Abschnitt 6.2.3.4). Der auch in diesen Spektren beobachtbare Anstieg in den Extinktionswerten im kurzwelligen Wellenlängenbereich

ist auch in den Polarisationspektren auf Streueffekte zurückzuführen. Für eine Erklärung der veränderten Spektralverläufe bei unterschiedlichen Anzuchtbedingungen sei ebenso auf Abschnitt 6.2.3.4 verwiesen. Abweichend zu den o.g. Diskussionspunkten, welche auch für unpolarisiertes Licht gelten, kommen bei der Verwendung polarisierter Messstrahlung jedoch weitere Effekte hinzu, welche anhand der CD-Spektren aus Abschnitt 5.2.5.3 diskutiert werden sollen. So ist grundlegend für die beobachtete differentielle Absorption links- und rechtsdrehend polarisierter Strahlung die Tatsache, dass es sich bei Photosynthesepigmenten um optisch aktive Moleküle handelt, welche zudem homochiral auftreten (Wang *et al.*, 2009).

Es sei an dieser Stelle ausdrücklich erwähnt, dass die im Folgenden einzeln genannten chromophoren Strukturen lediglich Teile des gesamten transmembranen Photosyntheseapparates sind und sich in ihren Absorptionen stark überlagern, wodurch *In-vivo*-CD-Spektren ganzer Organismen nicht zwangsläufig die beschriebenen Muster aufweisen. Als ein Hauptsignal treten in CD-Spektren photosynthetisch aktiver Organismen Signaturen der Photosysteme auf, wobei bei 675 bis 680 Nanometern ein Übergang des Signals vom positiven in den negativen Bereich sichtbar ist, welcher sowohl durch das Photosystem I bedingt ist (Morton *et al.*, 2015; Engelmann *et al.*, 2001; Andriyevskaya *et al.*, 2002), als auch durch das Photosystem II (Årsköld *et al.*, 2005). Dies bedeutet, dass im Bereich unterhalb von 680 nm verstärkt linksdrehend zirkulare und im Bereich oberhalb rechtsdrehend zirkulare Strahlung absorbiert wird. Weitere positive CD-Signale im Bereich von 480-520 nm bzw. ein engbandiges bei ca. 445 nm sind ebenfalls auf diese Strukturen zurückzuführen (Morton *et al.*, 2015; Shubin *et al.*, 1993). Die Signale im Bereich von 480-520 nm sind dabei zusätzlich von Carotinoidabsorptionen überlagert, welche integrale Bestandteile der Photosysteme sind (Jordan *et al.*, 2001; Zakar *et al.*, 2016). Hierbei absorbieren einige Carotinoide wie beispielsweise β -Carotin stets linksdrehende Strahlung stärker als rechtsdrehende (so genannte nicht-konservative Carotinoide), so dass das Signal stets im positiven Bereich verbleibt, während konservative Carotinoide über den Wellenlängenbereich von 220 bis 500 Nanometern im Vorzeichen alternierende Banden liefern (Sturzenegger *et al.*, 1980). Eingebunden in Proteinkomplexe können die einzelnen Pigmente jedoch mit benachbarten Proteinen interagieren, wodurch sich ihre schwachen intrinsischen CD-Signale in Intensität und Form verändern können. Durch die Einbindung in derlei Pro-

tein(Super)komplexe verstärken sich die CD-Signale in der Regel. Zudem zeigen auch Carotinoide, welche sich vorher konservativ verhielten, Spektren, welche nicht-konservativen ähnlich sind und als psi-Typ (**p**olymer or **s**alt induced) Circular dichroismen betitelt werden (Keller & Bustamante, 1986). Bei *In-vivo*-Messungen an ganzen Zellen überlagern sich diese Effekte (Garab & Van Amerongen, 2009), so dass breitbandige CD-Signale entstehen. Auch Phycobilline, welche im grünen Spektralbereich Licht absorbieren, zeigen CD-Signale, wobei diese unterhalb von 500 nm negativ sind und lediglich oberhalb von 500 nm (durch einen kurzen Abfall im Bereich von 600 nm unterbrochen) positive Beträge aufweisen (Rigbi *et al.*, 1980). Hierbei sind die einzelnen Phycobillisomen in ihrer Größe und Form nicht komplett einheitlich (Wildman & Bowen, 1974; Gray *et al.*, 1973), so dass auch ohne differentielle Phycobillin-Gehalte aufgrund der Konformationsabhängigkeit der psi-Typ-Circulardichroismen eine gewisse Variabilität innerhalb der Polarisationspektren von *N. muscorum* gegeben sein dürfte. Durch die bereits in Abschnitt 6.2.3.4 genannte Möglichkeit der Heterozystenbildung unter Nährstoffmangelbedingungen und der damit einhergehenden Veränderung im Phycobillinhaushalt, wird der Einfluss dieses Pigments auf die Regressionsmodelle gerade im Laufe längerer Kultur dauern zusätzlich verstärkt. Auch weitere akzessorische Pigmente wie Cyanobakteriochromen, welche in Cyanobakterien weit verbreitet sind und deren Absorption über den gesamten sichtbaren Spektralbereich sowie im nahen Infrarot auftreten können (Chen *et al.*, 2012; Hirose *et al.*, 2016; Rockwell *et al.*, 2009), könnten in den durchgeführten Versuchen Veränderungen unterworfen gewesen sein und sich mit den Absorptionen der Chlorophylle, Carotinoide und Phycobilline überlagert haben. Da es sich hierbei zumeist um photorezeptive Pigmente handelt, welche in eher geringer intrazellulärer Konzentration auftreten, dürften sie einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Gesamtspektren gehabt haben.

In den in Abbildung 5.36 gezeigten VIS-CD-Spektren sind keine negativen Wertebereiche zu erkennen, so wie es anhand der oben geschilderten differentiellen Absorptionen der verschiedenen Pigmente auch bei der Vermessung intakter Zellen vor allem im Bereich um 680 nm aufgrund der starken Chlorophyllabsorption zu erwarten gewesen wäre (vgl. Wang *et al.*, 2009, wobei hier ein anderes Cyanobakterium untersucht wurde). Es kann an dieser Stelle nur spekuliert werden, ob dies an einer Überlagerung aller Einzeleffekte liegt, welche insgesamt über den betrachteten Spektralbereich zu einer

stets höheren Absorption linksdrehend zirkularer Strahlung führte, so dass verstärkte Absorption rechtsdrehender Strahlung einzelner Pigmente in einzelnen Wellenlängenbereichen (welche zu negativen CD-Werten geführt hätten) durch die überlagerte Absorption linksdrehender Strahlung durch andere Pigmente bei denselben Wellenlängen ausgeglichen wurden, so dass insgesamt lediglich nicht-konservative Banden beobachtet wurden. Auch könnten psi-Streuungseffekte im gesamten Wellenlängenbereich stärker bei linksdrehender Polarisation sein, wodurch differentielle Absorptionen teilweise maskiert wurden. Weitere Störquellen könnten diverse intrazelluläre Moleküle gewesen sein, welche zwar kein Licht absorbieren, jedoch differentiell gestreut haben dürften, ebenso wie chirale Exopolysaccharide, welche von Cyanobakterien gebildet werden (Di Pippo *et al.*, 2013).

Auch könnte durch Streuung induzierte Depolarisation innerhalb der Kultursuspensionen einen Störfaktor dargestellt haben. In Lösungen chiraler Moleküle (wobei als Solvens optimalerweise ein achiraler Stoff gewählt werden sollte) führen vor allem differentielle Absorptionen an den chiralen Solvaten zur Entstehung der polarisationsspezifischen Signale. Betrachtet man hingegen Suspensionen, kommen zusätzlich Streueffekte hinzu, welche sich zu den Absorptionssignalen addieren. Die gestreuten Anteile der Messstrahlung sind zumeist depolarisiert, wodurch der Anteil an Messlicht, welches seine ursprüngliche Polarisation besitzt, bei zunehmenden Streuungsereignissen abnimmt. Dieser Effekt ist dabei umso stärker, je höher die Konzentration streuender Partikel in der zu vermessenden Suspension ist (Guo *et al.*, 2006). Wenngleich auch das Streuverhalten von chiralen Molekülen polarisationsspezifisch ist (Bustamante *et al.*, 1983), und somit in den Reaktoren zum konformationsspezifischen Messsignal beitrug, ist eine Verminderung der polarisationsspezifischen Absorption durch diverse Streueffekte wahrscheinlich und könnte das theoretisch vorhandene Plus an Spezifität der Polarisationsspektroskopie im Vergleich zur depolarisierten VIS-Spektroskopie konterkariert haben. Diese streuungsbedingte Depolarisation hat in Transmissionsmessungen geringere Auswirkungen als in anderen Versuchsanordnungen wie beispielsweise Reflexionsmessungen (Guo *et al.*, 2006), so dass durch die Nutzung anderer Messgeometrien eher schlechtere Ergebnisse zu erwarten sind und die in dieser Arbeit gewählten Transmissionsmessungen bereits als „optimal“ anzusehen sind.

Angesichts der sehr geringen Intensität von CD-Signalen sowie des individuell zusammengestellten Versuchsaufbaus im Vergleich zu kommerziellen CD-Messsystemen, erscheint es insgesamt jedoch als sehr wahrscheinlich, dass die Sensitivität des Aufbaus schlichtweg nicht ausreichend war, um die schwachen differentiellen Extinktionen komplett verlässlich aufzunehmen. Zwar ist laut Drake (1986) die Messung (bzw. Berechnung) von CD-Spektren anhand zweier Einzelspektren welche mit gegenläufiger Drehrichtung des polarisierten Messlichts aufgenommen wurden, ab einer Intensität von $\Delta_l = 10^{-2}$ Extinktionseinheiten nicht zu beanstanden, jedoch stellt sich für den in dieser Arbeit gewählten Versuchsaufbau die Frage, inwiefern die CD-Spektren korrekt ermittelt wurden. In den untersuchten biologischen Proben liegen neben kristallinen auch lamellar organisierte PHB-Polymere vor, welche nicht zwingend konsistent chirales Verhalten zeigen (Saracovan, 1999, S. 1-14, 5-26). Da der prozentuale Anteil lamellar vorliegenden PHBs in den Proben variiert haben könnte, ist hier ein weiterer Faktor gegeben, der die polarisationspezifische Direktquantifizierung von PHB möglicherweise verhindert hat.

Wie oben diskutiert, kann zudem nicht ausgeschlossen werden bzw. es ist sogar wahrscheinlich, dass teilweise elliptische anstatt zirkularer Polarisation vorlag. Aufgrund von Inhomogenitäten im Material der Reaktorbehälter kann der Grad der Elliptizität bzw. einer möglichen Depolarisation hierbei zwischen den einzelnen Reaktorgefäßen variiert haben, wodurch es zu Verfälschungen der gemessenen Spektren gekommen sein kann. Durch die geringe Absolutintensität der CD-Spektren können somit selbst geringe Messfehler zu fehlerhaft ermittelten CD-Spektren geführt haben. Dies würde die schlechte Qualität der Regressionsmodelle, welche anhand dieser Daten erstellt wurden, hinreichend erklären. Die Verwendung von spezialisierten Messgeräten erscheint deshalb unerlässlich und bringt die Möglichkeit gravierender Verbesserungen in den spektralen Qualitäten und somit im Verfahren insgesamt mit sich.

6.2.5.4 Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im polarisierten VIS-Bereich

An dieser Stelle können aufgrund der oben genannten Probleme bei Messungen im geschlossenen Reaktor lediglich jene Modelle sinnvoll diskutiert werden, die auf spektralen Messungen basieren, welche in Glasküvetten durchgeführt wurden. Hierbei zeigte sich, dass linksdrehende Strahlung zu favorisieren ist, da ihre Verwendung zu einer

Verringerung der Vorhersagefehler der Regressionsmodelle führte. Dass dies bei rechtsdrehend polarisiert aufgenommenen und auch bei Verwendung von CD-Spektren nicht der Fall war, lässt sich möglicherweise durch die weiter oben beschriebene erhöhte Absorption von linksdrehender Strahlung im Vergleich zu rechtsdrehender durch verschiedene Photosynthesepigmente erklären. Dass diese Verbesserung bei jenen Modellen nicht zu beobachten war, welche auf solchen Spektren beruhen, die im geschlossenen Reaktor gemessen wurden, ist höchst wahrscheinlich vor allem auf die polarisationsmodulierenden Materialeigenschaften der geschlossenen Reaktorbehälter zurückzuführen. Durch die bereits weiter oben beschriebenen doppelbrechenden Eigenschaften der Polymermaterialien (siehe Abbildung 5.30 sowie Abschnitt 6.2.5.1) ist eine Umwandlung der zirkularen Polarisation in eine elliptische wahrscheinlich, welche die differentielle Absorption von links- und rechtsdrehend polarisierter Messstrahlung behinderte. Es ist deshalb für weitere Polarisationsmessungen direkt im System unabdingbar, diese Messungen durch nicht-doppelbrechende Materialien wie beispielsweise LDPE-Folien zu realisieren.

Eine endgültige Aussage zur Anwendungsgüte möglicher Vorbehandlungsmethoden ist lediglich anhand einer einzigen Versuchsreihe als problematisch anzusehen. Bezüglich der Effekte der verschiedenen Methoden sowie der erwartbaren Resultate sei zur Vermeidung von Dopplungen an dieser Stelle auf den Diskussionsteil zur Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im unpolarisierten VIS-Bereich (Abschnitt 6.2.3.5) verwiesen. Aufgrund der unterschiedlichen Verhaltensweisen der Modelle bei links- oder rechtsdrehender Polarisation sowie bei Verwendung von CD-Spektren erscheint eine Nutzung von unbehandelten VIS-Polarisationsspektren für das gewählte Versuchsetup insgesamt als optimale Vorgehensweise. Prinzipiell zeigte sich, dass die Verwendung von polarisiertem Messlicht die Qualität von PLS-Regressionsmodellen positiv beeinflussen kann, dies jedoch unbedingt unter dezidierter Beachtung der Eigenschaften der Reaktormaterialien geschehen muss um diese Vorteile tatsächlich nutzbar zu machen. Dass die Verwendung von polarisierter Messstrahlung zudem Informationen liefern kann, welche allein mittels unpolarisierter Strahlung nicht zugänglich wären, scheint unbestreitbar.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass im gewählten Versuchsaufbau innerhalb des geschlossenen Reaktors VIS-Polarisationsspektren nur eingeschränkt aufgenommen werden konnten.

6.2.6 NIR-Polarisationsspektroskopie

Die in diesem Abschnitt diskutierten Effekte und Ursachen sind in gewissem Ausmaß mit jenen deckungsgleich, welche bereits für die in Abschnitt 6.2.4 besprochenen Messungen bei Verwendung unpolarisierter NIR-Strahlung dargestellt wurden, weshalb zur Vermeidung von Redundanzen an den entsprechenden Stellen dieses Abschnitts auf vorhergehende Diskussionsteile verwiesen wird.

6.2.6.1 Polarisationsabhängiges Absorptionsverhalten der Polymermaterialien im nah-infraroten Spektralbereich

Da für den NIR-Bereich keine visuelle Auswertung möglich war und zudem lediglich eine Verzögerungsplatte zur Verfügung stand, wurden diese Messungen dort nicht durchgeführt.

Aufgrund der Punkte, die im Diskussionsteil zum sichtbaren Spektralbereich (Abschnitt 6.2.5.1) aufgeführt wurden, ist ein Einfluss auf den Polarisationsgrad innerhalb der Reaktoren, bedingt durch die optischen Eigenschaften der verwendeten Materialien, jedoch sehr wahrscheinlich auch im NIR-Bereich gegeben, wobei dessen absolute Einflussstärke nicht abschließend bestimmt wurde.

6.2.6.2 PHB-Referenzspektren für den polarisierten NIR-Bereich

Prinzipiell gelten für die Zuordnung der (differentiellen) Absorptionsbanden dieselben Grundlagen, wie sie für den unpolarisierten NIR-Bereich bereits in Abschnitt 6.2.4.3 beschrieben wurden. Aufgrund der verschieden starken Absorption von links- und rechtsdrehend zirkular polarisierter Messstrahlung zeigen sich jedoch Unterschiede in den absoluten Intensitäten der Absorptionsbanden. Dies deckt sich mit den Erwartungen, da PHB als chirales Molekül grundsätzlich in allen Absorptionsbereichen dieses differentielle Verhalten aufweist. Dass linksdrehend zirkular polarisierte Strahlung insgesamt stärker absorbiert wird, könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich biogenes PHB aus *N. muscorum* als Polymer zu einer linksdrehenden Helix formt (Yokouchi *et al.*, 1973), wobei diese Deutung spekulativ ist, da lediglich anhand der Enantiomerform

eines Moleküls nur schwer auf seine polarisationsspezifischen Absorptionseigenschaften geschlossen werden kann (Lahiri *et al.*, 2014). Dass alle CD-Spektren im NIR-Bereich auch außerhalb von Absorptionsbereichen oberhalb der Nulllinie liegen ist durch stärkere Lichtstreuung bei linksdrehend zirkularer Strahlung als bei rechtsdrehender zu erklären, wobei diese polarisationssensitiven Streueffekte generell einen großen Beitrag zu gemessenen CD-Spektren leisten können (Bustamante *et al.*, 1983). Insgesamt ist die Qualität der im NIR-Bereich gemessenen CD-Spektren relativ schlecht, was auf die sehr geringen Intensitäten der differentiellen Extinktionen zurückzuführen ist, welche lediglich ein Hundertstel der ursprünglich gemessenen Extinktionssignale betragen. Hinzu kommt die starke Absorption von Wasser im vermessenen NIR-Bereich, welche generell die Aufnahme von CD-Spektren in wässrigen Suspensionen behindert (Keiderling, 2013).

Generell ist zu konstatieren, dass die Aufnahme von NIR-CD-Spektren eine extrem hohe Messgenauigkeit erfordert und äußerst störanfällig ist, weshalb Messungen in einem modifizierten Standardspektrometer und die daraus resultierenden Datensätze stets kritisch auf Plausibilität überprüft werden müssen.

6.2.6.3 Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten

Bei Betrachtung der in Abbildung 5.45 und Abbildung 5.46 dargestellten Spektren fällt auf, dass sich diese nicht sichtbar von jenen unterscheiden, welche mittels unpolarisierter Strahlung aufgenommen wurden. Deshalb seien die in Abbildung 5.47 gezeigten CD-Spektren eingehender diskutiert, da sich hier differentielle Extinktionen zeigen.

Vor allem im Bereich um 940 bis 980 Nanometer sowie von 1120 bis 1200 nm zeigen sich positive CD-Signale. Die erstgenannten sollten auf zweite Obertonschwingungen von O-H-Bindungen, die letztgenannten auf Streckschwingungen zweiter Ordnung von Methylgruppen sowie auf Obertonschwingungen von Carbonylgruppen zurückzuführen sein (Workman & Weyer, 2008, S. 98). Eventuell leisteten im kurzwelligen Bereich um 900 nm auch Carotinoide durch ihre nicht-konservativen NIR-CD-Signale einen geringen Beitrag zur erhöhen Absorption linksdrehender Strahlung gegenüber rechtsdrehender (Georgakopoulou *et al.*, 2006), dieser Betrag dürfte jedoch (sofern überhaupt detektierbar) nur sehr gering gewesen sein. Zwar konnten bei Vermessung von PHB-Reinsubstanz lediglich im Bereich von 1170 nm konsistent CD-Signale detektiert wer-

den, dass in den CD-Spektren ganzer Kultursuspensionen jedoch auch OH-Gruppen-Signale stark vertreten sind, ist aufgrund der weit verbreiteten Integration dieses Bindungstyps in verschiedensten zellulären Polymeren nicht verwunderlich. Es ist hierbei nicht mit Sicherheit festzustellen, welchen Stoffen diese Signale explizit zuzuordnen sind, da jedoch die meisten biologischen Polymere chirale Moleküle sind (Wang *et al.*, 2009), sind CD-Signale in diesem Wellenlängenbereich erklärbar. Auch dass dieser Wellenlängenbereich in den erstellten Regressionsmodellen keinen Einfluss auf die PHB-Vorhersage hat, ist aufgrund der weiten Verbreitung dieser Bindung schlüssig. Bei Betrachtung der in Abbildung 5.49 dargestellten Ladungsvektoren der auf polarisierten Spektraldaten basierenden Regressionsmodelle fällt auf, dass der Bereich um 1140 nm besonderen Einfluss auf die PHB-Vorhersage hat. Wie bereits in vorangegangenen Abschnitten erwähnt, liegen hier Obertonschwingungen der Carbonylgruppen von PHB (im Bereich von 1140 bis 1170 Nanometern, Workman & Weyer, 2008, S. 98). Auffallend ist, dass die entsprechende Bande schmäler ausfällt, als dies bei der Nutzung von unpolarisierter Messstrahlung (vgl. Abbildung 5.28) der Fall ist. Es kann spekuliert werden, dass anhand dieses Wellenlängenbereiches auf Grundlage von Polarisationspektren eine leicht selektivere PHB-Detektion stattfand als dies anhand von depolarisiert gemessenen Spektren der Fall war. Demgegenüber steht jedoch der in Glasküvetten erreichte RMSEP von 4,42 mg PHB pro Liter Kultursuspension, welcher höher liegt als jener, der anhand von depolarisierten Spektren erzielt wurde ($3,04 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Bei Betrachtung der detaillierter ausgeführten Modelle des 4. Versuchslaufes, welche auf Spektren beruhen, die im geschlossenen Reaktor aufgenommen wurden, fällt zudem auf, dass diese Modelle einen eher schlechten Zusammenhang zwischen gemessener und vorhergesagter PHB-Konzentration zeigten. Die Verwendung von polarisierter Messstrahlung war in diesen Fällen somit eher negativ zu bewerten verglichen mit unpolarisiertem Messlicht.

6.2.6.4 Übersicht multipler Versuchsdurchläufe im polarisierten NIR-Bereich

An dieser Stelle können aufgrund der oben genannten Probleme bei Messungen im geschlossenen Reaktor analog zum polarisierten VIS-Bereich lediglich jene Modelle sinnvoll diskutiert werden, die auf spektralen Messungen basieren, welche in Glasküvetten durchgeführt wurden. Auch für den NIR-Bereich lieferte linksdrehend zirkular

polarisierte Messstrahlung die besten Ergebnisse, das heißt die Regressionsmodelle mit den geringsten Vorhersagefehlern. Dass bei Verwendung von rechtsdrehend polarisiert aufgenommenen und auch von CD-Spektren die Fehler höher waren, lässt sich möglicherweise durch die weiter oben beschriebene erhöhte polarisationsspezifische Streuung von linksdrehender Strahlung erklären.

Polarisationsmessungen (im geschlossenen Reaktor) führten jedoch stets zu höheren Fehlerwerten als jene, die in den Modellen erzielt wurden, die auf depolarisierten Spektraldaten basierten. Dies ist durch die oben genannte Beeinflussung der Ursprungspolarisation durch das Reaktormaterial zwar erklärbar, zumindest für die Messungen in Glasküvetten jedoch verwunderlich. Es kann hier leider nicht abschließend geklärt werden, ob dies auf eventuelle Probleme bei der Durchführung der Messungen zurückzuführen ist, wahrscheinlicher ist jedoch, dass die polarisationsspezifischen Signale aufgrund ihrer geringen Intensität nicht verlässlich aufgenommen wurden und (wie bereits weiter oben erwähnt) das Versuchsssetup mit einem modifizierten Standardspektrometer nicht optimal war.

Da analog zum polarisierten VIS-Teil keine Datenvorbehandlungsmethode konsistente Verbesserungen der Regressionsmodelle mit sich brachte, scheint auch für diesen Spektralbereich die Nutzung von Rohspektren als Modellgrundlage optimal zu sein.

Insgesamt ist zu beachten, dass Extinktionsmessungen wässriger Suspensionen im NIR-Bereich durch die hohe Eigenabsorption des Wassers gerade bei geringen Biomassekonzentrationen generell schwierig sind und vor allem die geringe Intensität polarisationsspezifischer Signale diese Problematik sehr verstärkt.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass im gewählten Versuchsaufbau innerhalb des geschlossenen Reaktors keine NIR-Polarisationsspektren verlässlich aufgenommen werden konnten.

6.2.7 Konfokale Raman-Mikrospektroskopie

Das in Abbildung 5.53 gezeigte Raman-Spektrum von reinem PHB-Pulver zeigt sehr saubere Raman-Peaks und nur eine minimale Grundlinie. Dies entspricht den Erwartungen, da der konfokale Messaufbau die Aufnahme von Raman-Spektren mit hoher Einstrahlungsintensität bei einer gleichzeitig optimalen Filterung des Anregungslasers ermöglicht. Da die Spektrenaufnahme zudem im Fokus des Mikroskopes geschieht,

ergibt sich eine große Effizienz in der Erfassung des Raman-gestreuten Anregungslichtes bei gleichzeitig hoher Abbildungsschärfe, wodurch Störsignale (beispielsweise durch Probenträger, Lösemittel, etc.) sehr selektiv ausgeblendet werden können. Das aufgenommene Referenzspektrum von reinem PHB deckt sich sehr gut mit bereits publizierten Spektren anderer Autoren. Beispielhaft ist in Abbildung 6.9 ein Spektrum gezeigt, welches von Ciobotă *et al.* (2010) veröffentlicht wurde und anhand dessen die Zuordnung der Raman-Peaks, so wie sie in dieser Arbeit bestimmt wurden geschieht.

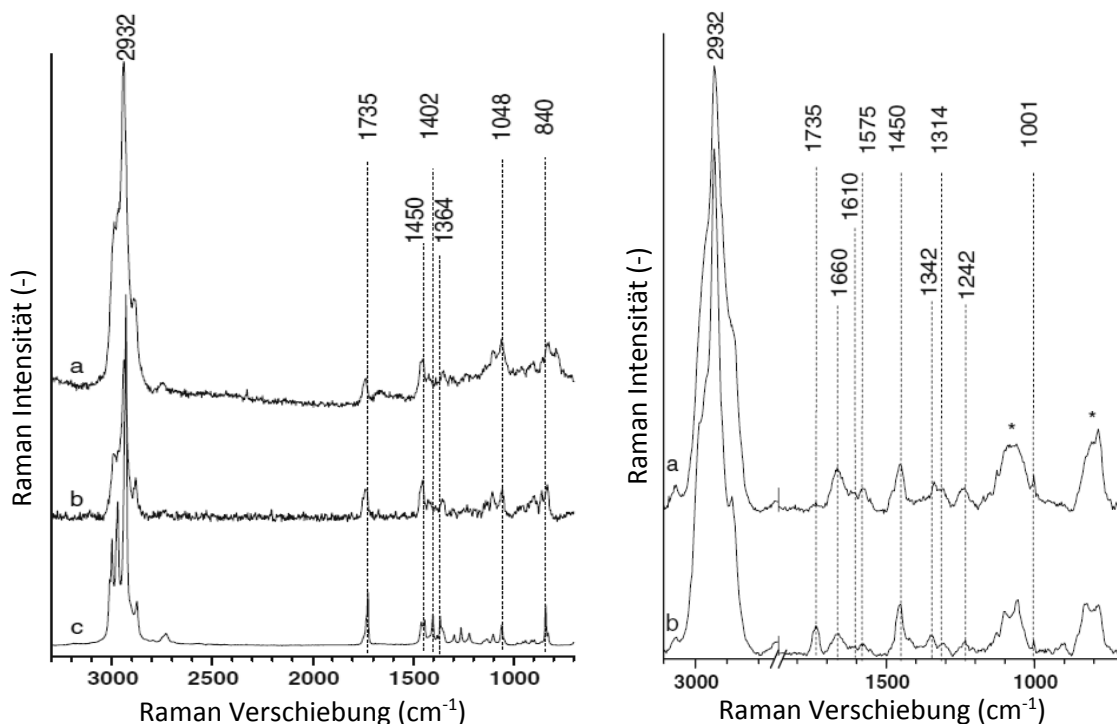


Abbildung 6.9: Von Ciobotă *et al.* publizierte Raman-Spektren verschiedener Proben. Linker Bildteil: Einzelzellenspektrum von *Acidiphilium cryptum* JF-5 (a), Spektrum von amorphem PHB (b), Spektrum von kristallinem PHB (c). Rechter Bildteil: Mittelwertspektren von *Bacillus megaterium* DSM 90 ohne (a) und mit intrazellulär akkumuliertem PHB (b).

Wie ersichtlich, gibt es Unterschiede in den Raman-Spektren von reinem PHB je nachdem in welchem Zustand (amorph oder kristallin) es sich befindet. Die Raman-Peaks im Bereich von 1200 bis 1300 cm⁻¹ sind lediglich in Spektren der kristallinen Proben zu finden und wurden auch in dem in dieser Arbeit aufgenommenen Raman-Spektrum von PHB (Abbildung 5.53) gefunden. Da ein Vorhandensein dieser Peaks stark davon abhängig ist, in welchem Kulturzustand sich die untersuchten Organismen befinden (Ciobotă *et al.*, 2010) und sie somit keine universelle Detektion von PHB erlauben, sei

für eine dezidierte Zuordnung der Peaks zu einzelnen Molekülbindungen auf oben genannte Quelle verwiesen. Im Bereich von ca. 2900 bis knapp oberhalb von 3000 cm^{-1} zeigen sich auch in den im Verlaufe dieser Arbeit aufgenommenen Spektren starke Raman-Signale. Diese sind auf Überlagerungen verschiedener CH-Streckschwingungen der CH_2 - sowie der CH_3 -Gruppen diverser Stoffklassen (Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate) zurückzuführen (Naumann *et al.*, 1995). Da diese Bindungen u.a. in großer Zahl in den Lipidmembranen von Mikroorganismen vorhanden sind und sie somit ein relativ PHB-unspezifisches Raman-Signal hervorrufen, wurde von Raman-Messungen in diesem Wellenzahlenbereich abgesehen, da mögliche PHB-Peaks stark von Raman-Signalen anderer Zellkomponenten überlagert werden. Der bei ca. 840 cm^{-1} sichtbare Peak ist C-C-Streckschwingungen zuzuordnen (González Torres *et al.*, 2007). Da dieser Bindungstyp jedoch sehr häufig in biologischen Organismen vorkommt, ist zu erwarten, dass dieser Peak für die selektive PHB-Quantifizierung nur geringe Relevanz hat.

Ein weiteres Peakmuster im Bereich von ca. 1300 bis 1500 cm^{-1} ist auf CH_3 - (1365 und 1402 cm^{-1}) sowie CH_2 -Deformationsschwingungen (1450 cm^{-1}) zurückzuführen (Ciobotă *et al.*, 2010). Dieses Muster taucht sowohl in Spektren von amorphem, als auch in jenen von kristallinem PHB auf, ist zudem in Mikroorganismen nachweisbar und dürfte sich (wenngleich auch hier Überlagerungen mit CH-Schwingungen anderer Zellbestandteile auftreten) zumindest in gewissem Maße zur PHB-Quantifizierung eignen.

Am PHB-spezifischsten (und sowohl in der amorphen als auch der kristallinen Form messbar) ist jedoch der Peak bei 1735 cm^{-1} , welcher auf C=O-Streckschwingungen zurückzuführen ist (Ciobotă *et al.*, 2010; González Torres *et al.*, 2007). Dieser Peak kann theoretisch in den erstellten Regressionsmodellen großen Einfluss für die PHB-Quantifizierung mittels Raman-Spektroskopie aufweisen.

6.2.8 VIS-Raman-Spektroskopie

Nach der im vorangehenden Abschnitt erfolgten Peakzuordnung soll im Folgenden zunächst diskutiert werden, inwiefern sich die Referenzmuster im genutzten fasergestützten Versuchsaufbau wiederfinden ließen und nachfolgend die mittels Raman-Spektroskopie gemessenen Spektren zur nicht-invasiven PHB-Quantifizierung geeignet sind.

6.2.8.1 PHB-Referenzspektren für den VIS-Raman-Bereich

Bei den in Abbildung 5.59 dargestellten, grundlinienbereinigten PHB-Raman-Spektren fällt auf, dass die Qualität der Spektren generell geringer ist, als die des Referenzspektrums, welche am konfokalen Mikroskop aufgenommen wurde. Dies ist vor allem durch die Eigenheiten des fasergestützten Versuchsaufbaus zu erklären. So ist die Einkopplung des Anregungslasers in die geschlossenen Reaktorbehälter nicht fokussiert, wodurch sich das Anregungslicht auf einen vergleichsweise großen Durchmesser verteilt (siehe Abbildung 4.10). Zwar wird durch diese Art der Einkopplung ein größerer Probenbereich mit Licht bestrahlt und somit können potenziell auch mehr Analyte erfasst werden, jedoch ist die Intensitätsdichte durch elastische Streuung, welche nicht zum Raman-Effekt beiträgt, insgesamt stark verringert. Hinzu kommt, dass das Raman-gestreute Messlicht nur am Faserkopf eingefangen wird und seitlich abgestrahltes Streulicht nicht den Detektor erreicht.

Nichts desto trotz, sind einige, bereits für das Referenzspektrum genannte Peaks, auch in den per Messkopf gemessenen Spektren erkennbar. Die hier aufgezählten Bandenzuordnungen wurden (wie bereits im vorigen Abschnitt) den Arbeiten von Ciobotă *et al.* (2010) sowie González Torres *et al.* (2007) entnommen.

So sind bei ca. 845 und 960 cm^{-1} Streckschwingungen von C-C-Bindungen zu erkennen, welche wie bereits beschrieben zur Quantifizierung von intrazellulärem PHB eher geringe Relevanz haben sollten. Bei 1340 sind zudem CH- und bei 1365 sowie 1480 cm^{-1} CH_3 -Deformationsschwingungen zu erkennen, welche auch nur in geringem Maße zur Quantifizierung beitragen sollten. Bei 1219 cm^{-1} sind des Weiteren asymmetrische C-O-C-Streckschwingungen zu erkennen, welche augenscheinlich konzentrationsabhängig sind. Die bei 1735 cm^{-1} sichtbaren C=O-Streckschwingungen, welche in der Literatur als klar definierte Peaks erscheinen und für die Quantifizierung essentiell sind (De Gelder *et al.*, 2008), sind hier jedoch nur schwach erkennbar. Zudem zeigt sich eine kaum konzentrationsabhängige Signalintensität. Generell ist anzumerken, dass feiner aufgelöste Konzentrationsunterschiede (so wie mittel VIS- bzw. NIR-Spektroskopie vermessen) nicht verlässlich unterscheidbar waren und eine sichere Differenzierung vor allem zwischen verschiedenen Größenordnungen von PHB-Konzentrationen möglich war. Es bleibt zu erwähnen, dass in jenen Spektren, welche um den Wasser-Blindwert bereinigt wurden, zwei Raman-Signale (bei 1476 sowie ca. 1165 cm^{-1}) fehlen,

welche in den ungeblankten Spektren auftauchen. Diese stammen von den verwendeten Polypropylenreaktoren und sind auf Kombinationsschwingungen von CC- und CH₃-Bindungen zurückzuführen (Arruebarrena de Báez *et al.*, 1995). Auch eine Bande bei ca. 1640 cm⁻¹ fehlt nach Abzug des Blindwertspektrums, welche durch das Wasser an sich hervorgerufen wird, genauer durch die intramolekulare Vibrationsschwingung der OH-Bindung (Walrafen, 1964).

De Gelder *et al.* (2008) konnten eine nicht-invasive PHB-Quantifizierung mittels Raman-Spektroskopie auf Einzelzellniveau bereits erfolgreich durchführen. Inwiefern die nicht-invasive PHB-Quantifizierung aufgrund von Raman-Spektren in geschlossenen Reaktoren möglich ist, lässt sich durch Betrachtung der Referenzspektren nicht abschließend klären und wird deshalb anhand der Versuchsdaten im folgenden Abschnitt erörtert.

6.2.8.2 Spektren im Kulturverlauf und Regression mit PHB-Gehalten

Wie anhand der in Abbildung 5.60 dargestellten Beispielspektren von verschiedenen *Nostoc*-Kulturen zu erkennen, waren jeweils nur wenige Peaks innerhalb der Spektren messbar. Bei Vergleich der Daten mit Literaturspektren wie beispielsweise dem in Abbildung 6.10 dargestellten von Wang *et al.* (2010) oder jenen von Tanaka *et al.* (2009) lassen sich bestimmte Signale sinnvoll zuordnen.

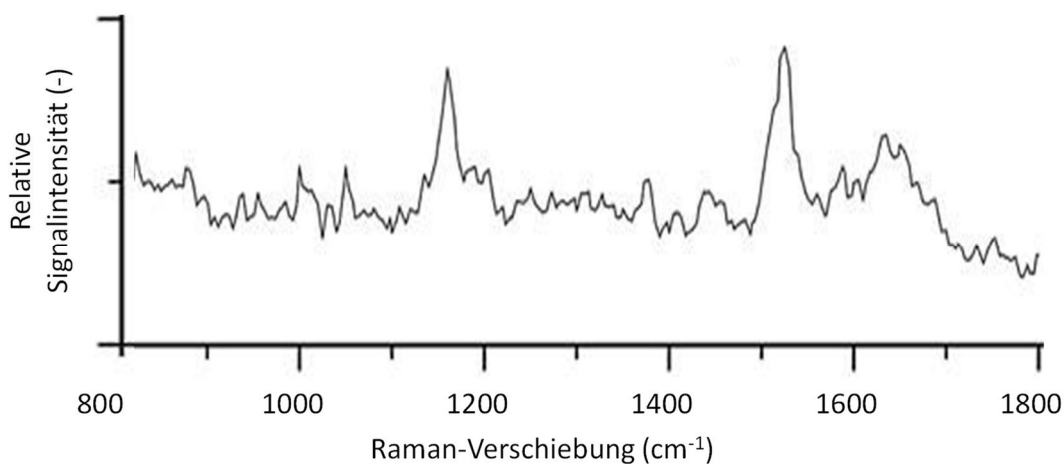


Abbildung 6.10: Nach Wang *et al.* (2010) verändertes Raman-Mikroskopie-Spektrum von *Nostoc* sp. bei einer Anregungswellenlänge von 1064 nm. Das Spektrum wurde im Vergleich zur Originalpublikation horizontal gespiegelt dargestellt und neu beschriftet.

So repräsentieren die auch in dieser Arbeit gefundenen Signale bei 1160 sowie 1523 und in abgeschwächter Form bei 1007 cm^{-1} ein klassisches Carotinoid-Bandentripel (de Oliveira *et al.*, 2010), welches auf das intrazellulär in *Nostoc muscorum* vorherrschende β -Carotin, sowie die ebenfalls in geringeren Mengen vorhandenen Carotinoide Zeaxanthin, Caloxanthin Nostoxanthin und weitere (Arima *et al.*, 2012) zurückzuführen ist. Vor allem Signale der C=C-Streckschwingungen bei 1523 cm^{-1} (auch „ ν_1 “ genannt), sowie der C-C-Streckschwingungen bei 1160 cm^{-1} (auch „ ν_2 “ genannt) der Polyketten und von Deformationsschwingungen der C-CH₃-Gruppen bei 1007 (auch „ ν_3 “ genannt) sind hier erkennbar (De Oliveira *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2010). Die Stärke der Carotinoidbanden lässt sich dabei durch Resonanzeffekte bei der gewählten Anregung im sichtbaren Spektralbereich erklären, wodurch Carotinoidsignale generell zu den stärksten Banden in biologischen Proben gehören (Wu *et al.*, 1998).

Aufgrund der zu geringen Auflösung des Messsystems ist eine selektive Zuordnung der Messsignale zu einzelnen Carotinoidspezies jedoch nicht möglich, weshalb lediglich Aussagen über den Gesamtcarotinoidgehalt der Zellen getroffen werden konnten.

Die Bande bei ca. 850 Wellenzahlen ist auf überstreuendes Licht des Anregungslasers zurückzuführen, welches durch die Zellen und andere Partikel (wie beispielsweise Zellbruchstücke) in den Detektor rückgestreut wurde und aufgrund suboptimaler Rayleigh-Filter im Versuchsaufbau nicht komplett eliminiert werden konnte.

Ähnliches gilt für den Peak bei 1705 cm^{-1} , welcher bei Anregung mit 488 nm bei einer Absolutwellenlänge von 532,2 nm liegt. Da bei der „Herstellung“ der Anregungslaserstrahlung zunächst ein 1064-nm-Laser frequenzverdoppelt wird um in nachfolgenden Schritten eine durchstimmbare Laserlichtquelle zu erhalten, ist stets ein geringer Anteil an Laserlicht mit einer Wellenlänge von 532 nm im finalen Anregungsstrahl enthalten. Dieser Anteil wird ebenso wie der Hauptlaseranteil (welcher wie erwähnt bei 488 nm liegt) innerhalb der Proben in den Detektor rückgestreut und ist somit ein Artefakt, welches durch den Versuchsaufbau bedingt ist.

Die sehr engbandige Signalspitze bei 1267 cm^{-1} ist auf Störlicht zurückzuführen. Bei der gewählten Anregungswellenlänge von 488 Nanometern entspricht diese Verschiebung einer absoluten Wellenlänge von 520,2 nm, was sich fast genau mit der Atomemissionslinie von Quecksilber bei 520,5 nm (Sansonetti & Reader, 2001) deckt und somit nicht als Teil des *Nostoc*-Spektrums anzusehen ist.

Die zwei bei 1345 und 1465 cm^{-1} aufgetretenen Peaks innerhalb der *Nostoc*-Spektren konnten nicht endgültig zugeordnet werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Raman-Signale der Polypropylen-Reaktorgefäße, welche im Bereich von ca. 1350 sowie 1470 cm^{-1} entsprechende Signaturen zeigten (siehe Abbildung 5.54). Eine weitere Erklärung bieten unspezifische CH-Deformationsschwingungen (welche bei 1344 cm^{-1} liegen) beziehungsweise Signale von Lipiden (bei 1465 cm^{-1}), welche auf weitere Zellbestandteile zurückzuführen sein könnten (Talari *et al.*, 2015). Da entsprechende Nebenpeaks der spekulativen Lipidsignale fehlen ist diese Deutung jedoch mit äußerster Vorsicht zu betrachten.

Der in Abschnitt 6.2.7 als für die Erstellung der Regressionsmodelle besonders wichtig angenommene C=O-Peak konnte hingegen in den aufgenommenen *Nostoc*-Spektren nicht wiedergefunden werden. Auch weitere PHB-spezifische Peaks konnten nicht explizit erkannt werden, so dass eine direkte PHB-Quantifizierung anhand stoffspezifischer Raman-Signale augenscheinlich nicht erfolgte.

Die Auswertung der erstellten Regressionsmodelle anhand der im Reaktor aufgenommenen Raman-Spektren zeigten denn auch vor allem Einflüsse jener Spektralbereiche, in welchen die drei Carotinoid-Banden sichtbar waren. Zusätzlich waren in den Faktorstufen 3-5 starke Einflüsse jener Wellenzahlenbereiche erkennbar, in denen lediglich Streulichteffekte im Spektrum dominieren.

Für die direkte PHB-Quantifizierung direkt im Reaktor bedeutet dies, dass offensichtlich keine PHB-spezifischen Raman-Peaks in den Kultursuspensionen gemessen werden konnten. Vielmehr erfolgte (analog zu jenen Regressionsmodellen, welche anhand der im sichtbaren Spektralbereich aufgenommenen Extinktionsspektren erstellt wurden) die PHB-Quantifizierung indirekt anhand der kumulierten Informationen aus Biomassegehalt im Reaktorgefäß (anhand der Intensität der gemessenen Streulichtanteile des Anregungslasers) sowie der variierenden Pigmentierungen (anhand der Intensität der Carotinoid-Spektren) der einzelnen Zellen.

Dass keine der verwendeten Methoden zur Datenvorbehandlung der fluoreszenzbeinigten Rohspektren zu Verbesserungen der Vorhersagegüte führte, lässt sich durch die Datenstruktur von Raman-Spektren schlüssig erklären. Eine Grundlinie, welche hätte entfernt werden können, war nicht vorhanden ebenso wenig wie Streulichteinflüsse. Verfahren zur Normierung liefen ebenso ins Leere, da die einzigen (breitbandigen)

Peaks, welche in anderen Fällen zur Punktnormierung nutzbar sind, zur Quantifizierung notwendig waren. Einzig eine Peakverschiebung, welche durch Ableitungsspektren hätte prononciert werden können, ist aufgrund der bindungsspezifischen Peaklage und sich möglicherweise ergebenden leichten Verschiebungen aufgrund von Strukturellen Umbildungen im Carotinoidapparat denkbar (Jehlička *et al.*, 2014). So könnte die leichte Verbesserung des Vorhersagefehlers auf solche Peakverschiebungen zurückzuführen sein, jedoch ist dies aufgrund der begrenzten Auflösung des verwendeten Messaufbaus eher unwahrscheinlich. Letztlich sind bereits grundlinienkorrigierte Raman-Rohspektren für diesen Aufbau die optimale Datenquelle zur anschließenden Modellerstellung.

6.2.8.3 Übersicht multipler Versuchsdurchläufe der Raman-Messungen

Die erreichten Vorhersagefehler von $2,85 \text{ mg l}^{-1}$ sind mit ca. 10 % des ins Modell inkludierten Messbereiches relativ gering, wobei andere Autoren wie beispielsweise Nadadoor *et al.* (2012) für Faktoren wie Glucose und intrazelluläre Ölgehalte bei *In-situ*-Messungen auf eine ähnliche Größenordnung kommen. Selbige Autoren konnten Biomassekonzentrationen sogar mit prozentual betrachtet höherer Auflösung bestimmen, jedoch wurden jene Modelle anhand von größeren Probenumfängen erstellt, ein Faktor, der laut verschiedenen Autoren (z.B. Mulbry *et al.*, 2012) zu einer Verringerung von absoluten Vorhersagefehlern führen kann. Auch im Hinblick auf die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche könnten weitere Versuchsreihen mit stabilen Rahmenbedingungen zu weiter verringerten Vorhersagefehlern für PHB (oder andere Metabolite) führen.

Bezogen auf das entwickelte Reaktorsystem ist zu sagen, dass problemlos Raman-Spektren *in situ* aufgenommen werden können, die Empfindlichkeit im verwendeten System jedoch derart gering ist, dass bisher vor allem resonant angeregte Pigmente detektierbar sind und Stoffquantifizierungen somit eher nur indirekt erfolgen können. Durch Modifikation des Messaufbaus (beispielsweise durch Integration einer Ulbrichtkugel-ähnlichen Messkammer) könnte die Sensitivität jedoch gesteigert werden, so dass ein breiteres Spektrum von Stoffen *in situ* detektiert werden kann. Insgesamt ist anzunehmen, dass weitere Entwicklungen im Bereich der Raman-Spektroskopie sowie

deren apparative Simplifizierung zu einer weiteren Verbreitung der Nutzung dieser Spektroskopietechnik in der Phykologie führen werden.

6.2.9 NIR-Raman-Spektroskopie

Da bei einer Anregung im sichtbaren Spektralbereich Fluoreszenzsignale der zellulären Pigmente (Chlorophylle, Carotinoide, Phycobilline) oftmals eine Aufnahme von sauberen Raman-Spektren erschweren bis unmöglich machen, war zu hoffen, dass das gewählte Messsystem diese Problematik eliminieren würde.

Wie zu erkennen, weist das in dieser Arbeit aufgenommene NIR-Raman-Spektrum von PHB jedoch ein extrem schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis auf, was sich vor allem in der Region von 1500 bis 2000 cm^{-1} zeigt, in welcher bis auf den C=O-Streckschwingungspeak bei 1734 cm^{-1} keinerlei Signale zu erwarten sind. Die gewählte Integrationszeit von 10 Sekunden ist dabei relativ hoch und auch noch längere Messdauern brachten keinerlei Verbesserung in der Spektrenqualität mit sich. Anhand des aufgenommenen Spektrums von reinem PHB, sowie weiteren Testspektren von Cyanobakterien, welche keine distinkten Raman-Peaks und generell schwache Intensitäten zeigten (während die Laserleistung bereits so hoch eingestellt war, dass einzelne Proben Hitzeschäden aufwiesen) kann konstatiert werden, dass eine Aufnahme sauberer PHB-Spektren mit dem genutzten portablen Messsystem nicht möglich war. Eine Quantifizierung von PHB in Kulturen von Cyanobakterien direkt im Reaktor erscheint aufgrund der nicht vorhandenen Fluoreszenz, welche im sichtbaren Anregungsbereich starke Probleme verursacht, theoretisch zwar denkbar, jedoch müsste hierfür ein anderes Messsystem genutzt werden. So konnten Ando *et al.* (2011) und andere Autoren zwar bereits saubere NIR-Raman-Spektren von Cyanobakterien bei Messdauern unter 30 Sekunden je Probe aufnehmen, jedoch wurden diese Versuche mittels Mikroskop und daran gekoppeltem Raman-System aufgenommen, was stets eine Probenaufbereitung erfordert und somit ein invasives System ist.

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse wurde von weiteren Versuchen mit dem portablen NIR-Raman-System abgesehen.

7 Schlußfolgerung & Bewertung

7.1 Entwickelter Einwegreaktor

Ein Teilziel dieser Arbeit war es, ein geschlossenes Einweg-Reaktorsystem auf der Basis von Polymermaterialien aus dem Lebensmittelbereich zu konzipieren und dessen Eigenschaften als Kultursystem für die Anzucht von marinen Mikroorganismen zu evaluieren.

Bezüglich der Polymermaterialien ist zu konstatieren, dass die verwendeten Materialien sowohl kostengünstig und in großen Mengen zu beschaffen und zu verwenden sind, als auch durch ihren vorgesehenen Einsatz in der Verpackung von Lebensmitteln durch physiologische Unbedenklichkeit überzeugen.

Das verwendete Verfahren zum Verschließen des Systems ist einfach und schnell und bei geeigneter Arbeitsplatzarchitektur komplett steril realisierbar.

Die zur Anzucht photoautotropher Organismen notwendige Gasdurchlässigkeit der Verschlussmaterialien war bei den verwendeten Polymeren nur in bedingtem Maße gegeben. Zum einen weisen viele Polymermaterialien (gerade bei entsprechend großer Foliendicke) eine relativ geringe Permeabilität für CO₂ auf, zum anderen ist gerade die Durchlässigkeit für Sauerstoff oftmals nur minimal. Dies führte in den durchgeführten Wachstumsversuchen bei einigen Versuchsvarianten zu verringerten Wachstumsraten im Vergleich zum gewählten Referenzsystem (mit Alufolie verschlossenen Glaskolben). Lediglich die Verwendung von LDPE-Adhäsionsfolie (welche jedoch nur äußerst schwierig siegelbar ist) erlaubte es, hohe Zelldichten zu erreichen. Kultivierungsversuche mit photoautotrophen Organismen können somit bei nicht optimaler Materialwahl nur bis zu einer gewissen Zelldichte durchgeführt werden, da sonst das Anzuchtsystem an sich wachstumslimitierend wirkt und etwaige Versuchsergebnisse verfälschen kann.

Auf der anderen Seite zeigte sich jedoch, dass aufgrund der Abgeschlossenheit des Systems extreme Langzeitlagerungen einiger Algen- und Cyanobakterienspezies möglich sind, ohne dass es zu Kontaminationen der Versuchskulturen kommt. Dies setzt voraus, dass der Verschlussvorgang unter sterilen Bedingungen erfolgt. Ist dies der Fall, können Standzeiten von mehreren Monaten bis zu Jahren erreicht werden, nach denen die Kulturen zu erneutem Wachstum gebracht werden können. Dies könnte weite-

re Anwendungsmöglichkeiten des Reaktorsystems ermöglichen, beispielsweise bei der Lagerung von Algenspezies in Stammsammlungen oder auch zur Lagerung und zum Transport bzw. zum Containment von (transgenen) Organismen.

Die Möglichkeit zur nicht-invasiven Durchführung von optischen Analysen direkt im geschlossenen Reaktorsystem ist gegeben und wird im folgenden Abschnitt ausführlich diskutiert.

Das Ziel, ein für Screeningversuche nutzbares Reaktorsystem zu entwerfen wurde somit (unter den oben genannten Vorbehalten) erreicht, wobei die Einfachheit des Systems und die trotz allem möglichen Kultivierungs- und Analyseoptionen einen breiten Einsatz in der Erforschung mariner Organismen begünstigen können.

7.2 Optische *In-situ*-Analysen

Neben der reinen Kultivierung verschiedener Organismen im entwickelten Reaktor sollten Möglichkeiten zur Kulturüberwachung und zum gezielten Nachweis (intra-) zellulärer Metabolite direkt im System implementiert und neu erarbeitet werden. Hierzu wurden verschiedene Messtechniken zunächst auf ihre theoretische Eignung zur Anwendung im Reaktor betrachtet, die vielversprechendsten Techniken ausgewählt und innovative Verfahren erprobt und zur Anwendung am System modifiziert.

In der folgenden Tabelle 7.1 ist die bereits im Kapitel zum Stand des Wissens aufgeführte

Tabelle 2.3 um die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse erweitert.

Tabelle 7.1: Zusammenfassender Vergleich der verwendeten optischen Analysemethoden bei Einsatz direkt im geschlossene Reaktor. Als Referenzen dienen Kessler (2006) und Penner (2010), wobei die in Fettschrift dargestellten Daten auf den in dieser Arbeit erzielten Versuchsergebnissen basieren und dem direkten Vergleich mit in der Literatur beschrieben Verfahrenseigenschaften dienen.

Parameter	UV / VIS	NIR	Polarisation		Fluoreszenz	Raman
Wellenlängenbereich (nm)	10 - 380 / 380 - 780 420 - 720	780 - 2500 900 - 1300	420 - 720 bzw. 900 - 1300		$\lambda_{\text{Anregung}}$ z.B. 400-660; $\lambda_{\text{Detektion}}$ z.B. 695 -770	100 - 1064 488 bzw. 1064
			<u>VIS</u>	<u>NIR</u>		
In dieser Arbeit erreichte Vorhersagegenauigkeit ¹ (Vorhersagefehler in mg l ⁻¹)	3,7512 [16,06 %] <i>R² = 0,848</i>	3,5721 [23,03 %] <i>R² = 0,915</i> 5,0118 [21,45 %] <i>R² = 0,775</i>	5,7402 [24,6 %] <i>R² = 0,71</i>	5,1817 [22,2 %] <i>R² = 0,72</i>	-	2,8518 [10,6 %] <i>R² = 0,95</i>
Empfindlichkeit	+++ ++	+ (+) ++	k. A. ---		+++ (+) -	(+) -
Sampling	+++ +++	+++ ++	k. A. +		++ +++	+++ +++
Arbeiten in wässrigem Medium	+++ ++	+ --	k. A. +/-		++ +/-	+++ +++
Universelle Anwendbarkeit für diverse Zielanalyte	+++ +	++ +	k. A. ---		+ --	+ -
Anwendbarkeit für die Prozessanalyse	+++ +++	+++ ++	k. A. --		+ --	+++ ++
Kombinationsmöglichkeit mit Lichtleitern	+++ +++	+++ +++	k. A. ---		+++	+++ +++
Signal	Absorption Extinktion	Absorption Extinktion	Absorption Extinktion		Emission Emission	Streuung Streuung
Signalstabilität des Messsystems	++	++	--		-	+
Relative Kosten	1 2	3-5 4	k. A. 5		4-6 4	8-12 10

1 Angegeben als mittlerer Vorhersagefehler der PHB-Vorhersage in mg l⁻¹ bzw. in eckigen Klammern als prozentualer Anteil des Vorhersagefehlers bezogen auf die Gesamtvarianz der Messdaten einer Versuchsreihe.

Da im Zuge der Messungen leichte Optimierungen am verschiedenen Messverfahren vorgenommen wurden, sind Fett gedruckt die jeweils erreichten geringsten Vorhersagefehler je Verfahren angegeben. In Kursivschrift sind jeweils die Fehler der vierten Versuchsreihe für einen Vergleich der Methoden anhand desselben Datensatzes angegeben.

Es zeigte sich, dass bereits etablierte Spektroskopietechniken relativ einfach an das entwickelte Reaktorsystem **angepasst** werden konnten. Gerade die VIS- sowie die NIR-Spektroskopie konnte weitestgehend an handelsüblichen Spektrometern durchgeführt werden, welche lediglich leicht modifiziert werden mussten um die geschlossenen Reaktorgefäße zu vermessen. Gleiches gilt für die Fluoreszenzanalysen, welche durch gefilterte Bildaufnahmen im Reaktor stattfinden konnten. Die Polarisationspektroskopischen Messungen waren ebenfalls in Standard-Spektrometern durchführbar, jedoch mussten hierfür eigens optische Filter verbaut und exakt ausgerichtet werden, was einen erhöhten apparativen und Versuchsaufwand darstellte. Die Durchführung der Raman-Spektroskopie mittels Faseroptiken war prinzipiell durchführbar, hierbei waren durch das gewählte Versuchsssetup die Streulichtverluste jedoch relativ hoch, so dass eine weitere Anpassung des Systems unabdingbar erscheint um verwendbare Ergebnisse zu erzielen.

Einschränkungen der theoretisch **nutzbaren Wellenlängenbereiche** ergaben sich für fast alle Messmethoden, was in den Material- und Probeneigenschaften begründet liegt. Im kurzwelligen VIS-Bereich sind die Strahlungsdurchlässigkeiten der Reaktoren an sich relativ gering, wodurch der Messbereich zum Kurzwelligen eingeschränkt wird. Gleiches gilt für den NIR-Bereich, in dem sich vor allem die hohe spezifische Absorption der Anzuchtmedien oberhalb von 1300 nm als Problem erwiesen. Da **Wasser** oberhalb dieser Wellenlänge sehr stark die Messstrahlung absorbiert, sind hier keine sinnvollen Ergebnisse erzielbar, was insofern negativ ist, als dass viele Absorptionssignale NIR-aktiver Stoffe erst oberhalb von 1300 nm in quantitativ auswertbarer Intensität auftreten. Auch sind gerade bei der VIS- und NIR-Spektroskopie die messbaren Schichtdicken bzw. Kulturdichten stark eingeschränkt, da sich bei zu hohen Extinktionswerten starke Abweichungen vom Lambert-Beerschen Gesetz ergeben und eine konzentrationsabhängige Signalintensität nicht mehr gegeben ist. Der für optische Messungen nutzbare Spektralbereich ist somit gegenüber stationären Messverfahren, beispielsweise mit Küvetten geringer Schichtdicken, stark eingeschränkt, was zu einem Verlust potenziell aufnehmbarer Informationen führt.

Betrachtet man die **Selektivität** der einzelnen Verfahren bei ihrer Anwendung im Reaktor, so ergibt sich ein durchaus gemischtes Bild, dessen Bewertung je nach Fragestellung durchaus variieren kann. Im Zuge der VIS-Spektroskopie äußert sich dies dahinge-

hend, dass zwar Stoffe, welche keine konjugierten Doppelbindungssysteme aufweisen keine verwertbaren Signale zeigen und somit nicht detektiert werden können. Will man jedoch solche Stoffe quantifizieren, welche im sichtbaren Spektrum Strahlung absorbieren oder lediglich anhand auftretender Pigmentierungen o.ä. indirekte Aussagen treffen, so ist dies durchaus möglich. Gleiches gilt für die NIR-Spektroskopie, wobei die wässrigen Kulturmedien bei der Vermessung von Kultursuspensionen das größte Problem darstellen. In den durchgeführten Messungen zeigte sich jedoch, dass auch im verschlossenen Reaktor spezifisch intrazelluläre Metabolite detektiert und quantifiziert werden können. Die Selektivität der Chlorophyllfluoreszenzmessungen war (zumindest im Hinblick auf Korrelationen mit der intrazellulären PHB-Synthese) äußerst begrenzt. Zwar konnten belastbare Fluoreszenzdaten direkt im Reaktor erhoben werden, da den gemessenen Stresssignalen jedoch nur anhand der Messdaten keinerlei Ursächlichkeit sinnvoll zugewiesen werden kann, kann diesem Verfahren im Hinblick auf eine nicht-invasive Quantifizierung von Inhaltsstoffen wenn überhaupt eine unterstützende Aufgabe zukommen um die Ergebnisse anderer Messverfahren physiologisch zu kompletieren. Die theoretisch sehr selektiven Ergebnisse von Raman-spektroskopischen Messungen konnten in dieser Arbeit leider nicht erreicht werden. Die Messungen direkt im Reaktor waren lediglich bei unnatürlich hohen Analytkonzentrationen erfolgreich, wobei die Qualität der gemessenen Raman-Spektren in keinsten Weise analytischen Ansprüchen genügte. Zwar konnten vereinzelt Raman-Peaks gemessen werden, jedoch nur von resonant angeregten Pigmenten und nicht vom ausgewählten Beispielanalyt. Es ist fraglich, inwiefern apparative und versuchstechnische Verbesserungen des genutzten Messsystems es ermöglichen, qualitativ hochwertige Raman-Spektren direkt im Reaktor zu messen, vermutlich ist die potenziell erzielbare Spezifität der Methode praktisch nicht im Reaktorsystem erreichbar. Die durchgeführten polarisationsspektroskopischen Messungen brachten im Vergleich zur nicht-polarisierten Versuchsanlage keine nennenswerten Verbesserungen in der Selektivität, hier ist jedoch ein großes Potenzial für weitere Experimente gegeben, da gerade für den NIR-Bereich kaum vergleichbare Arbeiten existieren. Hierbei sind jedoch weitere Versuche notwendig, um konstante Polarisationsseigenschaften des Messlichtes nach Eintritt in die Reaktoren zu garantieren.

Da alle spektroskopischen Messungen direkt im Reaktor stattfanden, wurden im VIS- und NIR-Bereich Extinktionsspektren aufgenommen, in welchen sich Absorptions- und Streueffekte überlagerten. Durch die Verwendung von Ulbricht-Kugeln oder ähnlichen Aufbauten könnten die **Streulichtanteile** dem Messprozess jedoch erhalten bleiben, wodurch eine Aufnahme reiner Absorptionsspektren möglich wäre. Das gleiche Prinzip könnte zur Aufnahme von Raman-Spektren angewandt werden, wodurch theoretische sauberere Spektren erzielt würden und die Selektivität generell erhöht würde.

Die mittels der verschiedenen Methoden erzielte **Messempfindlichkeit** unterschied sich sehr stark voneinander. So konnten im VIS- und im NIR-Bereich auch Analysuspensionen sehr geringer Konzentrationen zuverlässig voneinander unterschieden werden, während dies per Raman-Spektroskopie bzw. Fluoreszenzanalysen nicht möglich war. Somit sind die erstgenannten Techniken im Hinblick auf die durchgeführten Versuche vom Empfindlichkeitsverhalten zwar klar zu bevorzugen, sollen jedoch beispielsweise fluoreszenzmarkierte Stoffe quantifiziert werden, so sind auch entsprechende Messungen direkt im System möglich und gegebenenfalls zu favorisieren.

Betrachtet man den **apparativen Aufwand**, so ist zu bemerken, dass dieser naturgemäß von bereits existenter Infrastruktur abhängig ist. Messungen im VIS- sowie im NIR-Bereich sind ohne weiteres direkt in lediglich leicht modifizierten Standardspektrometern durchführbar, was ohne Zweifel ein unschätzbare Vorteil des entwickelten Reaktorsystems ist. Ob die zur Aufnahme von Polarisationspektren nötigen optischen Filter eine Anschaffung wert sind, ist nach Evaluierung der durchgeführten Versuche zumindest fraglich. Was jedoch offensichtlich ist, ist der erhöhte Aufwand der durch diese Art der Messungen entsteht. So bietet die Montage der Filter im Messsystem, sowie ihre stets exakte Ausrichtung ein nicht unerhebliches Potenzial zur Einführung von Messfehlern, was einem breiten Einsatz dieser Technik entgegensteht. Gleiches gilt für die Raman-spektroskopischen Messungen, welche definitiv den höchsten Messaufwand der genutzten Techniken besitzen. Neben den nötigen hochwertigen und teuren Apparaturen ist eine äußerst exakte Ausrichtung sowie Kalibrierung des Systems in kurzen Zeitintervallen notwendig, was eine Verwendung von nicht extrem standardisierten Systemen für die Stoffquantifizierung im Reaktor verhindert.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass VIS- und NIR-spektroskopische Messungen apparativ am einfachsten waren, Raman-spektroskopische Messungen jedoch die besten PHB-Vorhersageergebnisse erlaubten und diese Technik (zumindest perspektivisch) das große Potenzial für eine stoffspezifische *In-situ*-Detektion von Inhaltsstoffen zeigt.

Speziell im Hinblick auf die *In-situ*-Bestimmung von PHB lässt sich sagen, dass dieser Beispielanalyt aufgrund fehlender Absorption im VIS-Bereich sowie aufgrund fehlenden Resonanzverhaltens bei Raman-Messungen schwer zu detektieren ist. Dies zeigte sich auch dadurch, dass außer im NIR-Bereich (in dem zumindest teilweise von einer stoffspezifischen Detektion ausgegangen werden kann) keine direkte Quantifizierung stattfand, sondern dies lediglich indirekt gelang.

Die erreichten Fehlerwerte der chemometrischen PHB-Bestimmung sollten dabei zumindest für grobe Screeninganwendungen ausreichen, für genauere *In-situ*-PHB-Quantifizierungen ist das vorgestellte System jedoch nur bedingt geeignet.

8 Ausblick

Im entwickelten Reaktor ist die Kultur photoautotropher Organismen möglich und zudem sind verschiedene Analysetechniken (zumindest prinzipiell) für einen *In-situ*-Einsatz am geschlossenen System adaptierbar.

Raum für Verbesserungen zeigte sich vor allem bei den verwendeten Verschlussfolien, welche in ihrer Gasdurchlässigkeit teilweise sehr limitiert sind und somit potenziell wachstumshemmend wirken. Die Erprobung von Materialien mit höheren Durchlässigkeiten bzw. die Integration von Verschlusselementen, welche einen höheren Gasaustausch ermöglichen, ist ein Ansatzpunkt um das System auch zur Anzucht von Kulturen mit hohen Zelldichten nutzen zu können.

Im Zuge der optischen Analysen zeigten sich klassische Eigenschaften spektroskopischer Messungen (wie beispielsweise die Aufnahme von Extinktionsspektren anstatt reiner Absorptionsspektren) welche durch veränderte Versuchsaufbauten gelöst werden können. Hier liegt großes Potenzial um qualitativ noch hochwertigere Spektraldaten zu erfassen.

Im VIS-spektroskopischen Teil zeigte sich, dass es prinzipiell möglich ist, Metabolite indirekt über Veränderungen im Pigmenthaushalt zu quantifizieren. Wenn dieser metabolische Zusammenhang zwischen Zielanalyt und vermessener Pigmentierung konsistent ist, sollten auch indirekte Nachweise anderer Stoffe möglich sein, was in weiteren Arbeiten zu prüfen wäre.

Im NIR-Bereich sind aufgrund der extrem starken Absorption von wässrigen Kulturmedien oberhalb von 1300 nm kaum weitere Verbesserungen im Hinblick auf nutzbare Messbereiche denkbar. Eine weitere Standardisierung der durchgeführten Messungen direkt in geschlossenen Reaktoren scheint einer der Hauptansatzpunkte für verbesserte Qualität von Messdaten zu sein. Speziell die Aufnahme von (Fourier transformierten) Interferogrammen im Gegensatz zur dispersiven Aufnahme verschiedener Wellenlängen nacheinander dürfte zu besserer Güte der gemessenen Spektraldaten führen, da innerhalb der Aufnahme eines Spektrums Störeffekte wie beispielsweise ein Absinken der Probe o.ä. ausgeschlossen wird.

Bei Verwendung polarisationsspektroskopischer Methoden scheinen für Messungen innerhalb der Reaktoren lediglich Verbesserungen möglich, wenn bei der Auswahl der Siegelmaterialien strikt darauf geachtet wird, dass isotrope Materialien verwendet werden, welche polarisierte Messstrahlung transmittieren ohne ihren Polarisationszustand zu verändern. Die Verwendung von Siegelfolien aus Polyethylen geringer Dichte, welche polarisierte Messstrahlung unverändert transmittieren, kann hier bereits zu reproduzierbareren Ergebnissen verhelfen. Polarisationspektroskopische Messungen sind nur schwer in Plastikreaktoren zu realisieren. Der Einsatz von Polarisationspektroskopischen Methoden dürfte vor allem für Messungen in optisch isotropen Reaktor-gefäßen Verbesserungen erbringen.

Die Implementierung Raman-Spektroskopischer Messungen gelang nur begrenzt, wobei auch hier Raum für Verbesserungen ersichtlich wurde. So könnten veränderte Versuchsaufbauten (wie beispielsweise Ulbricht-Kugeln) Fortschritte mit sich bringen und unlängst publizierte Arbeiten, in welchen beispielsweise frequenzverschobene Laseranregungen genutzt wurden (Noack *et al.*, 2013), legen nahe, dass bessere Ergebnisse erreichbar sind, als die in dieser Arbeit erzielten.

Verfahren zur Ortsaufgelösten Analyse von Kultursuspensionen (so wie sie Anhang dieser Arbeit beschrieben werden) könnten zudem als weitere Techniken genutzt werden um auch morphologische Parameter von Kultursuspensionen und einzelnen Zellen *in situ* zu bestimmen.

9 Literaturverzeichnis

- Abbate, S., Longhi, G., Santina, C. (2000) Theoretical and Experimental Studies for the Interpretation of Vibrational Circular Dichroism Spectra in the CH-Stretching Overtone Region; *Chirality*, 12: 180-190
- Abbate, S., Castiglioni, E., Gangemi, F., Gangemi, R., Longhi, G. (2009) NIR-VCD, Vibrational Circular Dichroism in the Near-Infrared: Experiments, Theory and Calculations; *Chirality*, 21: E242-E252
- Abbate, S., Gangemi, R., Lebon, F., Longhi, G., Passarello, M., Ruggirello, A., Liveri, V. T. (2012) Investigations of methyl lactate in the presence of reverse micelles by vibrational spectroscopy and circular dichroism; *Vibrational Spectroscopy*, 60: 54-62
- Abdelaziz, A. E. M., Leite, G. B., Belhaj, M. A., Hallenbeck, P. C. (2014) Screening microalgae native to Quebec for wastewater treatment and biodiesel production; *Bioresource Technology*, 157: 140-148
- Acreman, J. (1994) Algae and cyanobacteria: isolation, culture and long-term maintenance; *Journal of Industrial Microbiology*, 13: 193-194
- Aguirre-Gomez, R., Weeks, A. R., Boxall, S. R. (2001) The identification of phytoplankton pigments from absorption spectra; *International Journal of Remote Sensing*, 22, No. 2: 315-338
- Alexandre, M. T. A., Gundermann, K., Pascal, A. A., Van Grondelle, R., Büchel, C., Robert, B. (2014) Probing the carotenoid content of intact *Cyclotella* cells by resonance Raman spectroscopy; *Photosynthesis Research*, 119, No. 3: 273-281
- Allison, F. E., Hoover, S. R., Morris, H. J. (1937) Physiological Studies with the Nitrogen-Fixing Alga, *Nostoc Muscorum*; *Botanical Gazette*, 98, No. 3: 433-463
- Almon, H., Böhme, H. (1980) Components and activity of the photosynthetic electron transport system of intact heterocysts isolated from the blue-green alga *Nostoc muscorum*; *Biochimica et Biophysica Acta*, 592: 113-120
- Alper, R., Lundgren, D. G., Marchessault, R. H., Cote, W. A. (1963) Properties of Poly- β -Hydroxybutyrate. I. General Considerations Concerning the Naturally Occurring Polymer; *Biopolymers*, 1: 545-556

- American College of Toxicology (1982) Final Report on the Safety Assessment of Glyceryl Stearate and Glyceryl Stearate/SE; *International Journal of Toxicology*, 1, No. 4: 169-192
- Ando, M., Sugiura, M., Hayashi, H., Hamaguchi, H. (2011) 1064 nm Deep Near-Infrared (NIR) Excited Raman Microspectroscopy for Studying Photolabile Organisms; *Applied Spectroscopy*, 65, No. 5: 488-492
- Andrizhiyevskaya, E. G., Schwabe, T. M. E., Germano, M., D'Haene, S., Kruij, J., Van Grondelle, R., Dekker, J. P. (2002) Spectroscopic properties of PSI-IsiA supercomplexes from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942; *Biochimica et Biophysica Acta*, 1556: 265-272
- Anonym (2014) Konformitätserklärung für Materialien aus Kunststoff, die mit Lebensmitteln in Kontakt kommen. Hier: Polypropylen Dressingboxx 80cc; Erhalten von der Firma W. Peter Schäfer GmbH, Garbsen
- Arima, H., Horiguchi, N., Takaichi, S., Kofuji, S., Ishida, K.-I., Wada, K., Sakamoto, T. (2012) Molecular genetic and chemotaxonomic characterization of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* and its neighboring species; *FEMS Microbiology Ecology*, 79, No. 1: 34-45
- Arruebarrena de Báez, M., Hendra, P. J., Judkins, M. (1995) The Raman spectra of oriented isotactic polypropylene; *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 51, No. 12: 2117-2124
- Årsköld, S. P., Masters, V. M., Prince, B. J., Smith, P. J., Pace, R. J., Krausz, E. (2003) Optical Spectra of *Synechocystis* and Spinach Photosystem II Preparations at 1.7 K: Identification of the D1-Pheophytin Energies and Stark Shifts; *Journal of the American Chemical Society*, 125: 13063-13074
- Årsköld, S. P., Smith, P. J., Shen, J.-R., Pace, R. J., Krausz, E. (2005) Key cofactors of Photosystem II cores from four organisms identified by 1.7-K absorption, CD and MCD; *Photosynthesis Research*, 84: 309-316
- Asada, Y., Miyake, M., Miyake, J., Kurane, R., Tokiwa, Y. (1999) Photosynthetic accumulation of poly-(hydroxybutyrate) by cyanobacteria - the metabolism and potential for CO₂ recycling; *International Journal of Biological Macromolecules*, 25: 37-42

- Au, S. H., Shih, S. C. C., Wheeler, A. R. (2011) Integrated microbioreactor for culture and analysis of bacteria, algae and yeast; *Biomedical Microdevices*, 13: 41-50
- Bae, S., Kim, C. W., Choi, J. S., Yang, J.-W., Seo, T. S. (2013) An integrated microfluidic device for the high-throughput screening of microalgal cell culture conditions that induce high growth rate and lipid content; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405: 9365-9374
- Bain, K. F., Vergés, A., Poore, A. G. B. (2013) Using near infra red reflectance spectroscopy (NIRS) to quantify tissue composition in the seagrass *Posidonia australis*; *Aquatic Botany*, 111: 66-70
- Baker, N. R. (2008) Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo; *Annual Review of Plant Biology*, 59: 89-113
- Balan, R., Suraishkumar, G. K. (2014) Simultaneous Increases in Specific Growth Rate and Specific Lipid Content of *Chlorella vulgaris* Through UV-Induced Reactive Species; *Biotechnology Progress*, 30, No. 2: 291-299
- Barletta, R. E., Krause, J. W., Goodie, T., El Sabae, H. (2015) The direct measurement of intracellular pigments in phytoplankton using resonance Raman spectroscopy; *Marine Chemistry*, 176: 164-173
- Barnes, P. (1997) Determining Migration of GMS Antistat in Polypropylene; *Journal of Vinyl & Additive Technology*, 3, No. 1: 70-76
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., Lister, S. J. (1989) Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra; *Applied Spectroscopy*, 43, No. 5: 772-777
- Barsanti, L., Evangelista, V., Frassanito, A. M., Vesentini, N., Passarelli, V., Gualtieri, P. (2007) Absorption microspectroscopy, theory and applications in the case of the photosynthetic compartment; *Micron*, 38: 197-213
- Baumruk, V., Keiderling, T. A. (1993) Vibrational Circular Dichroism of Proteins in H₂O Solution; *Journal of the American Chemical Society*, 115: 6939-6942
- Benavides, M., Mailier, J., Hantson, A.-L., Muñoz, G., Vargas, A., Van Impe, J., Vande Wouwer, A. (2015) Design and Test of a Low-Cost RGB Sensor for Online Measurement of Microalgae Concentration within a Photo-Bioreactor; *Sensors*, 15, No. 3: 4766-4780

- Beyerinck, M.W. (1890). Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen; *Botanische Zeitung*, 45: 725-739
- Berman-Frank, I., Chen, Y. B., Gerchman, Y., Dismukes, G. C., Falkowski, P. G. (2005) Inhibition of nitrogenase by oxygen in marine cyanobacteria controls the global nitrogen and oxygen cycles; *Biogeosciences*, 2: 261-273
- Beutler, M. (2003) Spectral fluorescence of chlorophyll and phycobilins as an *in-situ* tool of phytoplankton analysis – models, algorithms and instruments (Dissertation); Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Bhati, R., Samantaray, S., Sharma, L., Mallick, N. (2010) Poly- β -hydroxybutyrate Accumulation in Cyanobacteria Under Photoautotrophy; *Biotechnology Journal*, 5: 1181-1185
- Bialek-Bylka, G. E., Sofrová, D., Szurkowski, J., Skwarek, R., Sopko, B., Manikowski, H. (2000) Linear dichroism, fluorescence polarization, and path of the thermal deactivation of excited cyanobacterial (*Synechococcus elongates*) photosystem 1 immobilized and oriented in polymer films; *Photosynthetica*, 38, No. 1: 143-148
- Biggins, J., Svejkský, J. (1980) Linear Dichroism of Microalgae, Developing Thylakoids and Isolated Pigment-Protein Complexes in Stretched Poly(Vinyl Alcohol) Films at 77 K; *Biochimica et Biophysica Acta*, 592: 565-576
- Blumwald, E., Tel-Or, E. (1982a) Structural Aspects of the Adaptation of *Nostoc muscorum* to Salt; *Archives of Microbiology*, 132: 163-167
- Blumwald, E., Tel-Or, E. (1982b) Osmoregulation and Cell Composition in Salt-Adaptation of *Nostoc muscorum*; *Archives of Microbiology*, 132: 168-172
- Bohmert, K., Balbo, I., Kopka, J., Mittendorf, V., Nawrath, C., Poirier, Y., Tischendorf, G., Trethewey, R. N., Willmitzer, L. (2000) Transgenic Arabidopsis plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4% of their fresh weight; *Planta*, 211: 841-845
- Bohmert-Tatarev, K., McAvoy, S., Daughtry, S., Peoples, O. P., Snell, K. D. (2011) High levels of bioplastic are produced in fertile transplastomic tobacco plants engineered with a synthetic operon for the production of polyhydroxybutyrate; *Plant Physiology*, 155: 1690-1708
- Borowitzka, M. A. (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters; *Journal of Biotechnology*, 70: 313-321

- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., Fuller, R. C. (1990) Plastics from Bacteria and for Bacteria: Poly(β -Hydroxyalkanoates) as Natural, Biocompatible, and Biodegradable Polyester; *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 41: 77-93
- Brereton, R. G. (2007) *Applied Chemometrics for Scientists*; Verlag John Wiley & Sons, West Sussex
- Brown, M. R., Frampton, D. M. F., Dunstan, G. A., Blackburn, S. I. (2014) Assessing near-infrared reflectance spectroscopy for the rapid detection of lipid and biomass in microalgae cultures; *Journal of Applied Phycology*, 26: 191-198
- Bustamante, C., Tinoco Jr., I., Maestre, M. F. (1983) Circular differential scattering can be an important part of the circular dichroism of macromolecules; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 3568-3572
- Cámara, R. M., Portela, R., Gutiérrez-Artin, F., Sánchez, B. (2014) Evaluation of Several Commercial Polymers as Support for TiO₂ in Photocatalytic Applications; *Global NEST Journal*, 16, No. 3: 525-535
- Campbell, D., Hurry, V., Clarke, A., Gustafsson, P., Öquist, G. (1998) Chlorophyll Fluorescence Analysis of Cyanobacterial Photosynthesis and Acclimation; *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, No. 3: 667-683
- Canto de Loura, I., Dubacq, J. P., Thomas, J. C. (1987) The Effects of Nitrogen Deficiency on Pigments and Lipids of Cyanobacteria; *Plant Physiology*, 83: 838-843
- Cao, X., Shah, R. D., Dukor, R. K., Guo, C., Freedman, T. B., Nafie, L. A. (2004) Extension of Fourier Transform Vibrational Circular Dichroism into the Near-Infrared Region: Continuous Spectral Coverage from 800 to 10 000 cm⁻¹; *Applied Spectroscopy*, 58, No. 9: 1057-1064
- Cavonius, L., Fink, H., Kiskis, J., Albers, E., Undeland, I., Enejder, A. (2015) Imaging of Lipids in Microalgae with Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy; *Plant Physiology*, 167: 603-616
- Challagulla, V., Walsh, K. B., Subedi, P. (2014) Biomass and Total Lipid Content Assessment of Microalgal Cultures Using Near and Short Wave Infrared Spectroscopy; *BioEnergy Research*, 7, No. 1: 306-318
- Challagulla, V., Walsh, K. B., Subedi, P. (2016) Microalgal fatty acid composition: rapid assessment using near-infrared spectroscopy; *Journal of Applied Phycology*, 28: 85-94

- Chen, G.-Q. (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry; *Chemical Society Reviews*, 38: 2434-2446
- Chen, M., Mertiri, T., Holland, T., Basu, A. S. (2012) Optical microplates for high-throughput screening of photosynthesis in lipid-producing algae; *Lab on a Chip*, 12: 3870-3874
- Chen, Y.-H., Yang, J. T., Martinez, H. M. (1972) Determination of the Secondary Structures of Proteins by Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion; *Biochemistry*, 11, No. 22: 4120-4131
- Chen, Y., Zhang, J., Luo, J., Tu, J.-M., Zeng, X.-L., Xie, J., Zhou, M., Zhao, J.-Q., Scheer, H., Zhao, K.-H. (2012) Photophysical diversity of two novel cyanobacteriochromes with phycocyanobilin chromophores: photochemistry and dark reversion kinetics; *FEBS Journal*, 279: 40-54
- Ciobotă, V., Burkhardt, E.-M., Schumacher, W., Rösch, P., Küsel, K., Popp, J. (2010) The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397: 2929-2937
- Cirés, S., Alvarez-Roa, C., Heimann, K. (2015) First use of the WAVE™ disposable rocking bioreactor for enhanced bioproduct synthesis by N₂-fixing cyanobacteria; *Biotechnology and Bioengineering*, 112, No. 3: 621-626
- Clyde, E. H. (1958) The Micro-Element Nutrition of *Nostoc Muscorum*; *The Ohio Journal of Science*, 58, No. 1: 25-33
- Collet, P., Hélias, A., Lardon, L., Ras, M., Goy, R.-A., Steyer, J.-P. (2011) Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production; *Bioresource Technology*, 102: 207-214
- Coltelli, P., Barsanti, L., Evangelista, V., Frassanito, A. M., Passarelli, V., Gualtieri, P. (2013) Automatic and real time recognition of microalgae by means of pigment signature and shape; *Environmental Science Processes & Impacts*, 15: 1397-1410
- Cox, A. J., DeWeerd, A. J., Linden, J. (2002) An experiment to measure Mie and Rayleigh total scattering cross sections; *American Journal of Physics*, 70, No. 6: 620-625
- Curcio, J. A., Petty, C. C. (1951) The Near Infrared Absorption Spectrum of Liquid Water; *Journal of the Optical Society of America*, 41, No. 5: 302-304
- Das, M., Rabinowitch, E., Szalay, L., Papageorgiou, G. (1967) The "Sieve Effect" in *Chlorella suspensions*; *Journal of Physical Chemistry*, 71, No. 11: 3543-3549

- Davis, R. W., Wu, H., Singh, S. (2014) Multispectral sorter for rapid, nondestructive optical bioprospecting for algae biofuels; *Proceedings of SPIE 8947, Imaging, Manipulation and Analysis of Biomolecules, Cells and Tissues XII*, 89471E: 1-11
- De Gelder, J., Willemse-Erix, D., Scholtes, M. J., Sanchez, J. I., Maquelin, K., Vandenabeele, P., De Boever, P., Puppels, G. J., Moens, L., De Vos, P. (2008) Monitoring Poly(3-hydroxybutyrate) Production in *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16) with Raman Spectroscopy; *Analytical Chemistry*, 80, No. 6: 2155-2160
- De Oliveira, V., Castro, H. V., Edwards, H. G. M., De Oliveira, L. F. C. (2010) Carotenenes and carotenoids in natural biological samples: a Raman spectroscopic analysis; *Journal of Raman Spectroscopy*, 41: 642-650
- De Oliveira, V. E., Neves Miranda, M. A. C., Silva Soares, M. C., Edwards, H. G. M., Cappa de Oliveira, L. F. (2015) Study of carotenoids in cyanobacteria by Raman spectroscopy; *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 150: 373-380
- Dementjev, A., Kostkeviciene, J. (2013) Applying the method of Coherent Anti-stokes Raman microscopy for imaging of carotenoids in microalgae and cyanobacteria; *Journal of Raman Spectroscopy*, 44: 973-979
- Di Pippo, F., Ellwood, N. T. W., Gismondi, A., Bruno, L., Rossi, F., Magni, P., De Philippis, R. (2013) Characterization of exopolysaccharides produced by seven biofilm-forming cyanobacterial strains for biotechnological applications; *Journal of Applied Phycology*, 25: 1697-1708
- Donner, S., Müller, O., Witte, F., Bartscha, I., Willbold, E., Ripken, T., Heisterkamp, A., Rosenhahn, B., Krüger, A. (2013) *In situ* optical coherence tomography of percutaneous implant-tissue interfaces in a murine model; *Biomedizinische Technik*, 58, No. 4: 359-367
- Drake, A. F. (1986) Polarisation modulation - the measurement of linear and circular dichroism; *Journal of Physics E: Scientific Instruments*, 19: 170-181
- Dunteman, G. H. (1989) *Principal Components Analysis*; Verlag SAGE Publishing, Thousand Oaks
- Egbers, G. (2005) *Methodische Ansätze zur Etablierung eines photoautotrophen In-vitro-Kulturverfahrens (Dissertation)*; *Gartenbautechnische Informationen*, Heft 62

- Engelmann, E., Tagliabue, T., Karapetyan, N. V., Garlaschi, F. M., Zucchelli, G., Jennings, R. C. (2001) CD spectroscopy provides evidence for excitonic interactions involving red-shifted chlorophyll forms in photosystem I; *FEBS Letter*, 499: 112-115
- Fagerer, S. R., Schmid, T., Ibañez, A. J., Pabst, M., Steinhoff, R., Jefimovs, K., Urban, P. L., Zenobi, R. (2013) Analysis of single algal cells by combining mass spectrometry with Raman and fluorescence mapping; *Analyst*, 138: 6732-6736
- Funke, M., Diederichs, S., Kensy, F., Müller, C., Büchs, J. (2009) The Baffled Microtiter Plate: Increased Oxygen Transfer and Improved Online Monitoring in Small Scale Fermentations; *Biotechnology and Bioengineering*, 103, No. 6: 1118-1128
- Furukawa, T., Watari, M., Siesler, H. W., Ozaki, Y. (2002) Discrimination of Various Poly(propylene) Copolymers and Prediction of Their Ethylene Content by Near-Infrared and Raman Spectroscopy in Combination with Chemometric Methods; *Journal of Applied Polymer Science*, 87, No. 4: 616-625
- Gaigalas, A. K., He, H.-J., Wang, L. (2009) Measurement of Absorption and Scattering With an Integrating Sphere Detector: Application to Microalgae; *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 114, No. 2: 69-81
- Galvão, R. K. H., Araujo, M. C. U., José, G. E., Pontes, M. J. C., Silva, E. C., Saldanha, T. C. B. (2005) A method for calibration and validation subset partitioning; *Talanta*, 67: 736-740
- Garab, G., Van Amerongen, H. (2009) Linear dichroism and circular dichroism in photosynthesis research; *Photosynthesis Research*, 101: 135-146
- Garcia-Sucerquia, J., Xu, W., Jericho, S. K., Klages, P., Jericho, M. H., Kreuzer, J. (2006) Digital in-line holographic microscopy; *Applied Optics*, 45, No. 5: 836-850
- Ge, Y., Thomasson, J. A. (2016) NIR reflectance and MIR attenuated total reflectance spectroscopy for characterizing algal biomass composition; *Transactions of the ASABE*, 59, No. 2: 435-442
- Geiseler, G., Seidel, H. (1977) Die Wasserstoffbrückenbindung; Akademie-Verlag, Berlin
- Geladi, P., Kowalski, B. R. (1986) PARTIAL LEAST-SQUARES REGRESSION: A TUTORIAL; *Analytica Chimica Acta*, 185: 1-17
- Georgakopoulou, S., Van Der Zwan, G., Olsen, J. D., Hunter, N., Niederman, R. A., Van Grondelle, R. (2006) Investigation of the Effects of Different Carotenoids on

- the Absorption and CD Signals of Light Harvesting 1 Complexes; *The Journal of Physical Chemistry B*, 110: 3354-3361
- Gitelson, A., A., Schalles, J. F., Rundquist, D. C., Schiebe, F. R., Yacobi, Y. Z. (1999) Comparative reflectance properties of algal cultures with manipulated densities; *Journal of Applied Phycology*, 11: 345-354
 - González Torres, M., Galego Fernández, N., Ortiz del Toro, P., Rapado Paneque, M. (2007) Raman spectroscopy of poly (3-hydroxybutyrate) modified with poly (vinyl acetate) by radiation-induced copolymerization; *Nucleus*, 42: 41-45
 - Goss, R., Wilhelm, C., Garab, G. (2000) Organization of the pigment molecules in the chlorophyll a/b/c containing alga *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae) studied by means of absorption, circular and linear dichroism spectroscopy; *Biochimica et Biophysica Acta*, 1457: 190-199
 - Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J., Empis, J. (1996) Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*; *Bioresource Technology*, 57: 157-163
 - Graham, P. J., Riordon, J., Sinton, D. (2015) Microalgae on display: a microfluidic pixel-based irradiance assay for photosynthetic growth; *Lab on a Chip*, 15, No. 7: 3116-3124
 - Gray, B. H., Lipschultz, C. A., Gantt, E. (1973) Phycobilisomes from a Blue-Green Alga *Nostoc* Species; *Journal of Bacteriology*, 116, No. 1: 471-478
 - Grossman, A. R. (2003) A molecular understanding of complementary chromatic adaptation; *Photosynthesis Research*, 76, No. 1-3: 207-215
 - Guihéneuf, F., Stengel, D. B. (2015) Towards the biorefinery concept: Interaction of light, temperature and nitrogen for optimizing the co-production of high-value compounds in *Porphyridium purpureum*; *Algal Research*, 10: 152-163
 - Guillard, R. R. L., Sieracki, M. S. (2005) Counting Cells in Cultures with the Light Microscope; In: Andersen, R. A. (Hrsg.) *Algal Culturing Techniques* (S. 239-252); Verlag Elsevier, Amsterdam
 - Guiry, M. D. (2012) How many species of algae are there?; *Journal of Phycology*, 48: 1057-1063
 - Guisheng, F., Incarnato, L., Di Maio, L., Acierno, D. (1995) Discussion about the use of relative values of permeabilities between two gases for high molecular weight polymers; *Polymer*, 36, No. 22: 4345-4346

- Gumel, A. M., Annuar, M. S. M., Chisti, Y. (2013) Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates; *Journal of Polymers and the Environment*, 21: 580-605
- Guo, C., Shah, R. D., Dukor, R. K., Freedman, T. B., Cao, X., Nafie, L. A. (2006) Fourier transform vibrational circular dichroism from 800 to 10,000 cm⁻¹: Near-IR-VCD spectral standards for terpenes and related molecules; *Vibrational Spectroscopy*, 42: 254-272
- Guo, X., Wood, M. F. G., Vitkin, A. (2006) Angular measurements of light scattered by turbid chiral media using linear Stokes polarimeter; *Journal of Biomedical Optics*, 11, No. 4 (041105): 1-10
- Haase, S. M., Huchzermeyer, B., Rath, T. (2012) PHB accumulation in *Nostoc muscorum* under different carbon stress situations; *Journal of Applied Phycology*, 24, No. 2: 157-162
- Hahne, T., Schwarze, B., Kramer, M., Frahm, B. (2014) Disposable algae cultivation for high-value products using all around LED-illumination directly on the bags; *Journal of Algal Biomass Utilization*, 5, No. 2: 66-73
- Han, A., Hou, H., Li, L., Kim, H. S., de Figueiredo, P. (2013) Microfabricated devices in microbial bioenergy sciences; *Trends in Biotechnology*, 31, No. 4: 225-232
- Hanson, M. A., Ge, X., Kostov, Y., Brorson, K. A., Moreira, A. R., Rao, G. (2007) Comparisons of Optical pH and Dissolved Oxygen Sensors With Traditional Electrochemical Probes During Mammalian Cell Culture; *Biotechnology and Bioengineering*, 97, No. 4: 833-841
- Harms, P., Kostov, Y., French, J. A., Soliman, M., Anjanappa, M., Ram, A., Rao, G. (2006) Design and Performance of a 24-Station High Throughput Microbioreactor; *Biotechnology and Bioengineering*, 93, No. 1: 6-13
- Havlik, I., Reardon, K. F., Ünal, M., Lindner, P., Prediger, A., Babitzky, A., Beutel, S., Scheper, T. (2013a) Monitoring of microalgal cultivations with on-line, flow-through microscopy; *Algal Research*, 2: 253-257
- Havlik, I., Lindner, P., Scheper, T., Reardon, K. F. (2013b) On-line monitoring of large cultivations of microalgae and cyanobacteria; *Trends in Biotechnology*, 31, No. 7: 406-414

- Hay, K. B., Millers, K. A. (2010) The use of near infrared reflectance spectrometry for characterization of brown algal tissue; *Journal of Phycology*, 46: 937-946
- Haywood, G. W., Anderson, A. J., Dawes, E. A. (1989) The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*; *FEMS Microbiology Letters*, 57: 1-6
- Heraud, P., Wood, B., R., Beardall, J., McNaughton, D. (2006) Effects of pre-processing of Raman spectra on in vivo classification of nutrient status of microalgal cells; *Journal of Chemometrics*, 20: 193-197
- Heraud, P.; Beardall, J.; McNaughton, D.; Wood, B.R. (2007) In vivo prediction of the nutrient status of individual microalgal cells using Raman microspectroscopy; *FEMS Microbiology Letters*, 275: 24-30
- Hirose, Y., Fujisawa, T., Ohtsubo, Y., Katayama, M., Misawa, N., Wakazuki, S., Shimura, Y., Nakamura, Y., Kawachi, M., Yoshikawa, H., Eki, T., Kanesaki, Y. (2016) Complete genome sequence of cyanobacterium *Nostoc* sp. NIES-3756, a potentially useful strain for phytochrome-based bioengineering; *Journal of Biotechnology*, 218: 51-52
- Horn, S. J., Moen, E., Østgaard, K. (1999) Direct determination of alginate content in brown algae by near infra-red (NIR) spectroscopy; *Journal of Applied Phycology* 11: 9-13
- Huang, C., Chen, C. (2005) Physical Properties of Culture Vessels for Plant Tissue Culture; *Biosystems Engineering*, 91, No. 4: 501-511
- Huang, Y. Y., Beal, C. M., Cai, W. W., Ruoff, R. S., Terentjev, E. M. (2010) Micro-Raman Spectroscopy of Algae: Composition Analysis and Fluorescence Background Behavior; *Biotechnology and Bioengineering*, 105, No. 5: 889-898
- Hyka, P., Lickova, S., Přibyl, P., Melzoch, K., Kovar, K. (2013) Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae; *Biotechnology Advances*, 31: 2-16
- Jackson, M. B. (2005) Aeration stress in plant tissue cultures; In: Hvoslef-Eide, A. K., Preil, W. (Hrsg.) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (S. 459-473); Verlag Springer, Berlin
- Jaeger, D., Pilger, C., Hachmeister, H., Oberländer, E., Wördenweber, R., Wichmann, J., Mussnug, J. H., Huser, T., Kruse, O. (2016) Label-free *in vivo* analysis of

- intracellular lipid droplets in the oleaginous microalga *Monoraphidium neglectum* by coherent Raman scattering microscopy; *Scientific Reports*, 6, No. 35340: 1-9
- Javanmardian, M., Palsson, B. O. (1992) Continuous Photoautotrophic Cultures of the Eukaryotic Alga *Chlorella vulgaris* Can Exhibit Stable Oscillatory Dynamics; *Biotechnology and Bioengineering*, 39: 487-497
 - Jehlička, J., Edwards, H. G. M., Osterrothová, K., Novotná, J., Nedbalová, L., Kopecký, J., Němec, I., Oren, A. (2014) Potential and limits of Raman spectroscopy for carotenoid detection in microorganisms: implications for astrobiology; *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 372: 1-17
 - Jenkins, G. I. (2009) Signal Transduction in Responses to UV-B Radiation; *Annual Review of Plant Biology*, 60: 407-431
 - Jensen, T. E., Sicko, L. M. (1971) Fine Structure of Poly- β -Hydroxybutyric Acid Granules in a Blue-Green Alga, *Chlorogloea fritschii*; *Journal of Bacteriology*, 106, No. 2: 683-686
 - Ji, Y., He, Y., Cui, Y., Wang, T., Wang, Y., Li, Y., Huang, W. E., Xu, J. (2014) Raman spectroscopy provides a rapid, non-invasive method for quantitation of starch in live, unicellular microalgae; *Biotechnology Journal*, 9, No. 12: 1512-1518
 - Jia, F., Kacira, M., Ogden, K. L. (2015) Multi-Wavelength Based Optical Density Sensor for Autonomous Monitoring of Microalgae; *Sensors*, 15: 22234-22248
 - Jia, Z., Liu, Y., Daroch, M., Geng, S., Chend, J. J. (2014) Screening, Growth Medium Optimisation and Heterotrophic Cultivation of Microalgae for Biodiesel Production; *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173: 1667-1679
 - Johnsen, G., Samset, O., Granskog, L., Sakshaug, E. (1994) *In vivo* absorption characteristics in 10 classes of bloom-forming phytoplankton: taxonomic characteristics and responses to photoadaptation by means of discriminant and HPLC analysis; *Marine Ecology Progress Series*, 105: 149-157
 - Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., Krauß, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution; *Nature*, 411: 909-917
 - Jürgens, U. J., Weckesser, J. (1985) The fine structure and chemical composition of the cell wall and sheath layers of cyanobacteria; *Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie*, 136 A: 41-44

- Juneau, P., Dewez, D., Matsui, S., Kim, S.-G., Popovic, R. (2001) Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM-fluorometry; *Chemosphere*, 45: 589-598
- Jung, S.-K., Lee, S. B. (2006) In Situ Monitoring of Cell Concentration in a Photobioreactor Using Image Analysis: Comparison of Uniform Light Distribution Model and Artificial Neural Networks; *Biotechnology Progress*, 22, No. 5: 1443-1450
- Kadowaki, M. A. S., Müller-Santos, M., Rego, F. G. M., Souza, E. M., Yates, M. G., Monteiro, R. A., Pedrosa, F. O., Chubatsu, L. S., Steffens, M. B. R. (2011) Identification and characterization of PhbF: A DNA binding protein with regulatory role in the PHB metabolism of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1; *BMC Microbiology*, 11: 230
- Kaminsky, W. (2000) Experimental and phenomenological aspects of circular birefringence and related properties in transparent crystals; *Reports on Progress in Physics*, 63: 1575-1640
- Karpinska, J. (2012) Basic Principles and Analytical Application of Derivative Spectrophotometry; In: Uddin, J. (Hrsg.) *Macro To Nano Spectroscopy* (S. 253-268); Verlag InTech, Wien
- Keller, D., Bustamante, C. (1986) Theory of the interaction of light with large inhomogeneous molecular aggregates. II. Psi-type circular dichroism; *The Journal of Chemical Physics*, 84: 2972-2980
- Kennard, R. W., Stone, L. A. (1969) Computaer aided design of experiments; *Technometrics*, 11: 137-148
- Kensy, F., Zang, E., Faulhammer, C., Tan, R.-K., Büchs, J. (2009a) Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates; *Microbial Cell Factories*, 8, No. 1: 31
- Kensy, F., Engelbrecht, C., Büchs, J. (2009b) Scale-up from microtiter plate to laboratory fermenter: evaluation by online monitoring techniques of growth and protein expression in *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* fermentations; *Microbial Cell Factories*, 8, No. 68: 1-15
- Kessler, R. W. (2006) *Prozessanalytik*; Verlag Wiley-VCH, Weinheim

- Kessler, W. (2007) Multivariate Datenanalyse: für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik; Verlag Wiley-VCH, Weinheim
- Kim, D. G., Lee, C., Park, S. M., Choi, Y. E. (2014) Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*; *Bioresource Technology*, 159: 240-248
- Keiderling, T. A., Stephens, P. J. (1976) Vibrational Circular Dichroism of Overtone and Combination Bands; *Chemical Physics Letters*, 41, No. 1: 46-48
- Keiderling, T. A. (2013) Vibrational Circular Dichroism of Biopolymers; In: Roberts, G. C. K. (Hrsg.) *Encyclopedia of Biophysics* (S. 123-152); Verlag Springer, Berlin
- Kiefer, J., Noack, K. (2015) Universal enantioselective discrimination by Raman spectroscopy; *Analyst*, 140: 1787-1790
- Klein, R. (2012) Laser welding of plastics; Verlag Wiley-VCH, Weinheim
- Kleinegris, D. M. M., Van Es, M. A., Janssen, M., Brandenburg, W. A., Wijffels, R. (2010) Carotenoid fluorescence in *Dunaliella salina*; *Journal of Applied Phycology*, 22: 645-649
- Klöpffer, W. (1978) Photochemische Primärprozesse in synthetischen Polymeren; *Lenzinger Berichte*, 44: 28-36
- Koch, M., Suhr, C., Roth, B., Meinhardt-Wollweber, M. (2017a) Iterative morphological and mollifier-based baseline correction for Raman spectra; *Journal of Raman Spectroscopy*, 48, No. 2: 336-342
- Koch, M., Zagermann, S., Kniggendorf, A.-K., Meinhardt-Wollweber, M., Roth, B. (2017b) Violaxanthin cycle kinetics analysed *in vivo* with resonance Raman spectroscopy; *Journal of Raman Spectroscopy*, 48, No. 5: 686-691
- Kohler, A., Bertrand, D., Martens, H., Hannesson, K., Kirschner, C., Ofstad, R. (2007) Multivariate image analysis of a set of FTIR microspectroscopy images of aged bovine muscle tissue combining image and design information; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389: 1143-1153
- Kostov, Y., Harms, P., Randers-Eichhorn, L., Rao, G. (2001) Low-Cost Microbioreactor for High-Throughput Bioprocessing; *Biotechnology and Bioengineering*, 72: 346-352

- Kubo, Y., Ikeda, T., Yang, S.-Y., Tsuboi, M. (2000) Orientation of Carotenoid Molecules in the Eyespot of Alga: In Situ Polarized Resonance Raman Spectroscopy; *Applied Spectroscopy*, 54, No. 8: 1114-1119
- Kuchitsu, K., Oh-hama, T., Tsuzuki, M., Miyachi, S. (1987) Detection and characterization of acidic compartments (vacuoles) in *Chlorella vulgaris* 11h cells by ³¹P-in vivo NMR spectroscopy and cytochemical techniques; *Archives of Microbiology*, 148: 83-87
- Kumar, S., Wittmann, C., Heinzle, E. (2004) Minibioreactors; *Biotechnology Letters*, 26: 1-10
- Laffel, L. (1999) Ketone Bodies: a Review of Physiology, Pathophysiology and Application of Monitoring to Diabetes; *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 15: 412-426
- Lahiri, P., Wiberg, K. B., Vaccaro, P. H., Caricato, M., Crawford, T. D. (2014) Large Solvation Effect in the Optical Rotatory Dispersion of Norbornenone; *Angewandte Chemie International Edition*, 53: 1386-1389
- Lamping, S. R., Zhang, H., Allen, B., Ayazi Shamlou, P. (2003) Design of a prototype miniature bioreactor for high throughput automated bioprocessing; *Chemical Engineering Science*, 58: 747-758
- Larena, A., Pinto, G. (1992) Measuring properties of industrial polymer films using interference fringes in the infrared region; *Spectroscopy Letters*, 25, No. 4: 447-461
- Lasch, P. (2012) Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging; *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 117: 100-114
- Latimer, P., Rabinowitch, E. (1959) Selective Scattering of Light by Pigments *in vivo*; *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 84: 428-441
- Laurens, L. M. L., Wolfrum, E. J. (2011) Feasibility of Spectroscopic Characterization of Algal Lipids: Chemometric Correlation of NIR and FTIR Spectra with Exogenous Lipids in Algal Biomass; *BioEnergy Research*, 4, No. 1: 22-35
- Laurens, L. M. L., Wolfrum, E. J. (2013) High-Throughput Quantitative Biochemical Characterization of Algal Biomass by NIR Spectroscopy; Multiple Linear Regression and Multivariate Linear Regression Analysis; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 12307-12314

- Lazaroff, N., Vishniac, W. (1962) The Participation of Filament Anastomosis in the Developmental Cycle of *Nostoc muscorum*, a Blue-Green Alga; *Journal of General Microbiology*, 28: 203-210
- Law, J. H., Slepecky, R. A. (1961) Assay of poly- β -hydroxybutyric acid; *Journal of Bacteriology*, 82: 33-36
- Lee, C.-G., Palsson, B. Ø. (1994) High-Density Algal Photobioreactors Using Light-Emitting Diodes; *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 1161-1167
- Levy, I., Gantt, E. (1990) Development of photosynthetic activity in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) following nitrogen starvation; *Journal of Phycology*, 26, No. 1: 62-68
- Liu, Z., Zhang, F., Chen, F. (2013) High throughput screening of CO₂-tolerating microalgae using GasPak bags; *Aquatic Biosystems*, 9, No. 23: 1-7
- Liu, B., Liu, J., Chen, T., Yang, B., Jiang, Y., Wei, D., Chen, F. (2015) Rapid Characterization of Fatty Acids in Oleaginous Microalgae by Near-Infrared Spectroscopy; *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 7045-7056
- Liu, J. H., Song, L., Huang, Q. (2016) Rapid screening astaxanthin-hyperproducing *Haematococcus pluvialis* mutants through near-infrared spectroscopy; *Letters in Applied Microbiology*, 62, No. 2: 185-191
- Lopes, A. G. (2015) Single-use in the biopharmaceutical industry: A review of current technology impact, challenges and limitations; *Food and Bioprocess Processing*, 93: 98-114
- Los, D. A., Mironov, K. S. (2015) Modes of Fatty Acid Desaturation in Cyanobacteria: An Update; *Life*, 5: 554-567
- Luke, C. S., Selimkhanov, J., Baumgart, L., Cohen, S. E., Golden, S. S., Cookson, A. A., Hasty, J. (2016) A Microfluidic Platform for Long-Term Monitoring of Algae in a Dynamic Environment; *ACS Synthetic Biology*, 5: 8-14
- Ma, S., Freedman, T. B., Dukor, R. K., Nafie, L. A. (2010) Near-Infrared and Mid-Infrared Fourier Transform Vibrational Circular Dichroism of Proteins in Aqueous Solution; *Applied Spectroscopy*, 64, No. 6: 615-626
- MacColl, R., Eisele, L. E., Williams, E. C., Bowser, S. S. (1996) The Discovery of a Novel R-phycoerythrin from an Antarctic Red Alga; *The Journal of Biological Chemistry*, 271, No. 29: 17157-17160

- MacColl, R., Eisele, L. E., Dhar, M., Ecuyer, J.-P., Hopkins, S., Marrone, J., Barnard, R., Malak, H., Lewitus, A. J. (1999) Bilin Organization in Cryptomonad Biliproteins; *Biochemistry*, 38, No. 13: 4097-4105
- Madison, L. L., Huisman, G. W. (1999) Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic; *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, No. 1:21-53
- Malpass, D. B., Band, E. (2012) Introduction to Industrial Polypropylene : Properties, Catalysts, Processes; Verlag Wiley-VCH, Weinheim
- Mandalam, R. K., Palsson, B. Ø. (1997) Cell cycle of *Chlorella vulgaris* can deviate from the synchronous binary division model; *Biotechnology Letters*, 19, No. 6: 587-591
- Manisha, S. C. A. (2007) Growth, Survival and Reproduction in *Chlorella vulgaris* and *C. variegata* with Respect to Culture Age and under Different Chemical Factors; *Folia Microbiologica*, 52, No. 4: 399-406
- Mark, H., Workman Jr., J. (2007) Chemometrics in Spectroscopy; Verlag Elsevier, Amsterdam
- McRae, R. M., Wilkinson, J. F. (1958) Poly- β -hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*; *Journal of General Microbiology*, 19, No. 1: 210-222
- Meeks, J. C. (1998) Symbiosis between Nitrogen-Fixing Cyanobacteria and Plants; *BioScience*, 48, No. 4: 266-276
- Menke, S. (2012) Entwicklung eines Einweg-Photobioreaktorsystems zur Hochdurchsatzuntersuchung (Screening) von Mikroalgen (Dissertation); Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Menke, S., Sennhenn, A., Sachse, J.-H., Majewski, E., Huchzermeyer, B, Rath, T. (2012) Screening of Microalgae for Feasible Mass Production in Industrial Hypersaline Wastewater Using Disposable Bioreactors; *Clean – Soil, Air, Water*, 40, No. 12: 1401-1407
- Mertiri, T., Chen, M., Holland, T., Basu, A. S. (2011) Optical Microplates for Photonic High Throughput Screening of Algal Photosynthesis and Biofuel Production; *Proceedings of the 2011 Annual International Conference of the IEEE Engineering in*

- Medicine and Biology Society, Boston, MA, USA, 30 August-3 September 2011: 482-485*
- Merzlyak, M. N., Chivkunova, O. B., Maslova, I. P., Naqvi, K. R., Solovchenko, A. E., Klyachko-Gurvich, G. L. (2008) Light Absorption and Scattering by Cell Suspensions of Some Cyanobacteria and Microalgae; *Russian Journal of Plant Physiology*, 55, No. 3: 420-425
 - Mikhailyuk, I. K., Razzhivin, A. P. (2003) Background Subtraction in Experimental Data Arrays Illustrated by the Example of Raman Spectra and Fluorescent Gel Electrophoresis Patterns; *Instruments and Experimental Techniques*, 46, No. 6: 765-769
 - Millie, D. F., Schofield, O. M., Kirkpatrick, G. J., Johnsen, G., Tester, P. A., Vinyard, B. T. (1997) Detection of harmful algal blooms using photopigments and absorption signatures A case study of the Florida red tide dinoflagellate, *Gymnodinium breve*; *Limnology and Oceanography*, 42, No. 5: 1240-1251
 - Millie, D. F., Schofield, O. M. E., Kirkpatrick, G. J., Johnsen, G., Evens, T. J. (2002) Using absorbance and fluorescence spectra to discriminate microalgae; *European Journal of Phycology*, 37, No. 3: 313-322
 - Moberg, L., Karlberg, B., Sørensen, K., Källqvist, T. (2002) Assessment of phytoplankton class abundance using absorption spectra and chemometrics; *Talanta*, 56: 153-160
 - Monaldi, A. C., Romero, G. G., Alanís, E. E., Cabrera, C. M. (2015) Digital holographic microscopy for microalgae biovolume assessment; *Optics Communications*, 336: 255-261
 - Morton, J., Akita, F., Nakajima, Y., Shen, J.-R., Krausz, E. (2015) Optical identification of the long-wavelength (700–1700 nm) electronic excitations of the native reaction centre, Mn₄CaO₅ cluster and cytochromes of photosystem II in plants and cyanobacteria; *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847: 153-161
 - Moudříková, Š., Mojzeš, P., Zachleder, V., Pfaff, C., Behrendt, D., Nedbal, L. (2016) Raman and fluorescence microscopy sensing energy-transducing and energy-storing structures in microalgae; *Algal Research*, 16: 224-232
 - Mulbry, W., Reeves, J., Liu, Y., Ruan, Z., Liao, W. (2012) Near- and mid-infrared spectroscopic determination of algal composition; *Journal of Applied Phycology*, 24: 1261-1267

- Myers, J. A., Curtis, B. S., Curtis, W. R. (2013) Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density; *BMC Biophysics*, 6, No. 4: 1-15
- Nadadoor, V. R., De la Hoz Siegler, H., Shah, S. L., McCaffrey, W. C., Ben-Zvi, A. (2012) Online sensor for monitoring a microalgal bioreactor system using support vector regression; *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 110: 38-48
- Naumann, D., Keller, S., Helm, D., Schultz, C., Schrader, B. (1995) FT-IR Spectroscopy and FT-Raman Spectroscopy are powerful analytical tools for the non-invasive characterization of intact microbial cells; *Journal of Molecular Structure*, 347: 399-406
- Nederhoff, E., Van De Voorent, J., Udink Ten Cate, A. J. (1985) A Practical Tracer Gas Method to Determine Ventilation in Greenhouses; *Journal of Agricultural Engineering Research*, 31: 309-319
- Niaounakis, M. (2013) *Biopolymers: Reuse, Recycling, and Disposal*; Verlag Elsevier, Amsterdam
- Noack, K., Eskofier, B., Kiefer, J., Dilk, C., Bilow, G., Schirmer, M., Buchholz, R., Leipertz, A. (2013) Combined shifted-excitation Raman difference spectroscopy and support vector regression for monitoring the algal production of complex polysaccharides; *Analyst*, 138: 5639-5646
- Nowack, E. C. M., Podola, B., Melkonian, M. (2005) The 96-Well Twin-Layer System: A novel Approach in the Cultivation of Microalgae; *Protist*, 156: 239-251
- Oh, S.-K., Yoo, S. J., Jeong, D. H., Lee, J. M. (2013) Real-time estimation of glucose concentration in algae cultivation system using Raman spectroscopy; *Bioresource Technology*, 142: 131-137
- Pacheco, A., Hernández-Mireles, I., García-Martínez, C., Álvarez M. M. (2013) Microplates as a Microreactor Platform for Microalgae Research; *Biotechnology Progress*, 29, No. 3: 638-644
- Parab, N. D. T., Tomar, V. (2012) Raman Spectroscopy of Algae: A Review; *Nanomedicine & Nanotechnology*, 3, No. 2: 1-7
- Penner, M. H. (2010) Basic Principles of Spectroscopy; In: Nielsen, S. S. (Hrsg.) *Food Analysis* (S. 375-385); Verlag Springer, Berlin

- Pessoa, M. F. (2012) Harmful effects of UV radiation in Algae and aquatic macrophytes – A review; *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24, No 6: 510-526
- Picardo, M. C., De Medeiros, J. L., Monteiro, J. G. M., Chaloub, R. M., Giordano, M., De Queiroz Fernandes Araújo, O. (2013) A methodology for screening of microalgae as a decision making tool for energy and green chemical process applications; *Clean Technologies and Environmental Policy*, 15, No. 2: 275-291
- Pickett-Heaps, J., West, J. A., Wilson, S. M., McBride, D. L. (2001) Time-lapse videomicroscopy of cell (spore) movement in red algae; *European Journal of Phycology*, 36: 9-22
- Pilát, Z., Bernatová, S., Ježek, J., Šerý, M., Samek, O., Zemánek, P., Nedbal, L., Trtílek, M. (2012a) Raman microspectroscopy of algal lipid bodies: β -carotene as a volume sensor; *Proceedings of SPIE 8306, Photonics, Devices, and Systems V*, 83060L: 1-7
- Pilát, Z., Bernatová, S., Ježek, J., Šerý, M., Samek, O., Zemánek, P., Nedbal, L., Trtílek, M. (2012b) Raman microspectroscopy of algal lipid bodies: β -carotene quantification; *Journal of Applied Phycology*, 24, No. 3: 541-546
- Pionteck, J., Wypych, G. (2007) Handbook of Antistatics; Verlag Chemtech Pub, Toronto
- Pötter, M., Steinbüchel, A. (2005) Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation; *Biomacromolecules*, 6: 552-560
- Pope, D. H. (1975) Effects of light intensity, oxygen concentration, and carbon dioxide concentration on photosynthesis in algae; *Microbial Ecology*, 2, No. 1: 1-16
- Pořízka, P., Prochazka, D., Pilát, Z., Krajcarová, L., Kaiser, J., Malina, R., Novotný, J., Zemánek, P., Ježek, J., Šerý, M., Bernatová, S., Krzyžánek, V., Dobranská, K., Novotný, K., Trtílek, M., Samek, O. (2012) Application of laser-induced breakdown spectroscopy to the analysis of algal biomass for industrial biotechnology; *Spectrochimica Acta B* 74-57: 169-176
- Pořízka, P., Prochazková, P., Prochazka, D., Sládková, L., Novotný, J., Petrílek, M., Brada, M., Samek, O., Pilát, Z., Zemánek, P., Adam, V., Kizek, R., Novotný, K., Kaiser, J. (2014) Algal Biomass Analysis by Laser-Based Analytical Techniques - A Review; *Sensors*, 14: 17725-17752

- Posten, C. (2009) Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae; *Engineering in Life Sciences*, 9, No. 3: 165-177
- Pratt, R., Fong, J. (1940) Studies on *Chlorella vulgaris* II. Further Evidence that *Chlorella* Cells form a Growth-Inhibiting Substance; *American Journal of Botany*, 27, No. 6: 431-436
- Pringsheim, E. G., Pringsheim, O. (1949) The Growth Requirements of *Porphyridium Cruentum*: with Remarks on the Ecology of Brackish Water Algae; *Journal of Ecology*, 37, No. 1: 57-64
- Priyadarshani, I., Rath, B. (2012) Commercial and industrial applications of microalgae - A review; *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3, No. 4: 89-100
- Pulz, O., Scheibenbogen, K. (1998) Photobioreactors: Design and Performance with Respect to Light Energy Input; In: Scheper, T. (Hrsg.) *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 59 (S. 123-152); Verlag Springer, Berlin
- Puskeiler, R., Kaufmann, K., Weuster-Botz, D. (2005) Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD); *Biotechnology and Bioengineering*, 89, No. 5: 512-523
- Radzun, K. A., Wolf, J., Jakob, G., Zhang, E., Stephens, E., Ross, I., Hankamer, B. (2015) Automated nutrient screening system enables high-throughput optimisation of microalgae production conditions; *Biotechnology for Biofuels*, 8, No. 65: 1-17
- Rahman, Md. A., Soumya, K. K., Tripathi, A., Sundaram, S., Singh, S., Gupta, A. (2011) Evaluation and sensitivity of cyanobacteria, *Nostoc muscorum* and *Synechococcus* PCC 7942 for heavy metals stress – a step toward biosensor; *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93, No. 10: 1982-1990
- Ranjitha, K., Kaushik, B. D. (2005) Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*; *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64: 372-375
- Reddy, C. S. K., Ghai, R., Rashmi, Kalia, V. C. (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview; *Bioresource Technology*, 87: 137-146
- Ribeiro Rodrigues, L. H., Arenzon, A., Raya-Rodriguez, M. T., Ferreira Fontour, N. (2011) Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*; *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3, No. 8: 225-228

- Rigbi, M., Rosinski, J., Siegelman, H. W., Sutherland, J. C. (1980) Cyanobacterial phycobilisomes: Selective dissociation monitored by fluorescence and circular dichroism; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, No. 4: 1961-1965
- Rinnan, Å., Van Den Berg, F., Balling Engelsen, S. (2009) Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra; *Trends in Analytical Chemistry*, 28, No. 10: 1201-1222
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R. Y. (1979) Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria; *Journal of General Microbiology*, 111: 1-61
- Rockwell, N. C., Shang, L., Martin, S. S., Lagarias, J. C. (2009) Distinct classes of red/far-red photochemistry within the phytochrome superfamily; *PNAS*, 106, No. 15: 6123-6127
- Rockwell, N. C., Duanmu, D., Martin, S. S., Bachy, C., Price, D. C., Bhattacharya, D., Worden, A. Z., Lagarias, J. C. (2014) Eukaryotic algal phytochromes span the visible spectrum; *PNAS*, 111, No. 10: 3871-3876
- Rodger, A., Nordén, B. (1997) *Circular Dichroism and Linear Dichroism*; Verlag Oxford University Press, Oxford
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C. (2014) Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review; *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35: 265-278
- Sakhalkar, S. S., Walters, K. B., Hirt, D. E., Miranda, N. R., Roberts, W. P. (2002) Surface Characterization of LLDPE Film Containing Glycerol Monostearate; *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 18: 33-43
- Samek, O., Jonáš, A., Pilát, Z., Zemánek, P., Nedbal, L., Tříška, J., Kotas, P., Trtílek, M., (2010) Raman Microspectroscopy of Individual Algal Cells: Sensing Unsaturation of Storage Lipids in vivo; *Sensors*, 10: 8635-8651
- Sandnes, J. M., Ringstad, T., Wenner, D., Heyerdahl, P. H., Källqvist, T., Gislerød, H. R. (2006) Real-time monitoring and automatic density control of large-scale microalgal cultures using near infrared (NIR) optical density sensors; *Journal of Biotechnology*, 122: 209-215

- Sansonetti, C. J., Reader, J. (2001) Spectrum and Energy Levels of Singly-Ionized Mercury (Hg II); *Physica Scripta*, 63: 219-242
- Sarancovan, I. (1999) Main-chain Chirality and Crystalline Morphology in Optically Active Polymers (Dissertation); Verlag National Library of Canada, Ottawa
- Sarrafzadeh, M. H., La, H.-J., Lee, J.-Y., Cho, D.-H., Shin, S.-Y., Kim, W.-J., Oh, H.-M. (2015) Microalgae biomass quantification by digital image processing and RGB color analysis; *Journal of Applied Phycology*, 27: 205-209
- Savitzky, A., Golay, M. J. E. (1964) Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures; *Analytical Chemistry*, 36: 1627-1639
- Sawaengsak, W., Silalertruksa, T., Bangviwat, A., Gheewala, S. H. (2014) Life cycle cost of biodiesel production from microalgae in Thailand; *Energy for Sustainable Development*, 18: 67-74
- Schrader, B. (1997a) Die Möglichkeiten der Raman-Spektroskopie im Nah-Infrarot-Bereich, Teil I; *Chemie in unserer Zeit*, 31, No. 5: 229-234
- Schrader, B. (1997b) Die Möglichkeiten der Raman-Spektroskopie im Nah-Infrarot-Bereich, Teil II; *Chemie in unserer Zeit*, 31, No. 6: 270-279
- Schubert, H., Schiewer, U., Tschirner, E. (1989) Fluorescence characteristics of cyanobacteria (blue-green algae); *Journal of Plankton Research*, 11, No. 2: 353-359
- Schuurmans, R. M., Van Alphen, P., Schuurmans, J. M., Matthijs, H. C. P., Hellingwerf, K. J. (2015) Comparison of the Photosynthetic Yield of Cyanobacteria and Green Algae: Different Methods Give Different Answers; *PLoS ONE*, 10, No. 9: e0139061: 1-17
- Seasholtz M. B., Kowalski, B. R. (1992) The effect of mean centering on prediction in multivariate calibration; *Journal of Chemometrics*, 6: 103-111
- Shah, V., Garg, N., Madamwar, D. (2003) Ultrastructure of the Cyanobacterium *Nostoc muscorum* and Exploitation of the Culture for Hydrogen Production; *Folia Microbiologica*, 48, No. 1: 65-70
- Shanmugam, G., Polavarapu, P. L. (2004) Vibrational Circular Dichroism of Protein Films; *Journal of the American Chemical Society*, 126: 10292-10295
- Shao, Y., Pan, J., Zhang, C., Jiang, L., He, Y. (2015a) Detection in situ of carotenoid in microalgae by transmission spectroscopy; *Computers and Electronics in Agriculture*, 112: 121-127

- Shao, Y., Jiang, L., Pan, J., He, Y. (2015b) Identification of pesticide varieties and concentrations by detecting characteristics of *Chlorella pyrenoidosa*; *Journal of Applied Microbiology*, 119: 885-893
- Shao, Y., Li, Y., Jiang, L., Pan, J., He, Y., Dou, X. (2016a) Identification of pesticide varieties by detecting characteristics of *Chlorella pyrenoidosa* using Visible/Near infrared hyperspectral imaging and Raman microspectroscopy technology; *Water Research*, 104: 432-440
- Shao, Y., Jiang, L., Zhou, H., Pan, J., He, Y. (2016b) Identification of pesticide varieties by testing microalgae using Visible/Near Infrared Hyperspectral Imaging technology; *Scientific Reports*, 6, No. 24221: 1-11
- Sharma, K., Li, Y., Schenk, P. M. (2014) UV-C-mediated lipid induction and settling, a step change towards economical microalgal biodiesel production; *Green Chemistry*, 16: 3539-3548
- Sharma, L., Mallick, N. (2005a) Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation by pH, light-dark cycles, N and P status and carbon sources; *Bioresource Technology*, 96: 1304-1310
- Sharma, L., Mallick, N. (2005b) Enhancement of poly-b-hydroxybutyrate accumulation in *Nostoc muscorum* under mixotrophy, chemoheterotrophy and limitations of gas-exchange; *Biotechnology Letters*, 27: 59-62
- Sharma, S. K., Nelson, D. R., Abdrabu, R., Khraiwesh, B., Jijakli, K., Arnoux, M., O'Connor, M. J., Bahmani, T., Cai, H., Khapli, S., Jagannathan, R., Salehi-Ashtiani, K. (2015) An integrative Raman microscopy-based workflow for rapid *in situ* analysis of microalgal lipid bodies; *Biotechnology for Biofuels*, 8, No. 164: 1-14
- Shelp, B. J., Canvin, D. T. (1980) Photorespiration and Oxygen Inhibition of Photosynthesis in *Chlorella pyrenoidosa*; *Plant Physiology*, 65: 780-784
- Sheng, J., Malkiel, E., Katz, J. (2006) Digital holographic microscope for measuring three-dimensional particle distributions and motions; *Applied Optics*, 45, No. 16: 3893-3901
- Shih, S. C. C., Mufti, N. S., Chamberlain, M. D., Kim, J., Wheeler, A. R. (2014) A droplet-based screen for wavelength-dependent lipid production in algae; *Energy & Environmental Science*, 7: 2366-2375

- Shubin, V. V., Tsuprun, V. L., Bezsmertnaya, I. N., Karapetyan, N. V. (1993) Trimeric forms of the photosystem I reaction center complex pre-exist in the membranes of the cyanobacterium *Spirulina platensis*; *FEBS Letters*, 334, No. 1: 79-82
- Singh, P. K., Sen, A. K., Vidyarthi, A. S. (2016) Diversified applications of polyhydroxyalkanoates; *Biopharm Journal*, 2, No. 1: 14-26
- Skandary, S., Konrad, A., Hussels, M., Meixner, A. J., Brecht, M. (2015) Polarization-dependent single-molecule spectroscopy on photosystem I; *Proceedings of SPIE 9554, Nanoimaging and Nanospectroscopy III, 95541H*: 1-11
- Skrabal, P. M. (2008) Spektroskopie: Eine methodenübergreifende Darstellung vom UV- bis zum NMR-Bereich; Verlag UTB GmbH, Stuttgart
- Sørensen, B. E. (2013) A revised Michel-Lévy interference colour chart based on first-principles calculations; *European Journal of Mineralogy*, 25: 5-10
- Somleva, M. N., Peoples, O. P., Snell, K. D. (2013) PHA Bioplastics, Biochemicals, and Energy from Crops; *Plant Biotechnology Journal*, 11: 233-252
- Souza Da Fonseca Ramos, A. (2005) Einfluss der Wasserstruktur auf diffusionskontrollierte Enzymreaktionen: Spektroskopische und kinetische Untersuchungen (Dissertation); Verlag Cuvillier, Göttingen
- Sparks, W. B., Hough, J. H., Kolokolova, L., Germer, T. A., Chen, F., DasSarma, S., DasSarma, P., Robb, F. T., Manset, N., Reid, I. N., Macchetto, F. D., Martin, W. (2009) Circular polarization in scattered light as a possible biomarker; *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, 110: 1771-1779
- Spear, A. H., Daly, K., Huffman, D., Garcia-Rubio, L. (2009) Progress in developing a new detection method for the harmful algal bloom species, *Karenia brevis*, through multiwavelength spectroscopy; *Harmful Algae*, 8: 189-195
- Srivastava, A. K. (2010) Assessment of Salinity-Induced Antioxidative Defense System of Diazotrophic Cyanobacterium *Nostoc muscorum*; *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, No. 11: 1506-1512
- Stark, E., Luchter, K., Margoshes, M. (1986) Near-Infrared Analysis (NIRA): A Technology for Quantitative and Qualitative Analysis; *Applied Spectroscopy Reviews*, 22, No. 4: 335-399

- Steinbüchel, A. (1991) Recent Advances in the Knowledge of the Metabolism of Bacterial Polyhydroxyalkanoic acids and Potential Impacts on the Production of Biodegradable Thermoplastics; *Acta Biotechnologica*, 11, No. 5: 419-427
- Steinbüchel, A., Schlegel, H. G. (1991) Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxy-alkanoid acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*; *Molecular Microbiology*, 5, No. 3: 535-542
- Steinbüchel, A., Valentin, H. E. (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids; *FEMS Microbiology Letters*, 128: 219-228
- Sturzenegger, V., Buchecker, R., Wagnière, G. (1980) Classification of the CD Spectra of Carotenoids; *Helvetica Chimica Acta*, 63, No. 113: 1074-1092
- Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters; *Progress in Polymer Science* 25: 1503-1555
- Syiem, M. B., Bhattacharjee, A. (2010) An Efficient Protocol for Long-Term Preservation of Cyanobacteria; *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 1, No. 1: 41-45
- Szabó, M., Premvardhan, L., Lepetit, B., Goss, R., Wilhelm, C., Garab, G. (2010) Functional heterogeneity of the fucoxanthins and fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatom cells revealed by their electrochromic response and fluorescence and linear dichroism spectra; *Chemical Physics*, 373: 110-114
- Talari, A. C. S., Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I. U. (2015) Raman Spectroscopy of Biological Tissues; *Applied Spectroscopy Reviews*, 50: 46-111
- Tamiya, H., Iwamura, T., Shibata, K., Hase, E., Nihei, T. (1953) Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of *Chlorella*; *Biochimica et Biophysica Acta*, 12: 23-40
- Tamiya, H., Shibata, K., Sasa, T., Iwamura, T., Morimura, Y. (1953) Effect of Diurnally Intermittent Illumination on the Growth and Some Cellular Characteristics of *Chlorella*; In: Burlew, J. S. (Hrsg.) *Algal Culture: From Laboratory to Pilot Plant* (S. 76-84); Verlag Carnegie Institution of Washington, Washington
- Tanaka, Z, Beer, T., McKay, C. P., Bonaccorsi, R., Gu, C., Chen, B. (2009) Raman Imaging for high Throughput Biomarker Field Detections; *Proceedings of SPIE 7441, Instruments and Methods for Astrobiology and Planetary Missions XII, 74410I*: 1-6

- Taniguchi, T., Monde, K. (2007) Vibrational circular dichroism (VCD) studies on disaccharides in the CH region: toward discrimination of the glycosidic linkage position; *Organic & Biomolecular Chemistry*, 5: 1104-1110
- Ting, C. S., Owens, T. G. (1992) Limitations of the Pulse-Modulated Technique for Measuring the Fluorescence Characteristics of Algae; *Plant Physiology*, 100: 367-373
- Tinoco Jr., I., Keller, D. (1983) Scattering of Circularly Polarized Radiation; *The Journal of Physical Chemistry*, 87: 2915-2917
- Türk, O. (2014) Stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe; Verlag Springer-Vieweg, Wiesbaden
- Vandenabeele, P. (2013) Practical Raman Spectroscopy - An Introduction; Verlag John Wiley & Sons, West Sussex
- Vanderschaeghe, A. M., Debergh, P. C. (1987) Technical aspects of the control of the relative humidity in tissue culture containers; In: Ducate, G., Jacob, M., Simeon, A. (Hrsg.) *Plant Micropropagation in Horticultural Industries* (S. 68-76); Verlag Presses Universitaires de Liège, Lüttich
- Van Wagenen, J., Løvstad Holdt, S., De Francisci, D., Valverde-Pérez, B., Gy Plósz, B., Angelidaki, I. (2014) Microplate-based method for high-throughput screening of microalgae growth potential; *Bioresource Technology* 169: 566-572
- Walrafen, G. E. (1964) Raman Spectral Studies of Water Structure; *The Journal of Chemical Physics*, 40, No. 11: 3249-3256
- Wang, B., Sparks, W. B., Germer, T. A., Leadbetter, A. (2009) A Spectroscopic Polarimeter For Detecting Chiral Signatures In Astrobiological Samples; *Proceedings of SPIE 7441, Instruments and Methods for Astrobiology and Planetary Missions XII, 744108*: 1-11
- Wang, C.-C., Chandrappa, D., Smirnov, N., Moger, J. (2015) Monitoring Lipid Accumulation in the Green Microalga *Botryococcus braunii* with Frequency-Modulated Stimulated Raman Scattering; *Proceedings of SPIE 9329, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XV, 93291J*: 1-5
- Wang, G., Hao, Z., Huang, Z., Chen, L., Li, X., Hu, C., Liu, Y. (2010) Raman Spectroscopic Analysis of a Desert Cyanobacterium *Nostoc* sp. in Response to UVB Radiation; *Astrobiology*, 10, No. 8: 783-788

- Wei, X., Jiang, L.-L., Zhao, Y.-R., Shao, Y.-N., Qiu, Z.-J., He, Y. (2016) Study on the Nondestructive Detection Methods for Dynamical Change of Lipid Content in *Chlorella* sp.; *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 36, No. 5: 1352-135
- Weissflog, I. A., Grosser, K., Bräutigam, M., Dietzek, B., Pohnert, G., Popp, J. (2013) Raman Spectroscopic Insights into the Chemical Gradients within the Wound Plug of the Green Alga *Caulerpa taxifolia*; *ChemBioChem*, 14: 727-732
- Wenk, P., Hemmerich, J., Müller, C., Kensy, F. (2012) Hochparallele Bioprozessentwicklung in geschüttelten Mikrobioreaktoren; *Chemie Ingenieur Technik*, 84, No. 5: 704-714
- Widianingsih, W., Hartati, R., Endrawati, H., Mamuaja, J. (2013) Fatty acid composition of marine microalgae in Indonesia; *Journal of Tropical Biology and Conservation*, 10: 75-82
- Wijffels, R. H., Kruse, O., Hellingwerf, K. J. (2013) Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae; *Current Opinion in Biotechnology*, 24: 405-413
- Wildman, R. B., Bowen, C. C. (1974) Phycobilisomes in Blue-Green Algae; *Journal of Bacteriology*, 17, No. 2: 866-881
- Williamson, D. H., Wilkinson, J. F. (1958) The Isolation and Estimation of the Poly- β -hydroxybutyrate Inclusions of *Bacillus* species; *Journal of General Microbiology*, 19: 198-209
- Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P. (1987) Principal Component Analysis; *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2: 37-52
- Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L. (2001) PLS-Regression: a basic tool of chemometrics; *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58: 109-130
- Workman, J., Weyer, L. (2008) Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy; Verlag CRC Press, London
- Wu, Q., Nelson, W. H., Hargraves, P., Zhang, J., Brown, C. W., Seelenbinder, J. A. (1998) Differentiation of Algae Clones on the Basis of Resonance Raman Spectra Excited by Visible Light; *Analytical Chemistry*, 70, No. 9: 1782-1787
- Wu, Q., Nelson, W. H., Treubig Jr., J. M., Brown, P. R., Hargraves, P., Kirs, M., Feld, M., Desari, R., Manoharan, R., Hanlon, E. B. (2000) UV Resonance Raman Detec-

- tion and Quantitation of Domoic Acid in Phytoplankton; *Analytical Chemistry*, 72, No. 7: 1666-1671
- Wu, H., Volponi, J. V., Oliver, A. E., Parikh, A. N., Simmons, B. A., Singh, S. (2011) *In vivo* lipidomics using single-cell Raman spectroscopy; *PNAS*, 108 No. 9: 3809-3814
 - Wu, D., Nie, P., He, Y., Wang, Z., Wu, H. (2013) Spectral Multivariable Selection and Calibration in Visible-Shortwave Near-Infrared Spectroscopy for Non-Destructive Protein Assessment of *Spirulina* Microalga Powder; *International Journal of Food Properties*, 16: 1002-1015
 - Yadavalli, V., Jolley, C. C., Malleda, C., Thangaraj, B., Fromme, P., Subramanyam, R. (2012) Alteration of Proteins and Pigments Influence the function of Photosystem I under Iron Deficiency from *Chlamydomonas reinhardtii*; *PLoS ONE*, 7, No. 4, e35084: 1-11
 - Yeow, Y. L., Azali, S., Ow, S. Y., Wong, M. C. L., Leong, Y.-K. (2005) Evaluating the third and fourth derivatives of spectral data; *Talanta*, 68: 156-164
 - Yokouchi, M., Chatani, Y., Tadokoro, H., Teranishi, K., Tani, H. (1973) Structural studies of polyesters: 5. Molecular and crystal structures of optically active and racemic poly (β -hydroxybutyrate); *Polymer*, 14, No. 6: 267-272
 - Yoshino, H., Saito, Y., Kumamoto, Y., Taguchi, A., Verma, P., Kawata, S. (2015) Temperature-dependent Photodegradation in UV-resonance Raman Spectroscopy; *Analytical Sciences*, 31: 451-454
 - Zakar, T., Laczko-Dobos, H., Toth T. N., Gombos, Z. (2016) Carotenoids Assist in Cyanobacterial Photosystem II Assembly and Function; *Frontiers in Plant Science*, 7, No. 295: 1-7
 - Zhang, H., Obias, V., Gonyer, K., Dennis, D. (1994) Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains; *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1198-1205
 - Zhang, Z., Szita, N., Boccazzi, P., Sinskey, A. J., Jensen, K. F. (2006) A well-mixed, polymer-based microbioreactor with integrated optical measurements; *Biotechnology and Bioengineering*, 93, No. 2: 286-96
 - Zhu, H.-Y., Shao, Y.-N., Jiang, L.-L., Guo, A.-Q., Pan, J., He, Y. (2016) Identification of Microalgae Species Using Visible/Near Infrared Transmission Spectroscopy; *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 36, No. 1: 75-79

- Internetressourcen
- American International Chemical Inc. (2012) Glycerol Mono Stearate (Material Safety Data Sheet); <http://www.aicma.com/msds/Glycerol%20Mono%20Stearate.pdf>; Zugriff am 06.04.2014
- Anonym; <http://www.edmundoptics.com/optics/polarizers/waveplates-retarders/achromatic-waveplates-retarders/46562>; Zugriff am 14.06.2013
- Birus, T. (2007) Eigenschaften von Kunststofffolien; In: Pharma + Food, 01/2007; <http://www.pharma-food.de/texte/anzeigen/629/Energie-Utilities/Chemikalien-Werkstoffe/Eigenschaften-von-Kunststofffolien/BIRUS-THOMAS>; Zugriff am 01.09.2013
- European Bioplastics e.V. (2013) Bioplastics - Facts and figures; [http://en.european-bioplastics.org/wp-content/uploads/2013/publications/EuBP_Facts Figures_bioplastics_2013.pdf](http://en.european-bioplastics.org/wp-content/uploads/2013/publications/EuBP_Facts_Figures_bioplastics_2013.pdf); Zugriff am 16.04.2014
- Held, P. (2009) The Importance of Using the Appropriate Microplate for Absorbance Measurements in the Ultraviolet Region of the Spectrum; BioTek Tech Note; http://e3f99a4a3891332df177-b511c07cae915b9d1958179eaa4432ea.r82.cf1.rackcdn.com/resources/docs/PowerWave200%20Microplate%20Absorbance%20Measurements%20_tech%20note_.pdf; Zugriff am 29.12.2015
- Hokr, B. H., Tovar, C. E., Meng, Z., Petrov, G. I., Yakovlev, V. V. (2016) Feasibility of non-invasive optical blood-glucose detection using overtone circular dichroism; <https://arxiv.org/pdf/1601.06143v1.pdf>; Zugriff am 02.10.2016
- Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung; GESTIS-Stoffdatenbank; [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0) [Suchbegriff: Glycerinmonostearat]; Zugriff am 08.04.2014
- Langowski, H.-C. (2006) Anwendung der Nanotechnologie in Materialien für den Lebensmittelkontakt; http://www.bfr.bund.de/cm/343/anwendung_der_nanotechnologie_in_materialien_fuer_den_lebensmittelkontakt.pdf; Zugriff am 05.06.2011
- Plastics Europe (2013) Plastics - the Facts 2013. An analysis of European latest plastics production, demand and waste data; http://www.plasticseurope.org/documents/document/20131018104201-plastics_the_facts_2013.pdf; Zugriff am 16.04.2014

10 Anhang

10.1 Spektroskopische Begriffsdefinitionen

<u>Quantenmechanische Betrachtung</u>	<u>Geometrische Optik</u>	<u>Diese Arbeit</u>
<p>In der Quantenmechanik wird einzelnen Photonen sowohl Wellen- als auch Teilchencharakter zugeschrieben. Da einzelne Photonen stets Eigenschaften einer gesamten Wellenfront besitzen, können sie sich wie eine solche verhalten, was Effekte wie Interferenzen, Beugung etc. erklärt. Gleichzeitig wird das gequantelte Wesen von Photonen berücksichtigt, welches Phänomene wie den Photoeffekt o.ä. erklärt.</p> <p>Die mögliche Überlagerung verschiedener Zustände eines Photons erlaubt letztlich nur statistische Aussagen über Auftretenswahrscheinlichkeiten einzelner Zustände, der tatsächliche Ist-Zustand ergibt sich erst bei einem Eingriff in das bis dahin undefinierte System. Aus diesem Grund, ist die quantenmechanische Behandlung von Licht stets auf Wahrscheinlichkeiten gegründet, mit denen einzelne Photonen an bestimmten Orten lokalisiert sind, bzw. wie sie sich vor und nach Interaktionen mit Materie verhalten. Die Annahme von Photoneneigenschaften (z.B. Polarisationszustand) als reine Eigenschaftswahrscheinlichkeiten ist essentiell bei der quantenmechanischen Betrachtung der Eigenschaften von elektromagnetischer Strahlung.</p>	<p>Klassisch kann Licht auch als Transversalwelle gedeutet werden, welche sich mittels geometrischer Prinzipien in ihrem Verhalten beschreiben lässt (z.B. das Reflexionsgesetz). Von einer Strahlungsquelle emittierten Photonenwolken können dabei als „Teilchenstrahlen“ angesehen werden, welche sich in ihrer Gesamtheit den (linearen) Regeln der geometrischen Optik entsprechend verhalten.</p> <p>Effekte wie Interferenz verschiedener Wellen lassen sich erklären und eine genaue Vorhersage, über das räumliche Verhalten einer Wellenfront und damit der Gesamtheit der einzelnen Photonen ist möglich.</p>	<p>Da in dieser Arbeit in der VIS- und NIR-Spektroskopie stets das Verhalten der gesamten applizierten Messstrahlung auf eine Probe untersucht wurde, scheint eine Betrachtung dieser Strahlung als „Wahrscheinlichkeitswelle“ unter Beachtung der Regeln der geometrischen Optik als ausreichend. Beobachtete Effekte wie Absorption, Streuung etc. innerhalb vermessener Kultursuspensionen lassen sich so bereits hinreichend abbilden.</p>
<u>Absorption</u>		
<p>Interaktion zwischen einzelnen Photonen und den Elektronenwolken von Molekülen, bei denen Energie des Photons auf das Molekül übertragen wird. Hierbei müssen die Schwingungsfrequenzen einfallender Photonen und jene der Elektronen eines Moleküls koinzidieren. Der Vorgang ist physikalisch auch als inelastischer Stoß deutbar.</p>	<p>Interaktion von Lichtwelle und Molekül/Körper, welche festgelegten Richtungsabhängigkeiten folgt und durch welche die Welle abgeschwächt bzw. ausgelöscht wird. Diese Abschwächung wird mathematisch mittels einfacher Koeffizienten abgebildet.</p>	<p>In dieser Arbeit ist eine Betrachtung nach der geometrischen Optik gewählt worden, da dies die aufgetretenen Effekte hinreichend beschreibt.</p> <p>Es werden faktisch einzelne Photonen absorbiert wobei die Richtungsabhängigkeiten den Gesetzen der geometrischen Optik folgen.</p>

<u>Quantenmechanische Betrachtung</u>	<u>Geometrische Optik</u>	<u>Diese Arbeit</u>
<u>Streuung</u>		
<p>Absorption von Strahlung durch ein Streuzentrum (Molekül o.ä.) bei gleichzeitiger Anregung von Dipol-schwingungen im Streuzentrum und unmittelbar folgender Abgabe von Sekundärstrahlung. Die Sekundärstrahlung wird mit veränderter Ausbreitungsrichtung als Strahlung gleicher Wellenlänge emittiert (elastische Streuung) oder es werden langwelligere Photonen emittiert (z.B. Raman-Streuung) und das Molekül verbleibt in einem erhöhten Energiezustand (inelastische Streuung).</p>	<p>In der geometrischen Optik ist die Streuung von elektromagnetischer Strahlung meist schlicht als eine unscharf vorhersagbare Ablenkung der Ausbreitungsrichtung von der Ursprungsrichtung anzusehen.</p>	<p>In dieser Arbeit wird Streuung vor allem geometrisch betrachtet. Streulichtverluste wurden nicht explizit gemessen, sondern sind in der Extinktion inkludiert (mit Ausnahme der Raman-spektroskopischen Messungen, wo lediglich Streulicht das Messsignal bildet).</p>
<u>Reflexion</u>		
<p>Reflexion ist die gerichtete Rückstrahlung von Photonen als Sonderfall der Streuung. Hierbei interagieren Photonen und Moleküle, so dass es zu einer Photonenabsorption direkt gefolgt von einer Re-Emission kommt, wobei das emittierte Photon eine andere, vorhersagbare Ausbreitungsrichtung aufweist. Es kommt zu keinem dauerhaften Energieübertrag, analog zu einem elastischen Stoß.</p>	<p>In der geometrischen Optik folgt die Reflexion von Strahlung vor allem dem Reflexionsgesetz (Einfallswinkel = Ausfallswinkel) und wird mathematisch mittels einfacher Koeffizienten abgebildet.</p>	<p>In dieser Arbeit wird Reflexion meist geometrisch betrachtet, da sie vor allem im Zuge von Lichtverlusten an Grenzflächen (oder ihrer Rückreflexion in den Detektor) wichtig ist.</p> <p>Auch Reflexionsanteile wurden nicht explizit gemessen, sondern sind in der Extinktion inkludiert.</p>
<u>Fluoreszenz</u>		
<p>Hierbei werden Photonen von Molekülen absorbiert und nachfolgend als Photonen mit längeren Wellenlängen emittiert. Zunächst prinzipiell vergleichbar der Absorption, jedoch verbleibt nur ein Teil der absorbierten Energie im angeregten Molekül. Die Photonenemission erfolgt zudem isotrop in alle Raumrichtungen.</p>	<p>In der geometrischen Optik nicht relevant.</p>	<p>In dieser Arbeit wird unter dem Begriff Fluoreszenz die links aufgeführte quantenmechanische Deutung verstanden.</p> <p>Langlebigere Phosphoreszenzefekte spielen in dieser Arbeit keine Rolle.</p>
<u>Extinktion</u>		
<p>In der Quantenmechanik kein gebräuchlicher Terminus, außer ggf. zur Beschreibung des „Verschwindens“ eines Photons bei Übertragung von dessen Energie auf Materie.</p>	<p>In der klassischen Optik fasst dieser Begriff die Abschwächung einer Strahlung durch kombiniertes Wirken von Absorption, Reflexion, Streuung und Beugung zusammen.</p>	<p>In dieser Arbeit bezieht sich der Terminus Extinktion auf die kumulierte Abschwächung einer Messstrahlung durch die Kombination von Absorption, Streuung, Beugung und Reflexion, ohne, dass diese einzelnen Faktoren getrennt voneinander gemessen werden.</p>

<u>Quantenmechanische Betrachtung</u>	<u>Geometrische Optik</u>	<u>Diese Arbeit</u>
<u>Transmission</u>		
<p>Prinzipiell wechselwirkt Strahlung stets mit Materie, dies ist sogar der Fall wenn Strahlung durch transparente Medien tritt. Hierbei kommt es stets zu Anregungen von Elektronen, welche ihre Anregungsenergie jedoch direkt wieder als neue Huygenssche Elementarwellen abgeben. Diese Energieüberträge erfolgen ohne dass es Intensitätsverluste der Eingangstrahlung gib.</p> <p>Die Ursprungsfrequenz bleibt dabei erhalten, jedoch entsteht (außer im perfekten Vakuum) ein leichter Phasenversatz zur Strahlungsquelle bei Durchtritt von Photonen durch Materialien mit verschiedenen Brechungsindizes.</p>	<p>In der geometrischen Optik ist der transmittierte Strahlungsanteil jener, der zwar einen Phasenversatz erfahren kann, dessen Intensität jedoch bei Durchtritt durch eine Probe nicht beeinflusst wird.</p>	<p>In dieser Arbeit wird Transmission vor allem geometrisch betrachtet.</p> <p>Es wird davon ausgegangen, dass durch eine Probe transmittiertes Licht denselben (Polarisations-) Zustand aufweist, wie er zum Zeitpunkt der Photonenemission aus der Strahlungsquelle (bzw. nach Durchgang durch etwaige Polarisatoren) vorlag.</p> <p>Zudem wird angenommen, dass eine polarisationserhaltende Transmission durch Wasser gegeben ist.</p>
<u>Polarisation</u>		
<p>In der Quantenmechanik beschreibt die Polarisation eines Photons die Schwingungsrichtung seines elektrischen Feldes im dreidimensionalen Raum. Bis zum Zeitpunkt seiner Beobachtung (oder Modulation mittels Filtern o.ä.) ist der genaue Polarisationszustand eines einzelnen Photons unbestimmt, so dass ein einzelnes Photon viele mögliche Polarisationszustände gleichzeitig besitzt. Die Annahme von Polarisationseigenschaften einzelner Photonen als reine Eigenschaftswahrscheinlichkeiten ist (wie bereits weiter oben erwähnt) essentiell.</p>	<p>In der geometrischen Optik beschreibt die Polarisation lediglich die Schwingungsrichtung einer Strahlungswelle. Mathematische Abbildungen von Brechungs-, Reflexions- oder anderen Effekten sind damit grundsätzlich möglich.</p>	<p>In dieser Arbeit wird die Polarisation von Messstrahlung (sprich von gesamten Photonenwolken) mit jener einzelner Photonen äquivalent behandelt.</p> <p>Veränderungen der Polarisationszustände sowie ihre Quantifizierung werden lediglich anhand des Gesetzes von Malus auf das Verhalten der gesamten Photonenwolke bezogen und nachfolgend als Zustandswahrscheinlichkeit für die einzelnen Photonen angenommen.</p>

10.2 Ortsaufgelöste 3D-Messverfahren

In dieser Arbeit wurden neben klassischer Extinktionsspektroskopie zudem zwei bildgebende Verfahren erprobt. Dieser Abschnitt geht auf Tastversuche ein, die mittels holographischer Mikroskopie sowie optischer Kohärenztomographie durchgeführt wurden. Beide Methoden erlauben es, volumenbezogene Analysen von Proben durchzuführen und somit im dreidimensionalen Messraum Informationen zu sammeln.

10.2.1 Holographische Mikroskopie

Material & Methoden

Als experimentelles Versuchssetup wurden Messungen an einem Holografischen Mikroskop durchgeführt, welches aus einem Helium-Neon-Laser als Lichtquelle bestand, sowie einer CCD-Webcam, von welcher der Sperrfilter für NIR-Strahlung entfernt wurde. Die aufgenommenen Intensitätsprofile wurden nach dem von Sheng *et al.* (2006) beschriebenen Algorithmus ausgewertet und letztlich als schwarz-weiß-Grafiken dargestellt. Die Daten beziehen sich (abweichend von allen übrigen Versuchen) auf Messungen an Verdünnungen einer Kultur von *Porphyridium purpureum* (SAG-Stamnummer 1380-1c), welche in ES-Medium angezogen wurden. Dieser Organismus wurde ausgewählt, da zunächst Messungen an einem kugelförmigen einzelligen Organismus durchgeführt werden sollten, welcher einen geometrisch betrachtet simplen Körper darstellt. Ebenso abweichend von den übrigen Messreihen fanden diese Versuche in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von lediglich 5 Millimetern statt, um vor einer möglichen Übertragung des Prinzips auf Messungen im geschlossenen Reaktor zunächst eine generelle Machbarkeit holographischer Messungen zu untersuchen.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der holographischen Mikroskopie waren von so geringer Qualität, dass an dieser Stelle nur erwähnt werden soll, was mit dem Messsystem theoretisch möglich ist. Die verwendete CCD-Kamera hatte eine Auflösung von 1920 x 1080 Pixeln, welche sich auf eine Fläche von ca. 8 x 5 mm² verteilten. Bei einer Gesamtpixelanzahl von 2.073.600 und einer angenommenen Auflösung von einem Pixel pro Zelle, könnte man somit theoretisch diese Anzahl an Einzelzellen erfassen. In den durchgeführten Versuchen ergab sich bei einer Schichtdicke von 5 mm (bezogen auf die Kultursuspension) jedoch eine tatsächliche Pixelfläche von ca. 50 x 50 Pixeln pro einzelner Zelle.

Somit waren mit dem Versuchsaufbau Zelldichten von maximal 830 Zellen im vermessenen Kulturvolumen realisierbar. Dies entspricht bei der vermessenen Schichtdicke von 5 mm einer Zellkonzentration von $4.150 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$, bei welcher einzelne Zellen sicher voneinander abgrenzbar wären.

Diskussion & Bewertung

Wie bereits im Zuge der Ergebnispräsentation beschrieben, ergab sich bei dem verwendeten System eine maximale Auflösung von ca. $4.150 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ für eine Schichtdicke von 5 mm. Beachtet man, dass in durchschnittlichen Kulturen (vgl. Abschnitt 5.1.3) die vorherrschenden Zellzahlen im Bereich von mehrere Millionen Zellen pro Milliliter liegen, ist diese Auflösung als extrem gering einzustufen. Eine praxisnahe Anwendung zur Bestimmung von Zelldichten in Bioreaktoren ist somit (wenn überhaupt) nur gegeben, wenn die Schichtdicke der zu vermessenden Kultursuspension gegen Null tendiert, was in der Praxis kaum möglich ist.

Durch die Wahl hochauflösender Kamerasysteme (wie sie in kommerziellen und kostenintensiven Holographiesystemen, beispielsweise der Firma Lyncée Tec SA, Verwendung finden) lässt sich die Auflösung dieser Technik erheblich verbessern. Auch wenn eine Inhaltsstoffidentifizierung oder -quantifizierung in marinen Mikroorganismen ohne vorherige Probenaufbereitung kaum durchführbar sein dürfte, bietet diese Technik jedoch die Möglichkeit, Kultursuspensionen mit einer einzelnen Messung im Dreidimensionalen Raum zu erfassen und beispielsweise Fremdorganismen, Zellmorphologien oder andere Faktoren berührungslos zu bestimmen.

Ein Einsatz im entwickelten Reaktor erscheint aufgrund der hohen Schichtdicke der Kultursuspension kaum vorstellbar, bei Modifikation des Systems (beispielsweise durch den Einbau von Reaktorkompartimenten mit verringerter Schichtdicke der Kulturen) ist jedoch eine Implementierung der Holographie in die Reaktorsensorik zur Analyse von marinen Mikroorganismen denkbar, so wie sie beispielsweise von Monaldi *et al.* (2015) offline und nach vorheriger Probenpräparation an Einzelzellen bereits erprobt wurde.

10.2.2 Optische Kohärenztomographie

Material & Methoden

Die Messung wurden an dem von Donner *et al.* (2013) beschriebenen Messsystem durchgeführt, welches eine Eigenentwicklung des Laser Zentrums in Hannover darstellt. Hierbei wurde als Versuchsorganismus *Chlorella vulgaris* und als Lichtquelle eine Hochleistungs-NIR-Diode mit einem Emissionsmaximum bei 841 nm verwendet. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass es sich um eine Messung handelte mit dem Ziel, eine generelle Einsatzbarkeit dieser Messmethodik zur Untersuchung von Algenzellen zu erproben, da sich für diese Messtechnik (gerade im Hinblick auf zu erwartende Weiterentwicklungen) viele potenzielle Anwendungsmöglichkeiten erahnen lassen.

Ergebnisse

In Abbildung 10.1 ist eines der aufgenommenen Tomogramme einer dünn-schichtigen Kultur von *Chlorella vulgaris* gezeigt.

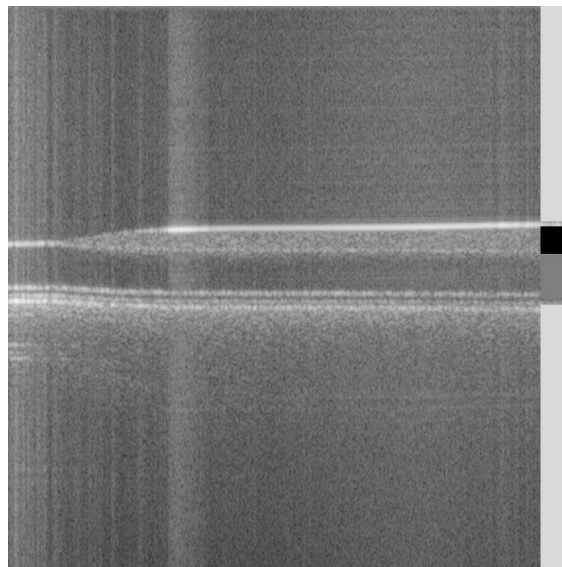


Abbildung 10.1: Tomogramm einer Kultur von *Chlorella vulgaris*, aufgenommen durch ein Polypropylen-Versuchsgefäß. Die farbigen Balken am rechten Bildrand dienen der erleichterten Bildinterpretation und sind wie folgt zuzuordnen: hellgrau: Luft; dunkelgrau: Wand des Versuchsgefäßes; schwarz: *Chlorella*-Kultur.

Leider wird ersichtlich, dass auf dem gezeigten Tomogramm keinerlei Detailstrukturen erkennbar sind. Das Versuchsgefäß erscheint im Bild lediglich als dunkles, waagrechtes Bildelement, von dem sich die oberhalb liegenden *Chlorella*-Zellen (durch den schwarzen Balken am rechten Bildrand gekennzeichnet) durch ihre hellere Färbung

abzeichnen. Zudem ist das Bild von Schlieren überlagert und einzelne Zellen der Algen sind nicht erkennbar.

Diskussion & Bewertung

Wie bereits erwähnt, handelte es sich um eine einmalige Messung an einem, sich in der Entwicklung befindlichen Messsystem. Das in Abbildung 10.1 gezeigte Tomogramm einer dünnsschichtigen Kultur von *Chlorella vulgaris* ist insofern interessant, als zwar keine einzelnen Zellen aufgelöst werden konnten (was sich mit den von Donner *et al.* (2013) publizierten Daten deckt), jedoch verschiedene Materialien klar voneinander abgrenzbar waren. Auch für diese Technik ist eine Anwendbarkeit zur Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten unwahrscheinlich. Nichts desto trotz könnte diese Technik genutzt werden, um Agglomerationen von Zellen in Suspensionskulturen zu detektieren, Kontaminationen zu erkennen oder weitere, sich in ihrem Brechungsindex von den Kulturen unterscheidende, Strukturen zu erfassen. Die Tatsache, dass die Messung im Versuch durch eine Plastiksicht hindurch erfolgen konnte, lässt den Schluss zu, dass derlei Messungen prinzipiell auch im geschlossenen Reaktorsystem durchführbar sind. Aussagen über die tatsächliche Anwendbarkeit sind aufgrund nicht existenter Fachliteratur zu dieser Kombination aus Organismus und Technik leider nicht möglich.

10.3 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Serge Alexander Zagermann
Geburtsdatum: 19.08.1985
Geburtsort: Bremen

Studium/Ausbildung

01.2011 - 07.2017 Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Biosystemtechnik; Promotion zum Thema „Optische *In-situ*-Analytik photoautotropher Mikroorganismen in einem entwickelten geschlossenen Einweg-Photobioreaktorsystem“

01.2011 - 04.2015 Leibniz Universität Hannover, AG Algenbiotechnologie der Abteilung Biosystemtechnik / des Instituts für Botanik; Leitendes Mitglied

10.2008 - 10.2010 Leibniz Universität Hannover; Master of Science im Studiengang Pflanzenbiotechnologie zum Thema „Entwicklung einer Methodik zur nicht-invasiven Online-Messung spektraler Charakteristika von Mikroalgen“

10.2008-04.2009 Medizinische Hochschule Hannover; Fortbildungskurs zum Projektleiter für gentechnische Sicherheit

10.2005 - 09.2008 Leibniz Universität Hannover; Bachelor of Science im Studiengang Pflanzenbiotechnologie zum Thema „Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Biomasseproduktion des Cyanobakteriums *Spirulina platensis*“

14.07.2004 Dr. Wilhelm Meyer Gymnasium Braunschweig, Hochbegabtenförderzweig; Abitur

Berufliche Praxis

Seit 05.2015 KWS Saat SE
Internationaler Produktmanager Sorghum / Mais

08.2014 - 02.2015 Leibniz Universität Hannover, Graduiertenakademie
Abschlussstipendiat

01.2011 - 07.2014 Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, wissenschaftlicher Mitarbeiter

Sonstige Engagements

Seit 11.2012 Stellvertretender Leiter des Arbeitskreises Biotechnologie im Bezirksverein Hannover des Vereins Deutscher Ingenieure (VDI)

10.4 Veröffentlichungen

Publikationen

- Koch, M., Zagermann, S., Kniggendorf, A.-K., Meinhardt-Wollweber, M., Roth, B. (2017)
Violaxanthin cycle kinetics analysed *in vivo* with resonance Raman spectroscopy
Journal of Raman Spectroscopy, 48, No. 5: 686-691
- Zagermann S., Menke S., Huchzermeyer B., Rath T. (2011)
Entwicklung einer Methodik zur nicht-invasiven Online-Bestimmung spektraler Charakteristika von Mikroalgen
DGG-Proceedings, Vol. 1, No. 11, p. 1-5

Vorträge

- Zagermann, S., Huchzermeyer, B., Rath, T. (2014)
Entwicklung eines geschlossenen Einweg-Photobioreaktors zur Durchführung von Screening-Experimenten an Mikroalgen
49. Gartenbauwissenschaftliche Tagung, Dresden, 05.03. – 08.03.2014
- Zagermann S., Huchzermeyer B., Rath T. (2012)
A low cost approach for large algal screening experiments
European Workshop Biotechnology of Microalgae, Nuthetal, 04. & 05.06.2012

Poster

- Zagermann, S., Steenfadt, F., Rath, T. (2014)
Polarisationsspektroskopische Quantifizierung von Biopolymeren in Mikroalgen und Cyanobakterien
49. Gartenbauwissenschaftliche Tagung, Dresden 05.03. – 08.3.2014
- Zagermann S., Menke S., Huchzermeyer B., Rath T. (2011)
Entwicklung einer Methodik zur nicht-invasiven Online-Bestimmung spektraler Charakteristika von Mikroalgen
47. Gartenbauwissenschaftliche Tagung, Hannover, 23.02. – 26.02.2011