

Pascale Fleck-Schneider

*Porphyridium purpureum:*  
Strukturierte Modellbildung  
und experimentelle Validierung  
der Stoffwechselreaktion auf  
Hell-Dunkel-Zyklen



Pascale Fleck-Schneider

***Porphyridium purpureum:***

**Strukturierte Modellbildung und experimentelle Validierung  
der Stoffwechselreaktion auf Hell-Dunkel-Zyklen**

***Porphyridium purpureum:***  
**Strukturierte Modellbildung und**  
**experimentelle Validierung der**  
**Stoffwechselreaktion auf**  
**Hell-Dunkel-Zyklen**

von  
Pascale Fleck-Schneider



---

universitätsverlag karlsruhe

Dissertation, Universität Karlsruhe (TH),  
Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik, 2004

### **Impressum**

Universitätsverlag Karlsruhe  
c/o Universitätsbibliothek  
Straße am Forum 2  
D-76131 Karlsruhe

[www.uvka.de](http://www.uvka.de)

© Universitätsverlag Karlsruhe 2005  
Print on Demand

ISBN 3-937300-38-4

*Porphyridium purpureum*: Strukturierte Modellbildung  
und experimentelle Validierung der Stoffwechselreaktion  
auf Hell-Dunkel-Zyklen

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)  
von der Fakultät für Chemieingenieurwesen  
der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (Technische Hochschule)  
genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Ing. Pascale Fleck-Schneider  
aus Schaffhausen

Tag des Kolloquiums: 8. April 2004

Referent: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten

Korreferent: Docteur d'Etat es Sciences Arnaud Muller-Feuga



## **Vorwort:**

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik (MVM) der Universität Karlsruhe (TH).

Die Zeit, die ich am Institut während meiner Promotion verbracht habe, hat nicht nur viel Spaß gemacht, ich habe dabei auch viel gelernt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und für die Übernahme des Hauptreferates. Ich bedanke mich für das große Vertrauen in meine Arbeit und für die mir gegebenen Freiheitsgrade sowie für seine stets riesengroße Geduld und Freundlichkeit.

Herrn Arnaud Muller-Feuga danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferates. Arnaud, je te remercie énormément d'avoir accepté d'être mon corréférant pour ma thèse.

Bedanken möchte mich bei der Arbeitsgruppe, die nicht nur für eine tolle Atmosphäre gesorgt hat, sondern auch für moralische und wissenschaftliche Unterstützung. Ein besonderer Dank geht an Dipl. Chemiker Karsten Schmidt, der mich im Labor mit viel Geduld eingearbeitet hat, sowie an Regina Mall und Verena Chawla (welche in der Zwischenzeit eine enge Freundin geworden ist), die bei der Realisierung der unzähligen Experimente mitgeholfen haben.

Bei Barbara Hoff bedanke ich mich für ständige EDV-Unterstützung und die Übernahme der Korrektur dieser Arbeit.

Weiter sei allen Studentinnen (Dipl.-Ing. Verena Schadler, Semiayu Tjandisaka, Nataliya Bilyk, Rosa Rosello, die inzwischen zu meiner großen Freude unserer Arbeitsgruppe angehört) und Studenten (Dipl.-Ing. Daniel Guter, Roy Peterson, Christian Kögele, Michael Gienow, Matthias Eisner, Kai Knörzer, Jürgen Weiß, Markus Degen und Markus Geiger) sowie den vielen Austauschstudenten gedankt, die mit viel Initiative, Engagement und Fleiß in Form von Studien- und Diplomarbeiten zu dieser wissenschaftlichen Arbeit beitrugen.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich im Verlauf meiner Ausbildung immer unterstützt haben, wo sie nur konnten.

Meinem Bruder Christian Fleck danke ich für seine Hilfsbereitschaft und moralische Unterstützung.

Meinem Mann Georg Schneider danke ich für soviel, dass man es nicht in Worte fassen kann. Ich bin einfach überglücklich, ihn an meiner Seite zu haben.

---

1	Einleitung und Zielsetzung .....	4
2	Grundlagen und Stand des Wissens .....	8
2.1	Mikroalgen .....	8
2.1.1	Klassifizierung .....	8
2.1.2	Vorkommen .....	9
2.1.3	Geschichte .....	9
2.1.4	Morphologie .....	10
2.2	Stoffwechselaktivität .....	12
2.2.1	Photosynthese .....	12
2.2.2	Lichtreaktion .....	12
2.2.3	Nichtzyklische Photophosphorylierung .....	13
2.2.4	Zyklische Photophosphorylierung .....	14
2.2.5	Calvin-Zyklus .....	16
2.2.6	Atmung .....	18
2.3	Lichtausnutzung .....	19
2.3.1	Licht-Photosynthese-Kurve .....	19
2.3.2	Hell-Dunkel-Zyklen .....	20
2.4	Produkte und ihre Anwendungen .....	24
2.4.1	Pigmente .....	24
2.4.2	Polysaccharide .....	25
2.4.3	Fettsäuren .....	27
2.5	Kultivierung von Mikroalgen .....	28
2.5.1	Offene Reaktoren .....	28
2.5.2	Geschlossene Reaktoren .....	31
2.6	Modellbildung .....	37
2.6.1	Unstrukturierte Modelle .....	37
2.6.2	Strukturierte Modelle .....	38
2.6.3	Segregierte Modelle .....	39
2.6.4	Neuere Modellansätze .....	39
2.6.5	Modellbildung von photoautotrophen Mikroorganismen .....	39
3	Material und Methoden .....	42
3.1	Organismus und Stammhaltung .....	42
3.2	Kultivierung im Photo-Bioreaktor .....	43

---

3.2.1 Photo-Bioreaktor .....	43
3.2.2 Online-Messungen .....	45
3.3 Analytische Methoden .....	49
3.3.1 Biotrockenmassenkonzentration .....	49
3.3.2 Polysaccharide: Konzentration und Charakterisierung.....	51
3.3.3 Monosaccharidbestimmung .....	53
3.3.4 Rheologische Messungen .....	55
3.3.5 Trennung von Polysacchariden.....	56
3.3.6 Bestimmung des Pigmentgehaltes .....	58
3.3.7 Bestimmung des Lipidgehaltes .....	59
3.3.8 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes .....	60
3.3.9 Eindimensionale Elektrophorese.....	62
3.4 Abgeleitete Größen .....	65
3.4.1 Offline-Größen .....	65
3.4.2 Produktbildungsraten .....	66
3.4.3 Online-Größen .....	67
3.4.4 Matlab / Simulink.....	68
3.4.5 Optimierungsprogramm .....	69
3.4.6 Sensitivitätsfunktion .....	71
4 Ergebnisse .....	73
4.1 Zielsetzung der experimentellen Untersuchungen .....	73
4.2 Kultivierung der Mikroalge <i>P. purpureum</i> .....	75
4.2.1 Kultivierungsverlauf.....	75
4.2.2 Experimente zum Einfluss der Dauerbeleuchtung .....	83
4.2.3 Experimente zum Einfluss von Hell-Dunkel-Zyklen.....	87
4.3 Quorum-Sensing-Nachweis .....	94
4.3.1 Zugabe der Polysaccharide .....	95
4.3.2 Kontinuierliche Abtrennung der Polysaccharide.....	99
4.4 Mathematisches Modell.....	106
4.4.1 Struktur .....	106
4.4.2 Stoffwechselnetzwerk .....	109
4.4.3 Lichtreaktion.....	110
4.4.4 Calvin-Zyklus.....	111
4.4.5 Atmung.....	112

---

4.4.6 Anabolismus.....	113
4.4.7 Ebene der funktionalen Makromoleküle .....	114
4.4.8 Reaktor-Ebene .....	116
4.4.9 Lichtabsorption.....	116
4.5 Simulationsergebnisse .....	120
4.5.1 Simulationsergebnisse für Dauerbeleuchtung.....	120
4.5.2 Simulationsergebnisse bei diskontinuierlicher Beleuchtung.....	124
4.5.3 Parameterschätzgenauigkeit.....	127
5 Diskussion.....	130
5.1 Kultivierungen der einzelligen Alge <i>Porphyridium purpureum</i> .....	130
5.2 Dauerbeleuchtung .....	131
5.2.1 Einfluss der Lichtintensität auf das Wachstum .....	131
5.2.2 Einfluss auf die Polysaccharidproduktivität .....	132
5.2.3 Einfluss der Dauerbeleuchtung auf den Pigmentgehalt .....	133
5.2.4 Einfluss der Dauerbeleuchtung auf die Fettsäurebildung.....	135
5.3 Diskontinuierliche Beleuchtung .....	135
5.3.1 Zyklen im Sekunden-Bereich .....	135
5.3.2 Zyklen im Stunden-Bereich .....	139
5.3.3 Zyklen im Millisekunden-Bereich.....	141
5.4 Biologische Funktion der Polysaccharide.....	143
5.5 Mathematisches Modell.....	145
6 Zusammenfassung.....	148
7 Literaturverzeichnis .....	151
8 Anhang.....	163

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Das Interesse in der Biotechnologie an den Mikroalgen hat in den letzten Jahren immer stärker zugenommen, da sie mit weit über 25.000 Arten ein bislang noch wenig erschlossenes Potential darstellen. Dies liegt zum einen an den technisch interessanten Möglichkeiten zur Herstellung von hochwertigen Naturstoffen und zum anderen am wichtigen ökologischen Einfluss der Algenphotosynthese auf den globalen Kohlenstoffkreislauf. So werden nach Lawlor (1990) jedes Jahr ca.  $10^{11}$  Tonnen Kohlendioxid reduziert und in organisches Material eingebaut, was einem Güterzug entspricht, der fünfmal von der Erde bis zum Mond und zurück reicht. Gleichzeitig wird Sauerstoff freigesetzt. Dabei werden mehr als 50% dieser Photosyntheseleistung von Planktonorganismen in den Weltmeeren erbracht.

Als wichtige Naturprodukte der Mikroalgen sind die Biomasse selbst und die in den Mikroalgen enthaltenen Wertstoffe zu nennen. Die Mikroalgen wurden zunächst als Proteinquelle für Menschen und Tiere ausgenutzt, diese Anwendung hat aber in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie in Mitteleuropa bis heute nur geringfügige Bedeutung.

Dagegen sind Algen vor allem im asiatisch-pazifischen Raum ein begehrtes proteinhaltiges Lebensmittel und vom Speiseplan nicht mehr wegzudenken. Die Jahresproduktion lag im Jahr 2000 bei 2500 Tonnen Biotrockenmasse, davon entfiel knapp die Hälfte auf die Vereinigten Staaten von Amerika, der Rest wurde überwiegend in China, Vietnam und anderen Staaten des Fernen Ostens, weniger im mittelamerikanischen Raum produziert (Borowitzka, 1999).

Die größten Möglichkeiten für eine weitere Expansion der Mikroalgen-Biotechnologie werden zur Zeit in der Gewinnung ihrer Produkte gesehen, wie Polysaccharide, Pigmente, hochungesättigte Fettsäuren, und Antioxidantien mit interessanten Einsatzgebieten in der Lebensmittel-, Kosmetik- und Pharmaindustrie (Richmond, 1986; Shimizu, 1996; Yamaguchi, 1997).

Speziell in diesen Bereichen kann aber nicht mit offenen Becken in extensiven Verfahren gearbeitet werden. Aus Gründen der Qualitätssicherung werden Produkte für Pharmazie oder Kosmetik in geschlossenen Photo-Bioreaktoren kultiviert. Diese kostenintensive und anspruchsvolle Form der Kultivierung ist wegen der Höhe der Wertschöpfung auch für Mitteleuropa interessant und wird zunehmend praktiziert. So

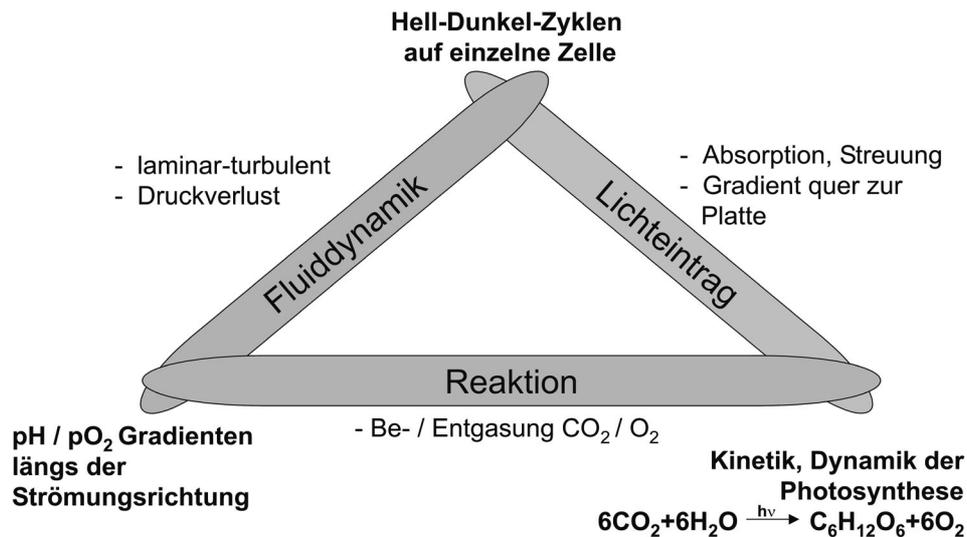
wurde beispielsweise in Klötze bei Wolfsburg in 2000 die weltgrößte geschlossene Anlage mit einem Gesamtvolumen von 700 m<sup>3</sup> errichtet (Pulz, 2001).

Dem gegenüber steht aber eine im Vergleich mit anderen Bioprozessen geringe Vorhersagbarkeit solcher phototropher Prozesse, da die Zellen in komplexer Weise auf die spezifischen Bedingungen im Reaktor reagieren. Diesem Mangel soll im Rahmen dieser Arbeit entgegengewirkt werden. Dabei ist die Hauptzielsetzung des Projekts jedoch nicht die Massenkultivierung, sondern vielmehr das Verständnis von Wachstum und Produktbildung in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen.

### **Zielsetzung und Konzept**

Die experimentellen Untersuchungen zu Wachstum und Produktbildung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* in Abhängigkeit von Kultivierungsparametern sowie die Modellierung ihrer Stoffwechselaktivität zur besseren Vorhersagbarkeit und zur Auslegung von Pilotanlagen stellen die beiden Hauptschwerpunkte dieser Arbeit dar.

Die Gewinnung der Biomasse oder eines der gewünschten Makromoleküle der Mikroalge hängt in komplexer Weise mit den Kultivierungsbedingungen zusammen. Die Kultivierungsbedingungen sind bei Algen nicht nur durch Medienzusammensetzung, Temperatur und Begasung (anorganische Kohlenstoffquelle), sondern in hohem Maße auch durch die Bestrahlung mit Licht charakterisiert. Eine Veränderung der Lichtquantität oder der Lichtqualität (Änderung der Wellenlängenzusammensetzung oder Hell-Dunkel-Zyklen) hat dabei einen sehr großen Einfluss auf die Bildungsraten der unterschiedlichen Makromoleküle der Mikroalgen. Auch innerhalb eines technischen Photo-Bioreaktors sind die Zellen aufgrund des nicht gradientenfreien Betriebs ständigen Änderungen der Umgebungsbedingungen unterworfen (s. Abbildung1).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der vorhandenen Wechselwirkungen in einem Photo-Bioreaktor. Die drei Hauptwechselwirkungen sind der Lichteintrag in den Reaktor, die Fluidynamik der Suspension, sowie die Reaktionen der zugegebenen Gase.

Aufgrund der abnehmenden Eindringtiefe des Lichts mit zunehmender Zelldichte entstehen in Produktionsanlagen unvermeidliche Lichtgradienten, die im Zusammenwirken mit Turbulenzen der Flüssigphase zu Hell-Dunkel-Zyklen im Bereich von Sekunden bis Millisekunden führen. Die Auswirkungen dieser Zyklen auf Wachstum und Produktbildung sind bislang nur sehr wenig erforscht worden, diese sollen daher im Rahmen dieser Arbeit detailliert untersucht werden. Um dies realisieren zu können, wird ein homogen von innen beleuchteter Photo-Bioreaktor verwendet. Die Auswirkungen der Hell-Dunkel-Zyklen werden dabei für Zyklendauern im Bereich von Millisekunden bis Stunden untersucht. Die Hell-Dunkel-Zyklen im Stunden-Bereich wurden durchgeführt, um das Verständnis der zwei Hauptstoffwechselaktivitäten der Mikroalgen - Photosynthese und Atmung - zu vertiefen.

Die durchgeführten Kultivierungen werden in kontinuierlichem Betrieb (Turbidostat) gefahren, um eine möglichst große Vergleichbarkeit der dabei gewonnenen Ergebnisse gewährleisten zu können.

Als Forschungsobjekt dient die Mikroalge *Porphyridium purpureum*. Für die Auswahl dieser Mikroalge sprechen mehrere Gründe. *Porphyridium purpureum* ist in der Literatur biologisch gut charakterisiert, während ihr gleichzeitig eine große Bedeutung in der Mikroalgen-Biotechnologie zukommt. Sie bildet eine Vielfalt an

intra- und extrazellulären Produkten (hoher Gehalt an hoch ungesättigten Fettsäuren, Pigmenten und Polysacchariden), die ein großes kommerzielles Potential aufweisen. Kultivierungen bei Dauerbeleuchtung mit definierten Bedingungen werden ebenfalls durchgeführt, sie sollen dazu dienen, Informationen über das Verhalten der Mikroalgen im stationären Zustand in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte zu gewinnen. Die Auswirkungen dieser Kultivierungsparameter werden nicht nur allgemein bezogen auf das Wachstum der Mikroalgen bestimmt, sondern ebenso bezogen auf die Zusammensetzung der Zelle selbst.

Auf der Grundlage der experimentellen Ergebnisse wird ein mathematisches Simulationsmodell erstellt, welches das Wachstum und die Zellzusammensetzung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* auf makromolekularer Ebene beschreibt.

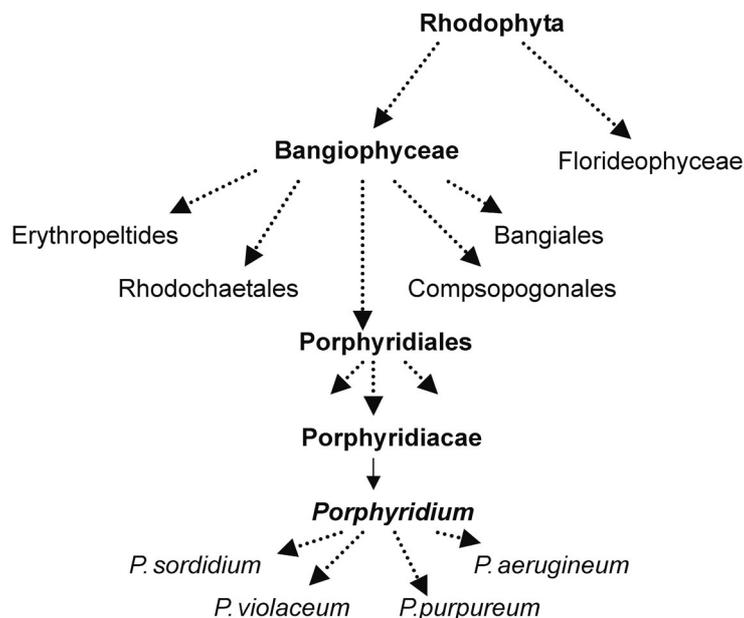
Dieses mathematische Modell unterteilt sich in drei unterschiedliche Ebenen. Berücksichtigt werden die Reaktor-Ebene, die Ebene der funktionalen Makromoleküle und die Ebene der Stoffwechselnetzwerke. Die Reaktorebene berücksichtigt die Vorgänge in der Gas- und Flüssigphase sowie das von der Mikroalge absorbierte Licht in Abhängigkeit von der Reaktorgeometrie, der Pigmentausstattung der Mikroalge sowie von der Charakteristik der verwendeten Lampe. Die Ebene der Stoffwechselnetzwerke betrachtet die biologischen Vorgänge in der Zelle, wie die Photosynthese oder die Atmung, sowie die Bildung der jeweiligen Makromoleküle der Zelle. Die Ebene der funktionalen Makromoleküle berücksichtigt die Wechselwirkungen, die die Makromoleküle auf ihre eigene Neubildung haben können. Makromoleküle wie Pigmente regulieren einerseits den Stoffwechsel, andererseits sind sie interessante Produkte.

## 2 Grundlagen und Stand des Wissens

### 2.1 Mikroalgen

#### 2.1.1 Klassifizierung

Die einzellige Alge *Porphyridium purpureum* ist eine eukaryotische Rotalge, die zur Abteilung der Rhodophyta gehört (Vonshak, 1988). Die Rhodophyta oder Rotalge stellt eine der beiden Klassen der Abteilung der Rhodophyta dar und ist wahrscheinlich die älteste Abteilung eukaryotischer Algen. Die Artenvielfalt der Rhodophyta (ungefähr 4000 Spezies) ist größer als die aller anderen Klassen von Mikroalgen (Lee, 1989). Die endgültige taxonomische Zuordnung von *Porphyridium purpureum* erfolgte durch Lewis und Zirkle (1920). Danach gehört *Porphyridium* in die Abteilung der Rhodophyta, sub-class Bangiophycidae, zur Ordnung Porphyridiales, Familie der Porphyridiaceae. Die Gattung *Porphyridium* enthält vier Spezies: *P. aerugineum*, *P. purpureum*, *P. violaceum* und *P. sordidum*. Es existieren heute zwölf isolierte Stämme, die auf die drei Algensammlungen in Göttingen (Sammlung SAG, Deutschland), Cambridge (Sammlung CCAP, England) und Austin (Sammlung UTEX, USA) verteilt sind.



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung der taxonomischen Zuordnung der Mikroalge *Porphyridium purpureum*, früher *Porphyridium cruentum* oder *Phyctonis purpureum* genannt, nach Lewis und Zirkle (1920).

### 2.1.2 Vorkommen

Die meisten Rotalgen leben an felsigen Meeresküsten. Die größte Tiefe, in der sie jemals beobachtet werden konnten, liegt bei 268 m. In dieser Tiefe wurden auf einem unterseeischen Gebirge vor den Bahamas krustenförmige Rotalgen gefunden, die dort nur noch 0,001% der Lichtintensität, die an der Wasseroberfläche herrscht, zur Verfügung haben. Fossile Reste verkalkter Rotalgen sind schon aus dem Kambrium, d.h. aus einer Zeit vor ca. 600 Millionen Jahren, bekannt. Seit dieser Zeit tragen sie wesentlich zur Bildung mariner Kalksedimente und wichtiger Gesteinsschichten bei. Die vier Spezies der Gattung *Porphyridium* kommen im Meer, in Brackwasser, in Süßwasser und an terrestrischen Standorten vor. Die Mikroalge *Porphyridium purpureum* kommt auch auf feuchten Mauern und in feuchter Erde vor. Die Vielfalt der ökologischen Fundorte der Mikroalge lassen eine große Adaptationsfähigkeit vermuten (Leclerc, 1967).

### 2.1.3 Geschichte

*Porphyridium purpureum*, früher auch *Porphyridium cruentum* genannt, wurde zum ersten Mal 1849 von Naegali (1849) beschrieben. Ihr Name beruht auf ihrer purpurnen Färbung. Gaidukoy hatte sie 1899 aus dem Boden isoliert. Kultiviert wurde sie von Kufferath (1913) als Reinkultur auf festem Nährmedium. Erste Experimente wurden nur 20 Jahre später von Vischer (1935) veröffentlicht, das dabei erzielte Wachstum war sehr gering. Im Jahre 1949 berichten Pringsheim und Pringsheim (1949) von einer relativ guten Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroalgen sowohl auf festem als auch auf einem auf natürlichem Meerwasser basierenden Nährmedium. Sie vermuten aufgrund dieser Beobachtung eine marine Herkunft der Mikroalge (Vonshak, 1988). Diese Hypothese wird später auch bestätigt. Kylin beschreibt 1937 eine marine Spezies von *Porphyridium*, die eine identische Morphologie wie die der Mikroalge *Porphyridium purpureum* aufweist. *Porphyridium purpureum* wird erneut in mariner Umgebung von Starr (1960), später auch von Alle (1960) im Jahr 1960 isoliert. Im Jahre 1961 beschreibt Rieth einen Stamm von *Porphyridium purpureum*, der aus der Bucht von Neapel isoliert wurde. Er kommt zu dem Schluss, dass die marinen und terrestrischen Stämme nur Ökotypen desselben Stammes sind (Vonshak, 1988). 1963 publiziert Jones et al. (1963) ein optimiertes Kultivierungs-

medium für die Mikroalge, das auf künstlichem Meerwasser basiert (ASW-Medium, artificial sea water). Seit diesem Zeitpunkt hat sich das ASW-Medium als Standardmedium für die Kultivierung von *Porphyridium purpureum* etabliert.

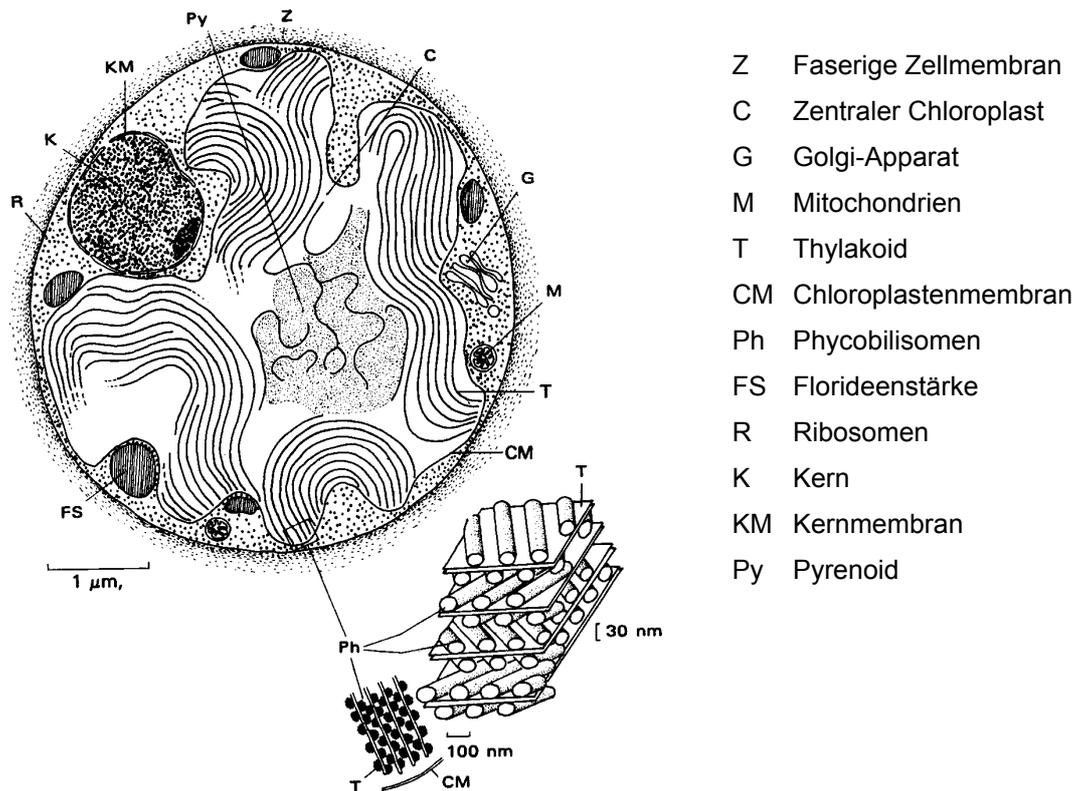
#### 2.1.4 Morphologie

*Porphyridium purpureum* ist eine einzellige kugelförmige Mikroalge mit einem Durchmesser von 4 - 9 µm. Die Zellen können einzeln, in Gruppen oder als unregelmäßige Zellhaufen vorkommen. Manche Zellen besitzen eine amöboide Form und können deswegen größer sein als der Rest der Kolonie. Die Vermehrung von *Porphyridium* erfolgt asexuell durch Zellteilung.

Schmitz gibt 1882 als Erster eine zutreffende Beschreibung des Zellaufbaus und eine gute Abbildung der Mikroalge. Die Zelle wird von außen durch eine Zellwand (Z) begrenzt, die aus einem fibrillären Anteil aus Xylan und Mannan (Polymere der Xylose beziehungsweise Mannose) besteht, was der Zelle Festigkeit verleiht. In diesem fasrigen Geflecht ist eine amorphe Matrix aus Galactan eingebettet. Galactan, sowie andere vorhandene Polysaccharidarten werden im Inneren der Zelle durch den Golgi-Apparat (G) gebildet und durch Golgi-Vesikel an die Zellmembran transportiert. Nahrungsreserve ist das Polysaccharid Florideenstärke (FS), ein  $\alpha$ -1,4-gebundenes Glucan. Körner dieser Stärke werden auf der Oberfläche der Chloroplasten gebildet.

Der Chloroplast (C) wird nach außen hin durch eine Doppelmembran begrenzt, deren zwei Teilmembranen etwa 13 nm voneinander entfernt liegen. In seinem Inneren befindet sich ein Pyrenoid, der Energie in Form von Stärke speichert.

Die Thylakoide (T), die ein eigenständiges Membransystem innerhalb der Zelle darstellen, liegen parallel zur Chloroplastenhülle in Form von Stapeln vor. Auf diesem Membransystem liegen dicht nebeneinander halbkugelförmige Körper von 30-40 nm Durchmesser, welche die Phycobiliproteine enthalten und als Phycobilisome (Ph) bezeichnet werden. Phycobilisome sind akzessorische Pigmente, welche die aufgenommene Lichtenergie sehr effektiv an das Chlorophyll a des Photosystems II weitergeben. Die Lipiddoppelmembranen der Thylakoide enthalten die in Lipiden löslichen Photosynthesepigmente Chlorophyll a und Carotinoide. In den Mitochondrien findet der Umkehrprozess der Photosynthese, nämlich die Atmung statt.



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung einer elektronenmikroskopischen Zellaufnahme der Mikroalge *Porphyridium purpureum*. Es handelt sich dabei um eine kugelförmige Mikroalge mit einem Durchmesser zwischen 4 und 9 µm (Hoeck et al., 1993).

## 2.2 Stoffwechselaktivität

Die Photosynthese, die sich in zwei Reaktionen unterteilt, die Lichtreaktion und die Dunkelreaktion, sowie die Atmung stellen die zwei vorherrschenden Stoffwechselaktivitäten der Mikroalgen dar. Da sie sowohl Grundlage für die Auswertung einer Reihe von Untersuchungen als auch Basisgrößen des mathematischen Modells der vorliegenden Arbeit sind, werden ihre Abläufe nachfolgend skizziert.

### 2.2.1 Photosynthese

Unter Photosynthese wird die Bildung der Reduktionsäquivalente übertragenden Verbindung  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  und des in Form von Pyrophosphatbindungen chemische Energie speichernden ATP unter Ausnutzung von Lichtenergie und der Verbrauch dieser Verbindungen zur Assimilation von  $\text{CO}_2$  in organisch gebundenem Kohlenstoff verstanden. Die Photosynthese wird in zwei Teilreaktionen unterteilt: die Lichtreaktion und die Dunkelreaktion.

### 2.2.2 Lichtreaktion

Durch die Lichtreaktion wird Licht unterschiedlicher Wellenlänge genutzt, um daraus das Energieäquivalent Adenosintriphosphat (ATP), das Reduktionsäquivalent  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  und Sauerstoff zu bilden. An der Lichtreaktion der eukaryotischen Zelle sind die Photosysteme I (PSI) und II (PSII) beteiligt.

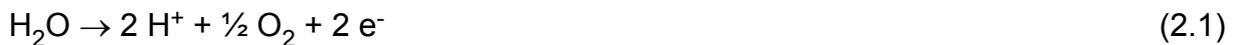
Während diese beiden Photosysteme in den meisten photoautotrophen Mikroorganismen räumlich getrennt sind, liegen sie in *Porphyridium purpureum* nebeneinander. Sie besitzen dennoch jeweils eigene Reaktionszentren und Antennenpigmente und sind lediglich über eine Elektronentransportkette miteinander verbunden. Bei *Porphyridium purpureum* setzt sich das PS I aus einem Reaktionszentrum P700 und einem Antennenkomplex zusammen, der überwiegend aus Chlorophyll a aufgebaut ist. Das Chlorophyll-Paar im Reaktionszentrum des Photosystems I wird P700 genannt, da es Licht bei einer Wellenlänge von 700 nm am besten absorbieren kann. Die Phycobiliproteide sind nur geringfügig an der Photoaktivität im PS I beteiligt. Dagegen besteht das PS II aus einem Reaktionszentrum P680 (das Maximum seines Absorptionsspektrums liegt bei 680

nm) mit einem Antennenkomplex, der überwiegend aus Phycobiliproteiden gebildet wird.

Die Antennensysteme leiten die absorbierte Energie über eine Abfolge von Pigmenten mit immer stärker in den Rotbereich verschobenen Absorptionsmaxima zum Reaktionszentrum. Diese Rotverschiebung des Absorptionsmaximums bedeutet, dass die Energie des angeregten Zustandes mit zunehmender Nähe zum Reaktionszentrum etwas abnimmt.

### 2.2.3 Nichtzyklische Photophosphorylierung

Die Lichtaufnahme des PS II, vor allem durch die Phycobiliproteide führt zu dessen energetischer Anregung und ermöglicht aufgrund eines stark negativen Potentials die schnelle Abgabe eines energiereichen Elektrons an den ersten primären Elektronenakzeptor (Pheophytin). Durch Hydrolyse von Wasser wird das entstandene Elektronendefizit ausgeglichen. Dabei wird Sauerstoff gebildet und es werden Elektronen freigesetzt.

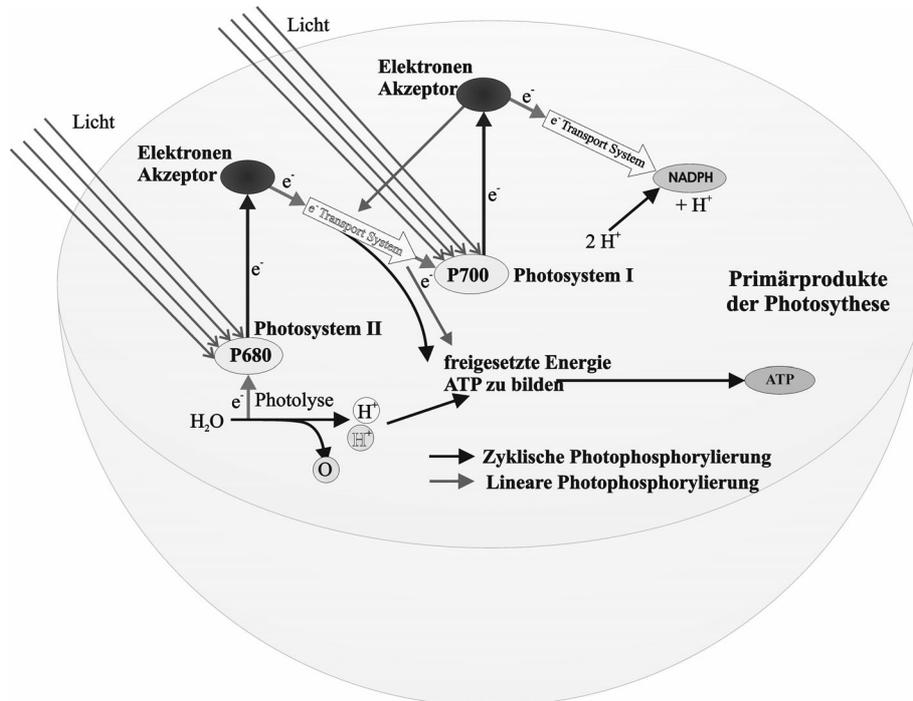


Die Elektronen werden über Redoxpaare weitertransportiert und in das Plastichinonpool weitergeleitet. Das Plastichinonpool besteht aus einer großen Zahl von Plastichinon-Molekülen, die über einen Chinon-Hydrochinon-Zyklus Elektronen zum Cytochrom- $b_6$ -f-Komplex transportieren und gleichzeitig Protonen aus dem Chloroplasten-Strom in das Thylakoidinnere überführen. Durch die Anhäufung von Protonen in den Thylakoiden entsteht ein treibender Gradient, der nach der chemiosmotischen Hypothese zum Efflux von Protonen durch die ATP-Synthase und zur Bildung von ATP aus ADP und organischem Phosphat führt.



Vom Cytochrom- $b_6$ -f-Komplex werden die Elektronen über Plastocyanin auf Chlorophyll a übertragen, das als Elektronendonator des Photosystems I (PS I) fungiert. Die Oxidation kommt wie beim PS II durch Anregung der Antennenpigmente und Weiterleitung der Elektronen zum primären Elektronenakzeptor des PS I zustande. Analog zum Photosystem II besitzt dieses im Grundzustand ein höheres Redoxmittelpotential als im angeregten Zustand. Durch die Anregung steigt also die Tendenz zur Abgabe von Elektronen. Von diesem Reaktionszentrum aus werden die

Elektronen auf Ferredoxin übertragen, von wo aus sie über Ferredoxin-NADP-Oxidoreductase zur Reduktion von  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  (auch  $\text{NADPH}_2$  abgekürzt) verwendet werden. Dieser Vorgang wird auch als nichtzyklische Photophosphorylierung bezeichnet.



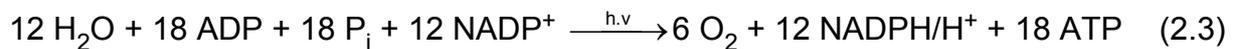
**Abbildung 2.3:** Detailliertes Z-Schema nach Hill: Während der Photosynthese wird Lichtenergie verschiedener Wellenlängen durch zwei getrennte Photosysteme mit den jeweiligen Reaktionszentren P680 und P700 in chemische Energie (ATP und NADPH) umgewandelt (schematische Darstellung, erstellt am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik).

## 2.2.4 Zyklische Photophosphorylierung

Für Elektronen aus dem Reaktionszentrum P700 des Photosystems I existiert ein alternativer Weg. Das im Ferredoxin enthaltene Elektron hohen Potentials kann statt auf  $\text{NADP}^+$  auch auf den Cytochrom- $b_6$ -f-Komplex übertragen werden. Dieses Elektron fließt dann über das Plastocyanin zurück zur oxidierten Form des P700. Durch diesen zyklischen Elektronenfluss werden ausschließlich Protonen durch den Cytochrom- $b_6$ -f-Komplex gepumpt. Der Protonengradient treibt dann die Synthese von ATP an. In diesem Prozess der zyklischen Photophosphorylierung wird ATP ohne gleichzeitige Bildung von  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  erzeugt. Die Funktion, welche die zyklische Photophosphorylierung bei der Lichtreaktion erfüllt, ist bis heute noch

ungeklärt. Beim nichtzyklischen Prozess entstehen ATP und NADPH+H<sup>+</sup> in ungefähr äquimolaren Mengen (1:1,5), aber der Calvin-Zyklus verbraucht mehr ATP als NADPH+H<sup>+</sup>, wie noch in den nächsten Abschnitten vorgestellt wird. Der Unterschied soll den zyklischen Elektronentransport ausgleichen. Vermutlich bestimmt die NADPH+H<sup>+</sup>-Konzentration im Chloroplasten darüber, welchen der beiden Wege - den zyklischen oder den nichtzyklischen - die Elektronen in der Lichtreaktion einschlagen. Wird das ATP für den Calvin-Zyklus im Chloroplasten knapp, so sammelt sich NADPH+H<sup>+</sup> an, weil der Calvin-Zyklus seinen Durchsatz verlangsamt. Dieser Anstieg der NADPH+H<sup>+</sup>-Menge dürfte für eine Verschiebung vom nichtzyklischen zum zyklischen Elektronentransport sorgen, bis der Nachschub an ATP wieder dem Bedarf entspricht.

Als Bruttogleichung der Lichtreaktion ergibt sich folgende Formel:

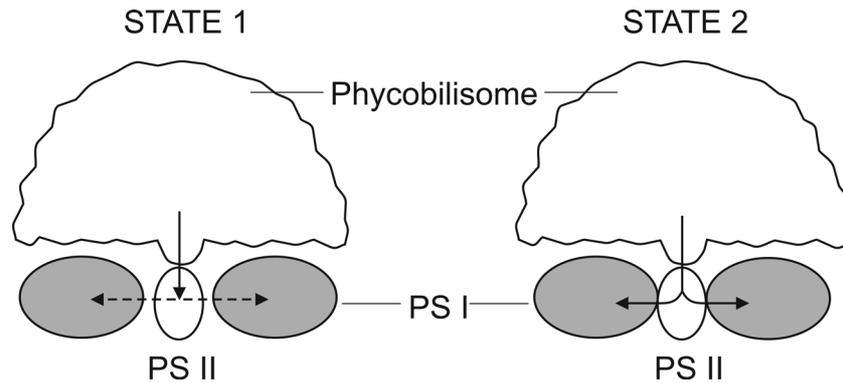


Neben der beschriebenen schrittweisen Energieübertragung von PS II zu PS I konnten bei *Porphyridium purpureum* weitere Mechanismen zur Energieübertragung abhängig von der Wellenlänge des absorbierten Lichtes beobachtet werden.

Im Zustand 1 (State 1) wird das vom Phycobilisom absorbierte Licht auf PS II übertragen und PS I wird mit der Energie versorgt, die vom Chlorophyll direkt absorbiert worden ist. Im Zustand 2 (State 2) ist eine verstärkte Versorgung von PS I mit Anregungsenergie zu beobachten.

Diskutiert werden drei verschiedene Modelle, die diese Beobachtung erklären könnten:

1. Das Phycobilisom bewegt sich von PS II zu PS I („mobile model“).
2. PS II strahlt überschüssige Energie ab, die von PS I angenommen wird („spill over model“).
3. Das Phycobilisom koppelt sich von PS II ab und vermindert damit den Absorptionsquerschnitt von PS II, und es kommt nur zu einer relativen Erhöhung der PS I-Aktivität.



**Abbildung 2.4:** Modell des Mechanismus zur Übertragung der aufgenommenen Energie zwischen den beiden photosynthetischen Systemen PS II und PS I, der durch ihre geometrische Anordnung bedingt ist (Gantt, 1989).

Nach der Energiegewinnung durch die Lichtreaktion folgt die Fixierung des aufgenommenen Kohlendioxids unter Verbrauch dieser Energie, wobei dabei Zucker gebildet wird. Diese Reaktion wird durch den Calvin-Zyklus beschrieben.

### 2.2.5 Calvin-Zyklus

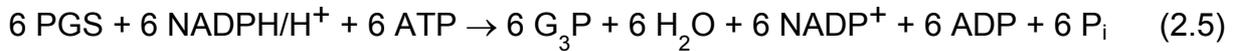
Die Stoffwechselreaktionen des Calvin-Zyklus werden auch Dunkelreaktion genannt, da Licht nicht unmittelbar benötigt wird. Dennoch läuft der Calvin-Zyklus in den meisten Mikroorganismen bei Tageslicht ab, denn nur dann können die Lichtreaktionen jene  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ - und ATP-Moleküle regenerieren, die bei der Reduktion von  $\text{CO}_2$  zu Zucker verbraucht werden.

Beim Calvin-Zyklus wird im Stroma der Chloroplasten das  $\text{CO}_2$  mit Hilfe der in der Lichtreaktion gebildeten Primärprodukte zu Zucker umgewandelt. Dieser Vorgang lässt sich in drei Phasen einteilen und wird durch den Calvin-Zyklus beschrieben.

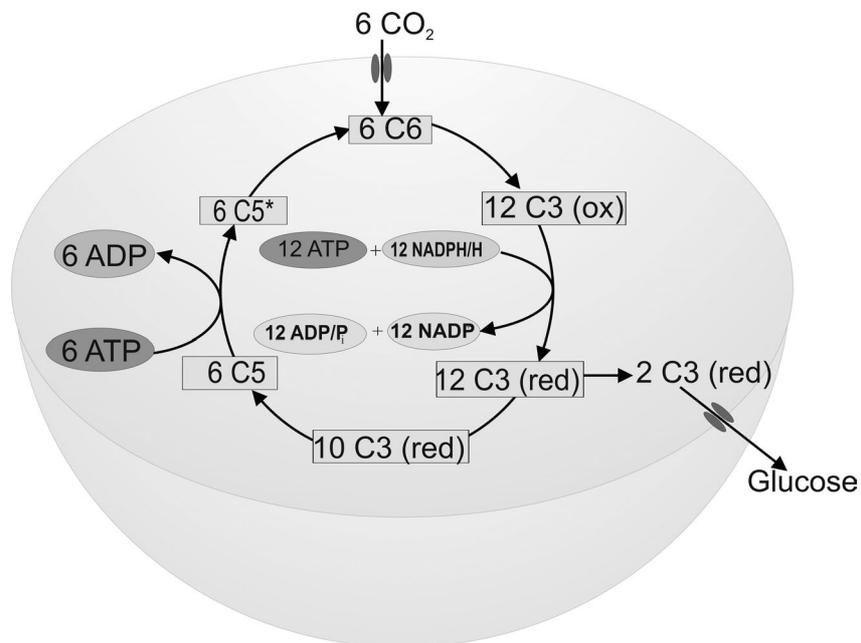
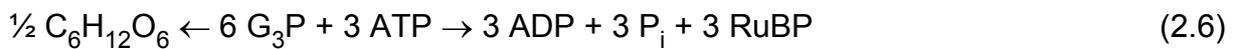
In der ersten Phase dient Ribulose-1,5-bis-Phosphat (RuBP), ein  $\text{C}_5$ -Körper, als Akzeptor, der am Ende des Zyklus wieder regeneriert wird.  $\text{CO}_2$  wird an RuBP gebunden. Das entstandene Zwischenprodukt wird unter Wasserverbrauch in zwei Glycerinsäure-3-Phosphat-Moleküle (PGS, 3-Phosphoglycerat), einem  $\text{C}_3$ -Körper, gespalten. Als katalysierendes Schlüsselenzym wirkt dabei Ribulose-1,5-bis-Phosphat-Carboxylase.



An die carboxylierende Phase schließt sich die reduzierende Phase an, in der Glycerin-aldehyd-3-phosphat (G3P) gebildet wird, ein weiterer C<sub>3</sub>-Körper. Die durch die Lichtreaktion zur Verfügung gestellten Produkte ATP und NADPH+H<sup>+</sup> werden verbraucht und deren Äquivalente ADP und NADP<sup>+</sup> der Lichtreaktion wieder zugeführt.

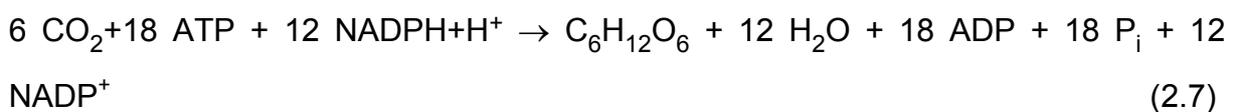


G3P wird in der regenerierenden Phase über mehrere gekoppelte Reaktionen unter ATP-Verbrauch zu RuBP umgewandelt. Hierbei werden ein Sechstel der G3P-Moleküle aus dem Calvin-Zyklus ausgeschleust und zu Glucose synthetisiert.



**Abbildung 2.5:** Schematischer Verlauf des Calvin-Zyklus der Photosynthese, auch Dunkelreaktion genannt, bei der aus Energie und CO<sub>2</sub> Glucose gebildet wird. Quelle (Institut für Mechanische Verfahrenstechnik).

Somit ergibt sich für die Dunkelreaktion folgende Bruttogleichung:



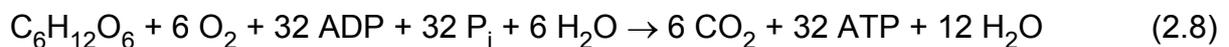
### 2.2.6 Atmung

Die Atmung dient der Zelle als Energieversorgung während längerer Dunkelphasen wie zum Beispiel in der Nacht. Die Atmung gliedert sich in drei Abschnitte: Glykolyse, Citratzyklus und Elektronentransportkette.

Die **Glykolyse** besteht aus einer Abfolge von Reaktionen, die lösliche, im Cytosol lokalisierte Enzyme ausführen. Chemisch gesprochen wird Glucose partiell oxidiert, um zwei Moleküle Pyruvat (eine C<sub>3</sub>-Verbindung), eine geringe Menge ATP und Reduktionsäquivalente in Form des reduzierten Pyridinucleotids NADPH+H<sup>+</sup> zu bilden. Die Reaktion des Citratzyklus und der Elektronentransportkette findet innerhalb einer membranumschlossenen Organelle, dem Mitochondrium, statt. Im **Citratzyklus** wird das Pyruvat vollständig zu CO<sub>2</sub> oxidiert und dabei eine beträchtliche Zahl von Reduktionsäquivalenten (etwa 10 NADPH+H<sup>+</sup> - Äquivalente pro mol Glucose) erzeugt. Mit Ausnahme der Succinat-Dehydrogenase beteiligen sich an diesen Reaktionen eine Reihe löslicher Enzyme, die in der inneren, wässrigen Phase des Mitochondriums - der Matrix - vorkommen.

Die **Elektronentransportkette (Atmungskette)** besteht aus einer Sammlung von Elektronentransportproteinen, die an die innere der beiden Mitochondrienmembranen gebunden sind. Dieses System überträgt Elektronen von NADPH+H<sup>+</sup> und anderen Reduktionsäquivalenten, die in der Glykolyse und im Citratzyklus gebildet werden, auf Sauerstoff. Der Elektronentransfer setzt eine große chemische Energie frei, von der ein großer Teil durch die Umsetzung von ADP und P<sub>i</sub> zu ATP gespeichert wird. Dieser letzte Abschnitt vollendet die Glucoseoxidation.

Die Bruttogleichung der Atmung lautet:

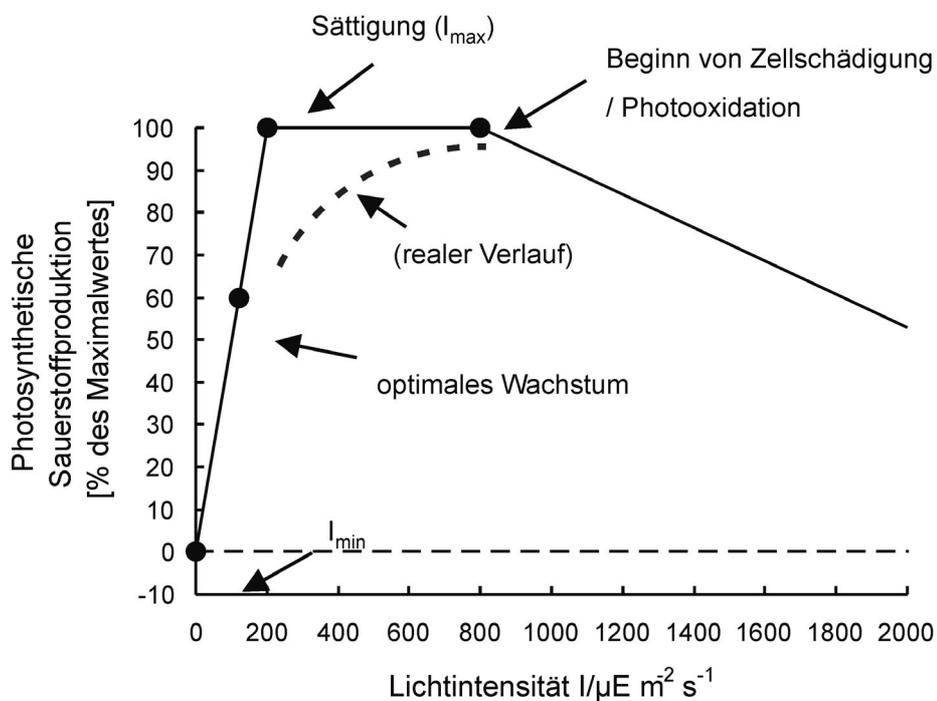


## 2.3 Lichtausnutzung

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde, ist das Licht die treibende Kraft der Photosynthese. Die Nutzungseffizienz der Lichtquanten im Verlauf der Lichtreaktion wird durch eine Sättigungskurve beschrieben, die im nächsten Abschnitt näher erläutert wird.

### 2.3.1 Licht-Photosynthese-Kurve

Die Abhängigkeit der Photosyntheserate von der Lichtintensität wird durch eine typische Sättigungskurve charakterisiert (Abbildung 2.6). Unterhalb der minimal erforderlichen Lichtintensität (Lichtkompensationspunkt  $I_{\min}$ ) ist keine positive Photosyntheserate möglich. In diesem Bereich verbraucht die Mikroalge mehr Energie für ihren Erhaltungsstoffwechsel als sie dem Licht entnehmen kann. Mit zunehmender Lichtintensität steigt die Photosyntheserate linear an und nähert sich nach einem Übergangsbereich einem nahezu konstanten Endwert. Bei weiterem Anstieg der Lichtintensität wird die Biomassenzunahme wieder geringer, bis die Zellen sogar absterben.



**Abbildung 2.6:** Licht-Photosynthese-Kurve von Mikroalgen mit Kardinalpunkten der Lichtabhängigkeit des Wachstums (Degen, 2002).

Im linearen Bereich ist das Wachstum der Mikroalgen lichtlimitiert, aber die Lichtnutzung ist maximal (Goldmann, 1979), weil jedes absorbierte Photon unter diesen Bedingungen in chemische Energie in Form von ATP und NADPH<sub>2</sub> umgewandelt wird. Diese Situation kehrt sich im Bereich der Lichtsättigungsphase um, dort wird nicht mehr jedes absorbierte Photon in chemische Energie umgewandelt. Der Grund für die Entstehung der Lichtsättigungsphase kann folgendermaßen erklärt werden: Zum einen können die Elektronen transportierenden Moleküle wie Plastochinon Q nicht schnell genug regeneriert werden (Matthijs et al., 1996), zum anderen werden die in der Lichtreaktion reduzierten NADPH<sub>2</sub>-Moleküle im Calvin-Zyklus zu langsam reoxidiert, um weitere Elektronen aufnehmen zu können. Es kommt zu einem Elektronenstau. Überschüssige Photonen werden in Wärme oder Fluoreszenz umgewandelt. Die photosynthetische Aktivität ist zwar maximal, aber die Lichtausnutzung nimmt ab. Wird die Lichtintensität noch größer, so kommt es zur Photoinhibition und sogar zur photooxidativen Zerstörung der Chlorophyllmembranen und -pigmente, die Zellen sterben ab.

Demnach liegt die höchste Lichtnutzungseffizienz nicht im Bereich der maximalen Photosyntheseaktivität, sondern im Bereich der Lichtlimitierung, wenn die auftreffende Lichtintensität noch weit kleiner als die Sättigungslichtintensität ist.

Ein weiterer Einfluss ist durch die Strahlungsdauer gegeben. So fanden beispielsweise Kohl und Nicklisch (1988), dass eine maximale Wachstumsrate bei Dauerbeleuchtung erzielt wurde (im Gegensatz zu Tag-Nacht-Rhythmen).

Diese Untersuchung ist nicht die einzige zu diesem Thema, es gibt in der Literatur eine große Anzahl von Beschreibungen von Experimenten mit zyklischer Veränderung der Lichtintensität. Auf diese wird daher im nächsten Abschnitt eingegangen.

### **2.3.2 Hell-Dunkel-Zyklen**

Die Veränderung der Lichtqualität besitzt sowohl natürliche als auch künstliche Ursachen. So treten in der Natur Hell-Dunkel-Zyklen unterschiedlicher Herkunft mit verschiedenen Zeitkonstanten auf. Dazu gehören der Tag-Nacht-Rhythmus oder die kurzfristigen Veränderungen der Bestrahlung, die z.B. Wellenbewegungen hervorrufen oder Verdunkelung durch Wolken. Aber nicht nur die natürlich vorkommenden

Zyklen beeinflussen das Wachstum und die Produktbildung der Mikroalgen, sondern auch kurzzeitige Änderungen der Lichtintensität.

Die Auswirkungen auf Wachstum und Produktbildung, die schon aus der Literatur bekannt sind, werden dabei für die drei verschiedenen Hell-Dunkel-Zyklen (Blitzzyklen, Zyklen im Sekunden-Bereich und Tag-Nacht-Zyklen) unterteilt.

### **Blitzlicht**

Blitzlichtexperimente wurden in den letzten 90 Jahren mit verschiedenen Zielsetzungen durchgeführt. Hauptzielsetzung war die Beobachtung und Erforschung der photosynthetischen Prozesse durch Auswertung der Reaktionsantwort des Systems auf eine pulsförmige Zuführung von Energie. Die Blitzlichtphotometrie ist bis heute eine wichtige Methode in der Photosyntheseforschung, mit der photosynthetische Vorgänge bis in den Nanosekunden-Bereich untersucht werden können.

Neben dieser grundlagenorientierten Hauptforschungsrichtung entstand v. a. in der Zeit nach dem Zweiten Weltkrieg eine intensive Forschungstätigkeit mit dem Ziel, eine gepulste Zuführung von Licht zur Erhöhung der photosynthetischen Effizienz zu nutzen, d.h. durch Blitzlicht primär die Wachstumsraten zu erhöhen. Der Großteil der Anstrengungen bezog sich dabei auf Versuche, in Freilandanlagen durch Erzeugung von Turbulenzen eine Art Blitzabfolge zu erzeugen und damit die Umsatzraten zu steigern. Bei diesem Ansatz liegt die wesentliche Schwierigkeit darin, dass durch die Verbesserung der Durchmischung eine ganze Reihe anderer Parameter, insbesondere die des Stoffübergangs, beeinflusst und verbessert werden. Damit wird eine Festlegung auf die Ursache der potentiellen Verbesserung erschwert. Ebenso wurden Experimente in Küvetten durchgeführt. Es gibt eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die sich mit der Wirkung von Blitzlicht auf phototrophe Mikroorganismen beschäftigen. Dabei werden zum Teil gegenläufige Befunde wiedergegeben. Ein Teil der Literaturstellen berichtet über eine gleichbleibende oder sinkende spezifische Wachstumsrate bei Einsatz von Blitzlicht. Alle diese Ergebnisse beruhen auf der Hypothese von Rabinowitch (1956). Rabinowitch sagte, dass die Photosyntheserate unter Blitzlicht sich derjenigen unter Dauerlicht annähern und diese maximal erreichen, aber nicht übertreffen kann.

Diese Hypothese beruht darauf, dass die Photosyntheserate durch enzymatische Schritte limitiert wird. Da Enzyme aufgrund ihrer Größe und Konzentration auf höchstens 1 pro 300 Chlorophyllmoleküle begrenzt sind, wird die maximale Durchsatzrate der Photosynthesepigmente zwangsläufig immer größer als die der nachgelagerten Enzymreaktionen sein. Wenn diese Enzymreaktionen mit maximaler Rate ablaufen, ist die maximale Photosyntheserate erreicht, gleichgültig ob die Lichtenergie durch Blitz- oder Dauerlicht zugeführt wird. Ein höherer Gesamtdurchsatz und damit eine höhere Photosyntheserate kann demnach durch Blitzlicht nicht erreicht werden. Die Arbeiten von Weller und Franck (1941) und Kok (1956) stützen diese Hypothese. Dagegen fanden McCree und Loomis (1969) eine Verstärkung unter Blitzlicht, dasselbe gilt für Kriedmann et al. (1973). Laws (1984) zitiert insgesamt sieben Arbeiten, die für eine erhöhte Photosyntheserate unter Blitzlicht sprechen. In einer umfassenden Übersichtsarbeit von Sager und Giger (1970) wurde die bis zu dieser Zeit vorliegende Literatur dazu erneut ausgewertet. Bei dieser neuen Auswertung konnte nach den Ergebnissen einer Reihe von Autoren keine Verbesserung der Photosyntheserate gefunden werden.

Alle durchgeführten Versuche wurden ausschließlich im Starklichtbereich durchgeführt. Kein Hinweis ist in der Literatur dagegen über mögliche Auswirkungen von Blitzlicht im Schwachlichtbereich zu finden.

### **Minuten-Sekunden-Bereich**

Das Verhalten von Mikroalgen bei Lichtzufuhr im Sekunden- bis Minuten-Bereich ist in mehreren Literaturstellen beschrieben. Diese berichten aber von unterschiedlichen Auswirkungen der Hell-Dunkel-Zyklen. So wird z.B. für Hell-Dunkel-Zyklen mit Frequenzen zwischen 1-0,0038 Hz keine Verbesserung der Wachstumsrate für *Chlorella* im Vergleich zu kontinuierlicher Beleuchtung erzielt (Grobelaar, 1989, 1991; Grobelaar et al., 1992). Ebenso wurde eine Absenkung der spezifischen Wachstumsrate bei Frequenzen zwischen 0.2-0.1 Hz für *Dunaliella* und *Scenedesmus* (Quéguiner und Legendre, 1986; Nedbal et al., 1996) und für *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana* für Zyklen zwischen 13-87 s (Janssen, 1999 et al.) beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigte Pirt (1986), dass *Chlorella sorokiniana* eine maximale spezifische Wachstumsrate bei einer

Dunkelphase von 9s und Merchuk (Merchuk et al., 1998), dass *Porphyridium sp* ein Maximum bei 6s besitzt.

Die Literaturquellen können allerdings nur schwer miteinander verglichen werden, da die Kultivierungsbedingungen zu unterschiedlich sind.

### **Stunden-Rhythmus**

Zum Einfluss von längeren Zyklen auf das Wachstum der Mikroalge *Porphyridium purpureum* findet man unterschiedliche Literaturstellen. Tag-Nacht-Rhythmen werden von manchen Algen im Rahmen der Zellteilung benötigt, so dass kontinuierliche Bestrahlung wachstumsmindernd oder toxisch wirkt.

Die Bestrahlung im Tag-Nacht-Rhythmus wird auch zur Synchronisation von Algenkulturen angewendet (Gense et al., 1969). Genauso wie bei den anderen betrachteten Zyklen sind genaue Schlussfolgerungen auf die Wirkung der Hell-Dunkel-Zyklen im Stunden-Bereich schwer interpretierbar, da widersprechende Beobachtungen zu finden sind. Nach Mulyadi (1995) ist die optimale Zyklusdauer für eine optimale Algenkonzentration eine gleich lange Hell- und Dunkelphase. Dies wird auch durch die Untersuchungen von Sommerfeld und Nichols (1970) unterstützt. Dagegen zeigt Dermoun (Dermoun, 1987), dass die spezifische Wachstumsrate maximal ist, wenn die Dauer der Hellphase größer ist als die der Dunkelphase. Bei seiner Untersuchung wurde auch der Einfluss der Zyklendauer auf die Synchronisation der Zellteilung untersucht. Dermoun fand heraus, dass bei einem Zyklus von acht Stunden Helligkeit und 16 Stunden Dunkelheit eine perfekte Synchronisation der Zellteilung zu beobachten ist. Das Volumen der Zelle erhöht sich während der beleuchteten Phase und die Zellteilung findet in der Dunkelphase statt. Im Widerspruch dazu behaupten andere Autoren, dass die maximale spezifische Wachstumsrate ausschließlich durch Dauerbeleuchtung zu erzielen sei.

In der Literatur befindet sich also eine Reihe von Publikationen, die sich mit der Fragestellung des Einflusses von Hell-Dunkel-Zyklen auf das Wachstum der Mikroalge *Porphyridium purpureum* beschäftigte. Leider sind aufgrund der schlechten Vergleichbarkeit und der manchmal gegensätzlichen Befunde die Ergebnisse schwer interpretierbar und damit nur eingeschränkt für die Entwicklung eines mathematischen Modells verwendbar. Dies sollte aufgrund der im Rahmen der Arbeit durchgeführten Experimente ausgeglichen werden.

## 2.4 Produkte und ihre Anwendungen

### 2.4.1 Pigmente

Das vielfältige Vorkommen von *Porphyridium purpureum* (in großer Meerestiefe oder auf feuchten Mauern) lässt eine gute biologische Anpassungsfähigkeit vermuten, die hauptsächlich durch die enthaltenen unterschiedlichen Pigmente ermöglicht wird. *Porphyridium purpureum* enthält drei Pigmentkategorien, die sich sowohl durch ihren Absorptionsbereich als auch durch ihre biologischen Funktionen unterscheiden. *Porphyridium purpureum* enthält neben Chlorophyll a und Carotinoiden auch Phycobiliproteide, die für ihre Rotfärbung verantwortlich sind.

Chlorophylle bestehen aus einem Porphyrinringsystem aus vier Pyrrolringen und Magnesium als Zentralatom. An das Ringsystem sind Methyl-, Ethyl-, und Vinylgruppen gebunden. Außerdem befindet sich am Ring D ein Propionsäure-Rest, der mit dem langkettigen Alkohol Phytol verestert ist. Diese Kohlenwasserstoffkette verleiht dem Chlorophyll hydrophobe Eigenschaften, während der Cyclopentanonring am Pyrrolring C für einen schwach hydrophilen Charakter des Moleküls verantwortlich ist. Chlorophyll spielt die Hauptrolle als aktives Pigment in der Photosynthese, und wird teilweise zur Färbung von Lebensmitteln eingesetzt.

Carotinoide haben mehrere Funktionen in der Photosynthese. Sie dienen z.B. wie die Chlorophylle und Phycobiliproteide als Lichtsammelpigmente. Aufgrund ihrer speziellen Elektronenstruktur kommt ihnen eine besondere Bedeutung beim Lichtschutz zu (Borowitzka et al., 1988): Diese ermöglicht die Umsetzung potentiell schädlicher Singulett- und Triplett-Anregungsenergien in Wärme, sowie die Übernahme und effiziente Degradation der Anregungsenergie von Singulett-Sauerstoff. Es handelt sich hierbei um Tetraterpene aus acht Isopreneneinheiten.

Bekannt sind vierhundert Arten von Carotinoiden, von denen aber nur eine sehr kleine Anzahl eine kommerzielle Anwendung gefunden hat, wie zum Beispiel  $\beta$ -Carotin, Asthaxanthin, Canthaxanthin oder Lutein. Die meisten natürlichen Carotinoide werden aufgrund der hohen Herstellungskosten und der limitierten Produktionskapazität nur in sehr kleinen Mengen verkauft (De la Noüe et al., 1988; Borowitzka, 1986). In den meisten Fällen werden sie synthetisch hergestellt (Borowitzka, 1988b).

Die kommerziellen Anwendungen der Carotinoide sind vielfältig. Sie werden als Farbstoffe in Lebensmitteln verwendet oder dem Tierfutter zugegeben, um z.B. Lachsfleisch oder Eigelb zu färben (De la Noüe et al., 1988). Seit kurzem werden  $\beta$ -Carotinoide in der Kosmetikindustrie benutzt, z. B. als Selbst-Bräuner (Sasson, 1998). Die Derivate der Carotinoide, hauptsächlich Vitamin A, werden als Wachstumsförderer eingesetzt (Callegari, 1989b). Aufgrund ihrer ausgeprägten antioxidativen Eigenschaften werden auch antikanzerogene Potentiale der Carotinoide diskutiert (Peto et al., 1981).

Im Gegensatz zu Chlorophyllen und Carotinoiden kommen Phycobiliproteide nur in wenigen Algen vor (Rhodophyceae, Cryptophyceae und Cyanophyceae). Zu den Phycobiliproteiden gehören das purpurne Phycoerythrin, das blaue Phycocyanin und Allophycocyanin. Sie befinden sich halbscheiben- oder halbkugelförmig auf der Thylakoidmembran. Im Gegensatz zu Chlorophyllen und Carotinoiden sind sie Chromoproteide, sie setzen sich aus einem Proteinanteil und einem Chromophor zusammen, die kovalent gebunden sind. Ein Chromophor besteht, ähnlich den Chlorophyllen, aus vier allerdings linear angeordneten Pyrrolringen. Diese Struktur bedingt die gute Wasserlöslichkeit der Phycobiliproteide.

Die Phycobiliproteide sind akzessorische Pigmente. Sie ermöglichen den nur einem schwachen Lichtangebot ausgesetzten Mikroalgen, einen breiten Bereich des sichtbaren Lichts zu absorbieren (Thépenier et al., 1990).

Die Eigenschaften von Phycoerythrin und Phycocyanin als Farbstoffe und als Fluoreszenzmittel werden für die medizinische Diagnose und in Lebensmitteln verwendet.

## 2.4.2 Polysaccharide

### Polysaccharide von *Porphyridium purpureum*

Die Mikroalgen sind von einer Schleimhülle umhüllt, die aus sulfonierten Polysacchariden besteht (Ramus, 1972, Adda et al., 1986). Die Dicke der Schleimhülle verändert sich im Verlauf des Wachstums. Die Funktion dieser Schleimhülle ist noch unbekannt, in der Literatur findet man verschiedene Hypothesen dazu: mechanische Schutzbarriere, ein Reservoir, ein Ionentauscher oder ein Schutz gegen das Austrocknen der Zellen (Vonshak, 1988). Durch die

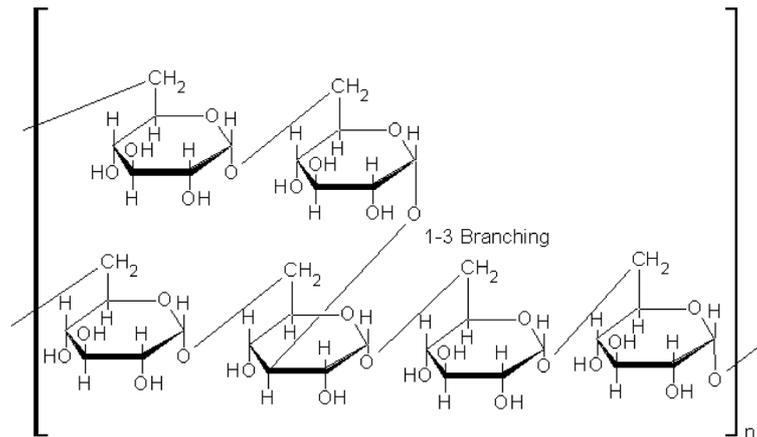
Freisetzung der Polysaccharide in die Umgebung entsteht eine Erhöhung der Viskosität des Kultivierungsmediums (Ramus, 1972, Adda et al., 1986).

Chemisch gesehen handelt es sich um ein amorphes wasserlöslich polyanionisches Polysaccharid mit einem Molekulargewicht von  $4 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$  (Mc Candless et Craigie, 1979, Percival et Foyle, 1979). Zusammengesetzt ist es aus Hexosen (Galactose, Fructose, Glucose, Mannose), Pentosen (Xylose), Glucuronsäure, aus Sulfaten und Proteinen (Thépenier, 1984).

Das industrielle Interesse an den Polysacchariden beruht auf ihrer spezifischen Interaktion mit Wasser. Es handelt sich um Polymere, die die Eigenschaften haben, eine Lösung zu stabilisieren, zu gelifizieren oder zu verdicken. Daher finden sie Anwendung als Hydrokolloid, Quell-, Emulgier- und Verdickungsmittel in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie, sowie Verwendung als Bindemittel und Überzugmaterial im pharmazeutischen und kosmetischen Sektor (Arad et al., 1985; Dermoun, 1987; Geresch et Arad, 1991). Eine große Anzahl experimenteller Untersuchungen wurden von verschiedenen Forschern durchgeführt mit dem Ziel, die Produktion der Polysaccharide optimieren zu können. So wurde unter anderem die Wirkung des Salzgehalts des Kulturmediums, des pH-Werts, der Temperatur und der Nitratkonzentration untersucht (Golueke et Oswald, 1962; Jones et al., 1963; Sommerfeld et Nichols, 1970; Minkova et al., 1987; Adda et al., 1986; Dermoun, 1987, Gudin et Chaumont, 1991; Iqbal et al., 1992). Die Untersuchungen zeigen, dass optimale Wachstumsbedingungen der Mikroalgen zu einem Maximum der Polysaccharid-Produktivität führen. Die industrielle Umsetzung der Produktion von Polysacchariden ließ sich aber aufgrund wirtschaftlicher Probleme bislang nicht konkretisieren (Muller-Feuga, 1996).

## **Dextran**

Dextran ist ein Homopolysaccharid der Glucose, es weist eine Vielzahl von  $\alpha$  1-6 Bindungen in der Hauptkette auf. Die Verzweigungen von der Hauptkette bestehen aus einer geringen Anzahl von  $\alpha$  1-3 geknüpften Seitenketten (siehe Abbildung 2.7). Durch die chemische Struktur des Dextrans wird deutlich, dass das Polysaccharid in wässriger Lösung keine beträchtliche Anzahl dissoziationsfähiger Gruppen besitzt und somit größtenteils ungeladen ist.



**Abbildung 2.7:** Chemische Struktur des verwendeten Dextrans (schematische Darstellung, erstellt am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik).

### 2.4.3 Fettsäuren

Die Mikroalgen bilden Lipide in ähnlicher Zusammensetzung wie sie bei den meisten Pflanzen vorkommen. Der spezifische Gehalt an Lipiden, der bei manchen Arten bis zu 85% des gesamten Biomassentrockengewichts ausmachen kann (Borowitzka et Borowitzka, 1988c), ist deutlich höher als bei Pflanzen.

Bei *Porphyridium purpureum* stellt der Gesamtfettgehalt am Ende der Wachstumsphase ca. 12 % des gesamten Trockenmassengewichts dar (Baudimant, 1996). Die Algen enthalten C 16:0 (Palmitinsäure), C 18:0 (Stearinsäure), C18:1 (Ölsäure) und C 18:2 (Linolsäure) sowie die mehrfach ungesättigten Fettsäuren C 20:4 (Arachidonsäure) und C 20:5 (Eicosapentaensäure). Untersuchungen zeigen eine starke Abhängigkeit der Produktion der Lipide von der Temperatur und der Lichtintensität (Springer et al., 1994; Rezanka et al., 1987).

## 2.5 Kultivierung von Mikroalgen

Obwohl die Mikroalgen schon sehr früh in der Geschichte der Menschheit verwendet wurden (hauptsächlich als Nahrungsmittel), haben sie erst vor kurzem das Interesse der Forscher geweckt und somit die Entwicklung von geeigneten Reaktoren in Gang gesetzt. Die Vielfalt der von der Mikroalge gebildeten Produkte erklärt die große Anzahl an Reaktoren, die für ihre Kultivierung verwendet wird. Die Kultivierungssysteme werden allgemein nach ihrem Engineering, nach ihrer hydraulischen Charakterisierung, sowie in offene und geschlossene Systeme unterteilt. Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über die in der Literatur beschriebenen Reaktoren gegeben.

### 2.5.1 Offene Reaktoren

#### Teichanlagen

Teichanlagen stellen die einfachste und primitivste Kultivierungsform dar, die überhaupt möglich ist. Die Lichtversorgung wird durch Sonneneinstrahlung gewährleistet. Der notwendige Gaseintrag erfolgt über die Teichoberfläche. Die Durchmischung findet nur durch Wind oder Wellen statt. Verwendet werden solche Kultivierungsanlagen zum Beispiel im Tschad, dabei erfolgt die Kultivierung von *Spirulina* direkt in einem natürlichen Reservat, das mit Wasser aus dem Tschadsee versorgt wird (Fox, 1986) oder in Australien, wo die Mikroalge *Dunaliella salina* für die Gewinnung von  $\beta$ -Carotinoiden durch die Firma Western Biotechnology Ltd und Betatene Ltd kultiviert wird.

Die Teichanlage besitzt sehr viele Nachteile. Die Becken werden nicht gleichmäßig durchmischt. Dabei können zum einen Sedimentationseffekte entstehen, zum anderen werden die Mikroorganismen nur sehr geringfügig mit Kohlendioxid versorgt, da der Unterschied zwischen dem enthaltenen Kohlendioxid in der Atmosphäre und dem Medium sehr klein ist. Eine Temperierung im optimalen Bereich ist ebenfalls nicht möglich. Hinzu kommt, dass in Abhängigkeit von der Tiefe des Beckens und der Zellkonzentration eine homogene Lichtversorgung einzelner Zellen nicht gewährleistet wird. Aufgrund der gerade zitierten Faktoren ist die erzielbare Produktivität relativ niedrig und überschreitet nicht  $1 \text{ g trockene Biomasse} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$

(Borowitzka et Borowitzka, 1988c). Allerdings zeichnen sich solche Kultivierungsanlagen durch sehr geringe Betriebskosten aus.

Eine Weiterentwicklung der Teichanlagen sind die Raceways-Ponds (Abbildung 2.8). Es handelt sich hierbei um offene, flache, exakt nivellierte Becken, die als mäanderförmiges System oder in Form einer einfachen Schleife ausgeführt sind und in denen das Medium im Kreis bewegt wird. Um eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten, Sedimentation zu vermeiden und eine gleichmäßige Lichtversorgung der Zellen zu erreichen, werden Turbulenzen mittels Schaufelrädern, air-lift-Systemen oder Pumpen erzeugt. Die Versorgung mit CO<sub>2</sub> erfolgt durch Begasung. Eine Temperaturregelung des Systems ist im Allgemeinen nicht vorhanden.

Dieses System wurde für die Kultivierung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* in der israelischen Wüste installiert. Es handelt sich dabei um ein Becken mit einer Bestrahlungsfläche von 2,5 m<sup>2</sup>, einer Tiefe von 12 cm und einem Gesamtvolumen von 300 Litern. Es wird für die Gewinnung der Biomasse von *Porphyridium purpureum*, von sulfonierten Polysacchariden und von Arachidonsäuren eingesetzt. Im Vorfeld wurde dieses System bereits für die Kultivierung von *Chlorella* und *Spirulina* entwickelt und verwendet. Eine Produktivität von 20 bis 24 g trockene Biomasse.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup> kann bei einer regelmäßigen Ernte im kontinuierlichen Betrieb erzielt werden. *Porphyridium purpureum* kann in einem solchen System über einen längeren Zeitraum kultiviert werden, ohne dass eine merkliche Kontamination an Fremdorganismen festzustellen ist (Vonshak et al., 1985; Vonshak, 1988). Im Gegensatz zu den Teichanlagen ist bei diesem Anlagentyp vor allem das Problem der Durchmischung und der CO<sub>2</sub>-Versorgung verringert. Die wichtigsten Produktionsstätten gibt es im Westen Australiens (Cognis), in Kalifornien (Eathrise farms) und in Asien.



**Abbildung 2.8:** Photographie eines Raceway-Ponds, in dem *Chlorella* kultiviert wird. Die Lichtversorgung erfolgt mittels Sonnenergie. Eine homogene Durchmischung der Kultivierung wird durch den Einsatz von Schaufelrädern realisiert.

### **Inclined-Surface-Typ**

Diese Kultivierungsanlage ist einem offenen Reaktor des Raceway-Pond-Typs ähnlich. Dabei wird die Kultursuspension über eine schiefe Ebene geleitet, über die sie entlang des Gefälles in einem dünnen Flüssigkeitsfilm von 3 cm bis kleiner 1 cm Schichtdicke abläuft. Nach dem Passieren der geneigten Ebene wird die Suspension gesammelt und erneut der schiefen Ebene vom höchsten Punkt aus zugeführt.

Der Vorteil dieser Anlage besteht in der besseren Lichtversorgung und dem Austausch von Kohlendioxid und Sauerstoff. Produktivitäten von 24 g trockener Biomasse.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup> werden berichtet (Pulz et al., 1998). Zusätzlich zu den Nachteilen, die schon bei den offenen Becken beschrieben wurden, erhöhen sich hier die Investitionskosten um ein Vielfaches.

Bei den hier vorgestellten Kultivierungsanlagen ist es nicht möglich, eine sterile Kultivierung durchzuführen. Deswegen werden solche Anlagen hauptsächlich für die Kultivierung von Mikroorganismen verwendet, die entweder eine hohe Wachstumsrate haben oder extremophil sind, um damit eine Kontamination durch Fremdorganismen zu vermeiden.

### 2.5.2 Geschlossene Reaktoren

Die Entwicklung von geschlossenen Reaktoren wurde durch den Wunsch nach einer besseren Kontrolle der Kultivierungsparameter und der damit größeren Anzahl der kultivierbaren Mikroalgenarten angetrieben. Die geschlossenen Reaktoren bieten im Vergleich zu den offenen Reaktoren die Möglichkeit zu einer monoseptischen Kultivierung, was für die Produktion von kosmetischen und pharmazeutischen Produkten erforderlich ist. Zum anderen können viele Kultivierungsparameter wie die Temperatur, der pH-Wert und die Zufuhr einer Mischung aus Luft und Kohlendioxid genauer kontrolliert werden.

In Abbildung 2.9 wird der einfachste geschlossene Reaktor dargestellt. Es handelt sich dabei um einen Polyethylen-Hülsen-Reaktor. Die Mikroorganismen, in diesem Fall die Mikroalge *Porphyridium purpureum*, werden mit einer Luft-Kohlendioxid-Mischung kultiviert. Die Lichtversorgung erfolgt durch Sonnenenergie. Die Temperatur wird durch regelmäßiges Besprühen mit Wasser konstant auf 31 °C gehalten. Die abgebildete Anlage befindet sich in Israel. Die gewonnene Biomasse wird in Aquakulturen verfüttert.



**Abbildung 2.9:** Polyethylen-Hülsen-Reaktoren mit einer Gesamtkapazität von 25 Litern, die für die Kultivierung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* in Israel eingesetzt werden. Die Mikroalgen dienen als Nahrungsmittel für die Fischindustrie (Photographie vom „Institute of Applied Research“ in Beer-Sheva, Israel).

Eine maximale Produktivität von  $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  konnte zum Beispiel für die Mikroalgen *Acrochaetium sp.* nicht überschritten werden.

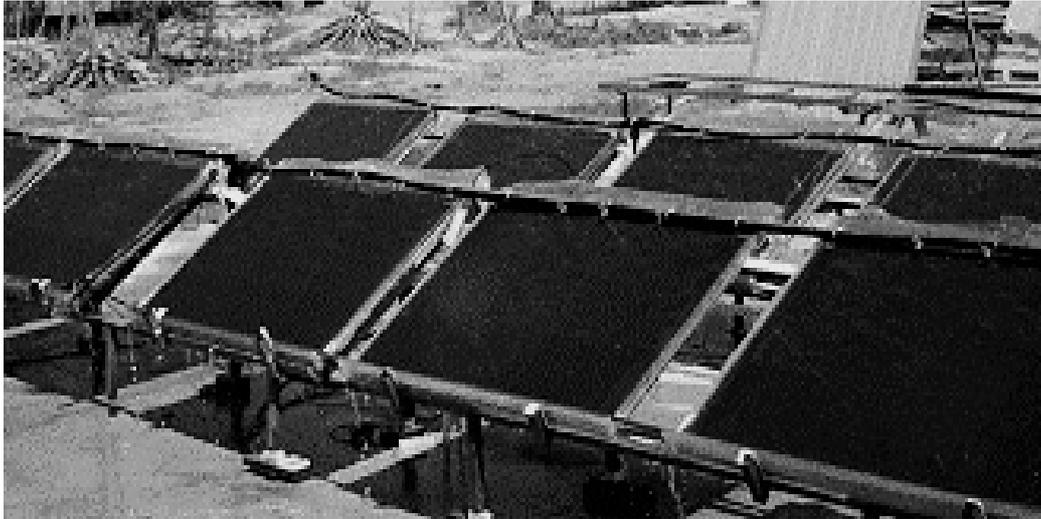
### **Blasensäulen**

Eine Reihe von Reaktorsystemen wurde auf der Basis von Blasensäulen konzipiert. Hierbei handelt es sich um lichtdurchlässige zylindrische Reaktoren, die von unten begast werden. Die Begasung gewährleistet die Durchmischung, entfernt das sich bildende  $\text{O}_2$  und führt gleichzeitig das notwendige  $\text{CO}_2$  zu. Für die Lichtversorgung ist das Verhältnis von Säulenhöhe zu Säulendurchmesser wichtig. Je größer der Durchmesser der Säule, desto größer ist auch das Volumen der Algensuspension, das nicht mehr mit Licht versorgt wird, was die Gesamtproduktivität herabsetzt. Dieser Zusammenhang begrenzt den Einsatz und die Größe der Säulen.

### **Plattenreaktoren**

Plattenreaktoren bestehen aus zwei planparallel angeordneten, lichtdurchlässigen Platten, die seitlich abgedichtet sind. Im Inneren befinden sich horizontal übereinander angeordnete Stege, die abwechselnd an einem Ende verkürzt sind. Die Beleuchtung kann beidseitig erfolgen.

Die Medienflüssigkeit wird durch die so gebildeten Kanäle befördert. Die Dosierung des  $\text{CO}_2$  kann von einer Pumpe vorgenommen werden. Vor dem Eintritt der Suspension in die Pumpe muss das gebildete  $\text{O}_2$  entfernt werden. Die Zunahme der  $\text{O}_2$ -Konzentration über der Lauflänge könnte ansonsten zu toxischen Konzentrationen für die Mikroorganismen führen. In Abbildung 2.10 ist beispielhaft eine Produktionsanlage dargestellt, die aus mehreren Platten-Reaktoren besteht. Sie wird für die Herstellung der Mikroalge *Spirulina* verwendet. Die Schrägneigung der Platten bietet dabei eine bessere Versorgung mit Sonnenenergie.



**Abbildung 2.10:** Plattenreaktoren, die für die Kultivierung von Mikroalgen in Israel verwendet werden (Photographie vom „Institute of Applied Research“ in Beer-Sheva, Israel).

### Rohrreaktoren

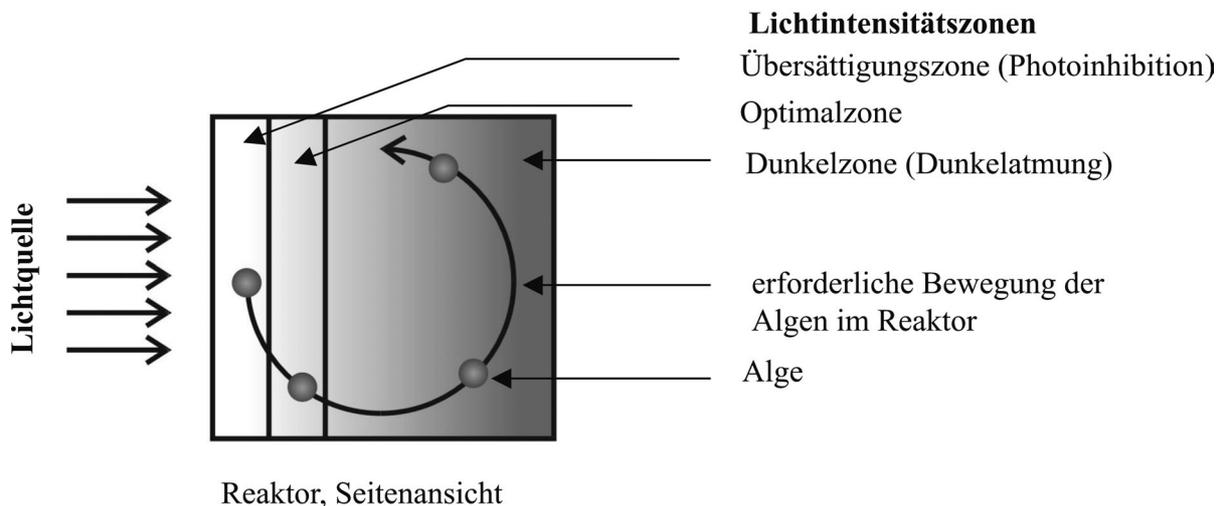
Anlagen dieses Typs bestehen aus lichtdurchlässigen Rohren mit nachgeschaltetem Mischbehälter. Die Algensuspension wird entweder durch die Röhren gepumpt oder bewegt sich unter Schwerkrafteinfluss selbstständig durch das kreisförmig angeordnete Rohrsystem. Die Zudosierung von  $\text{CO}_2$  bzw. der Abtransport des gebildeten  $\text{O}_2$  erfolgt genau wie bei den Plattenreaktoren. Die Beleuchtung erfolgt von außen durch Strahler.

Eine interessante Variante ist der „External tubular airlift photobioreactor“ von Richmond (Richmond et al., 1993), bei dem 20 m lange, externe Polycarbonat-Rohre (Durchmesser 2,8 cm) als Sonnenkollektor über den Boden verlaufen, die die Suspension parallel verteilt durchströmt. Die Suspension wird durch ein 2,22 m hohes Rohr als „Airliftpumpe“ angetrieben. Die Produktivitäten mit *Isochrysis* lagen bei  $1,5 \text{ g trockene Biomasse l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Die maximal erreichte Biomasse betrug  $27 \text{ g.l}^{-1}$ .

Die Kultivierung mittels Rohrreaktoren bietet die Möglichkeit der Gewinnung von hochwertigen Produkten. Die höheren Investitions- und Betriebskosten, die eine Anlage dieses Typs mit sich bringt, werden durch die hohe Produktivität teilweise kompensiert.

Der Nachteil sowohl beim Rohrreaktor als auch beim Plattenreaktor ist die mit zunehmender Länge schlechtere Durchmischung und die Bildung hoher, hemmender Sauerstoff- und niedriger Kohlendioxidkonzentrationen am Ende des Rohres bzw. der Platte.

Ein grundsätzliches Problem der drei vorgestellten Reaktoren ist die abnehmende Eindringtiefe des Lichts mit zunehmender Zelldichte. Abbildung 2.11 stellt schematisch die Kreisbewegung einer Mikroalge innerhalb des Reaktors dar, die diese aufgrund der vorhandenen Turbulenz durchläuft. Die Mikroalgen bewegen sich innerhalb von drei charakteristischen Lichtzonen. Innerhalb der ersten Zentimeter befinden sich die Mikroalgen in einer Zone hoher Lichtintensität, was zu einer Photoinhibition führen kann. Anschließend kommen sie in eine optimal beleuchtete Zone. Zuletzt folgt eine Dunkelzone, in der kaum oder gar keine Lichtintensität für das Wachstum der Mikroalgen vorhanden ist. Diese inhomogene Lichtverteilung im Reaktor hat eine sich ständig ändernde Lichtversorgung der Mikroorganismen zur Folge. Die genaue Wirkung dieser zyklischen Lichtversorgung auf das Wachstum und die Produktbildung der Mikroorganismen ist bisher kaum untersucht worden.



**Abbildung 2.11:** Schematische Darstellung der Lichtverteilung innerhalb eines Volumenelements eines Photo-Bioreaktors, bei dem die Zelldichte hoch ist.

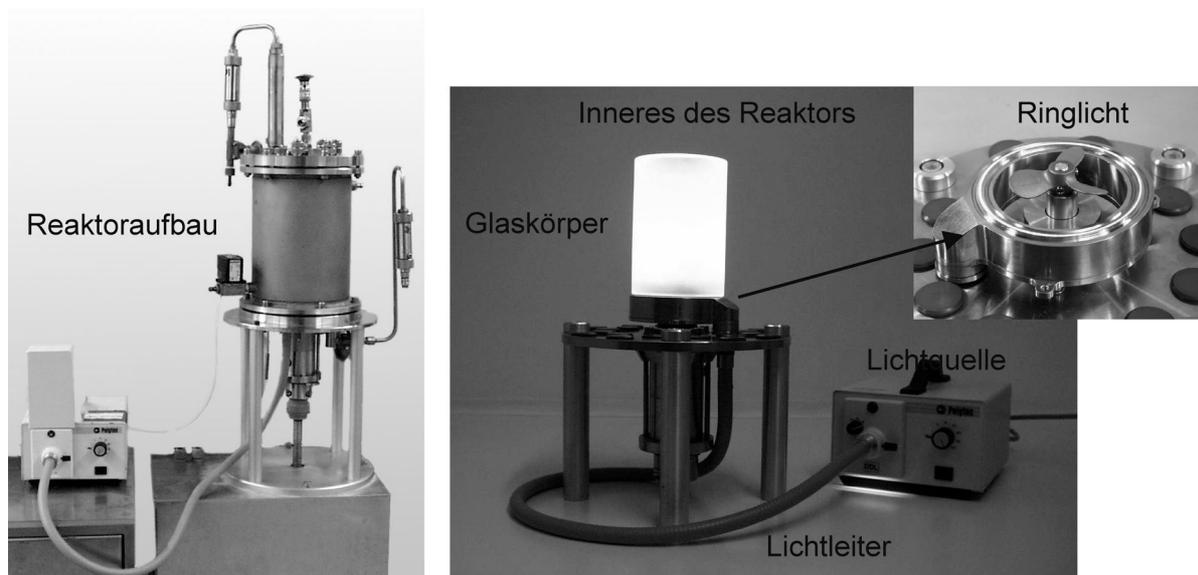
Um diese Fragestellung näher beantworten zu können, wurden am Institut (Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Verfahrenstechnik, Universität Karlsruhe) zwei unterschiedliche Reaktoren entwickelt, deren Aufbau und Funktion in den nächsten Abschnitten näher erläutert wird.

## Am Institut entwickelte Reaktoren

Um die Auswirkung der Hell-Dunkel-Zyklen auf das Wachstum und die Produktbildung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* besser verstehen zu können, wurde zum einen ein geschlossener innenbeleuchteter Reaktor konstruiert.

Der Einsatz von geschlossenen innenbeleuchteten Reaktoren eröffnet die Möglichkeit zur teilweisen oder vollständigen Kompensation des oben beschriebenen Effekts.

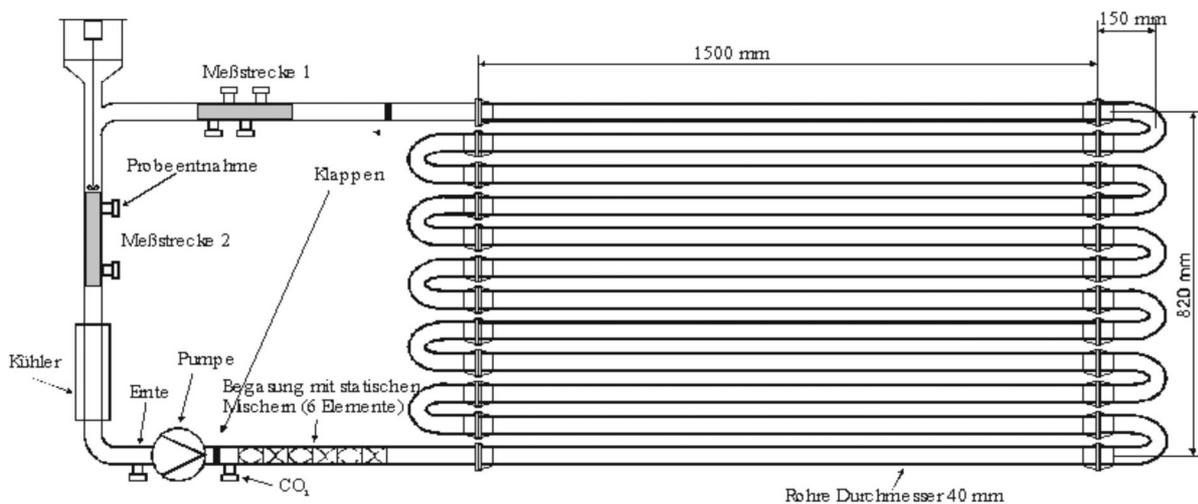
Beim Bau eines Reaktors werden meist traditionelle Rührkessel modifiziert. Durch Bohrungen im Deckel werden Glasröhrchen geführt, in die Leuchtstoffröhren eingebracht werden können. Die Anbringung von seitlich abstrahlenden Lichtleiterfaserbündeln bietet dazu eine Alternative. Am Institut wurde ein solcher innenbeleuchteter Rührkessel gebaut (Csögör, 1999c). Das außen erzeugte Licht wird durch Lichtfasern ins Innere des Reaktors transportiert und auf ein Ringlicht verteilt. Die homogene Verteilung des Lichtes über die ganze Höhe des Reaktors erfolgt durch Einbau eines angerauten Glaskörpers auf dem Ringlicht (Abbildung 2.12). Die Entkopplung von Lichtquelle und Bestrahlungseinrichtung ermöglicht eine flexible Handhabung der Beleuchtung (Wellenlängenzusammensetzung, Intensität, Fluktuation). Dieser Reaktor wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet.



**Abbildung 2.12:** Photographien des Reaktoraufbaus sowie der Lichteinrichtung des verwendeten Photo-Bioreaktors

Im Gegensatz zu allen bis jetzt vorgestellten Reaktoren besitzt der hier vorgestellte, geschlossene innenbeleuchtete Reaktor genau definierte Kultivierungsparameter einschließlich der Lichtverteilung innerhalb des Reaktors. Durch den Einsatz dieses Reaktors ist es möglich, kinetische Daten zu gewinnen und damit ein mathematisches Modell zu erstellen.

Parallel zu diesem Reaktor wurde für die Kultivierung von photoautotrophen Mikroorganismen ein Rohrreaktor konstruiert (Perner, 2003), bei dem die Beleuchtung von außen durch sechs Halogenstrahler erfolgt. Die schematische Darstellung des verwendeten Reaktors befindet sich in Abbildung 2.13. Um eine bessere Kontrolle der Lichtfluktuation zu erzielen, wurden innerhalb des Reaktors statische Mischer eingebracht und damit eine definierte Frequenz der Fluktuation erreicht. Parallel zum Einbringen der statischen Mischer wurde mittels eines Strömungssimulationsprogramms die Bewegungsbahn eines Partikels innerhalb des Reaktors simuliert und ausgewertet, um somit in Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Reaktorpumpe die Frequenzen zu bestimmen, die die Mikroalgen erfahren.



**Abbildung 2.13:** Schematische Darstellung des am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik entwickelten Rohrreaktors mit einer Gesamtkapazität von 25 Litern (Perner, 2003).

Die Kombination der Anwendung dieser beiden speziell entwickelten Reaktoren bietet die Möglichkeit, Informationen zur Auswirkung von Veränderungen von Kultivierungsparametern, wie zum Beispiel die genaue Auswirkung von Lichtqualität und Lichtquantität, auf Wachstum und Produktbildung der zu untersuchenden Mikroalgen zu gewinnen.

Andererseits können je nach Zielsetzung der Kultivierung die gewonnenen Ergebnisse in der dafür konzipierten Pilotanlage (Rohrreaktor) verifiziert und somit das Verhalten der Mikroorganismen in einer realen Produktionsanlage vorhergesagt werden.

## 2.6 Modellbildung

Bei der Modellierung von biologischen Systemen können je nach Zielsetzung unterschiedliche Vorgehensweisen zur Anwendung kommen.

### 2.6.1 Unstrukturierte Modelle

Unstrukturierte Modelle stellen die einfachsten Stoffwechselmodelle dar, da sie die Biomasse als homogen und zeitlich konstant in ihren Eigenschaften betrachten. Die unstrukturierten Modelle - auch Black-Box-Modelle genannt - beinhalten keine Information über das, was im Inneren der Zelle abläuft. Der Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf Wachstum und Produktbildung wird mit Hilfe von limitierenden oder inhibierenden Termen beschrieben. Trotz ihrer Einfachheit werden unstrukturierte Modelle oft zur Beschreibung biologischer Systeme verwendet.

Für die spezifische Wachstumsrate kann eine Reihe von unterschiedlichen Ansätzen in der Literatur gefunden werden.

Der bekannteste Ansatz ist das Monod-Modell (Monod, 1949):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{c_s}{c_s + K_s} \quad (2.9)$$

mit der maximalen spezifischen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  und der Monod-Konstante  $K_s$  als Modellparameter sowie der Substratkonzentration  $c_s$ .

Für die Beschreibung des Wachstums von Mikroalgen haben sich in der Literatur unterschiedliche unstrukturierte Modelle als sehr geeignet erwiesen. Zur Verdeutlichung werden hier nur zwei Modelle vorgestellt.

Das Wachstum der Mikroalge *Chlorella vulgaris* wurde mit dem Modell von Tamiya (Tamiya et al., 1953) gut beschrieben. Es handelt sich dabei um ein hyperbolisches Modell (Gl. 2.10), um die Variation der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Lichtintensität zu beschreiben.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{\omega \cdot I}{\mu_{\max} + \omega \cdot I} \quad (2.10)$$

$\mu$  ist die spezifische Wachstumsrate [ $\text{h}^{-1}$ ],  $\mu_{\max}$  die maximale spezifische Wachstumsrate [ $\text{h}^{-1}$ ],  $\omega$  die Verdopplungsgeschwindigkeit bei schwachem Licht und  $I$  die Lichtintensität [ $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ].

Für die Beschreibung des Wachstums der Mikroorganismen bei substratlimitierten Bedingungen wird das Moser-Modell angewendet (Moser, 1958). So z.B. bei der erfolgreichen Beschreibung des Wachstums der Mikroalge *Isochrysis galbana* durch Molina Grima (Molina Grima et al., 1993; Molina Grima et al., 1994), hier war das Licht der hauptsächlich limitierende Faktor,  $n$  der Exponent der Lichtintensität und  $K$  die Sättigungslichtkonstante.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{I^n}{K^n + I^n} \quad (2.11)$$

## 2.6.2 Strukturierte Modelle

Strukturierte Modelle oder Grey-Box-Modelle berücksichtigen zellinterne Zustände und ermöglichen daher, Kenntnisse über biologische Strukturen und ihre Regulationsmechanismen grundsätzlich zu formulieren. Hierbei werden wichtige Schlüsselkomponenten einer Zelle durch zusätzliche Zustandsgrößen im Modell repräsentiert. Die Schwierigkeit bei der Formulierung solcher Modelle besteht nun darin, die wichtigsten Schlüsselgrößen aus der Menge der Zellbestandteile zu extrahieren, so dass einerseits eine ausreichende Modellgenauigkeit und andererseits eine Begrenzung der Modellkomplexität erreicht wird.

### **2.6.3 Segregierte Modelle**

Segregierte Modelle - auch Populationsmodelle genannt - basieren nicht mehr auf der Vorstellung einer einheitlichen Biomasse. Vielmehr wird die Gesamtmasse aufgeteilt in einzelne Segregate, die z. B. hinsichtlich der Zellmorphologie oder des Zellalters differenziert sind, so dass unterschiedliches Zellverhalten modelliert werden kann (Muller-Feuga et al., 2003).

### **2.6.4 Neuere Modellansätze**

Neuere Arbeiten befassen sich mit der Entwicklung von Modellierungskonzepten, bei denen die Modellierung zellulärer Systeme erlaubt ist (Kendlbacher et al., 1998). Ausgangspunkt des Konzepts ist die Zerlegung des Metabolismus und seiner Regulation. Das gemittelte Verhalten einer Zelle wird durch das Zusammenwirken zweier Netzwerke, dem Regulations- und dem Stoffwechselnetzwerk beschrieben. Das Regulationsnetzwerk umfasst die Gesamtheit der Stoff- und Signalflusswege, die zur DNA-Replikation, Genexpression und Proteinbiosynthese gehören. Alle sonstigen Stoffwechselwege, die - ausgehend von den Substraten - materiell zur Synthese der Zellstrukturelemente und den Produkten beitragen, bilden zusammen das Stoffwechselnetzwerk.

Das Modellierungskonzept erlaubt die modulare Strukturierung der ablaufenden Stoffwechsel- und Regulationsvorgänge. Auf diesem Weg entstehen schließlich Modelle, die im Sinne einer ganzheitlichen Betrachtungsweise das Verhalten der Zellen beschreiben.

### **2.6.5 Modellbildung von photoautotrophen Mikroorganismen**

Für die Beschreibung des Wachstums photoautotropher Mikroalgen sind eine Reihe von Modellansätzen in der Literatur zu finden. Mit Hilfe von unterschiedlichen Beispielen soll die Vielfalt der Ansätze vorgestellt werden.

Livansky (Livansky, 1979) untersuchte den Einfluss der ungleichmäßigen Lichtverteilung auf die Produktivität der Biomasse. Dabei betrachtete er eine beleuchtete und eine nicht beleuchtete Algensuspension.

Schuter (Schuter, 1979) stellte einen einfachen mathematischen Ansatz auf, um das Wachstum der Mikroalgen zu beschreiben. Dabei wird die Kohlenstoffbilanzierung der Zelle in vier unterschiedliche Anteile (Kohlenstoff der Photosynthese, Kohlenstoff der Makromoleküle, Kohlenstoff der strukturellen Komponente, gespeicherter Kohlenstoff) unterteilt und in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen untersucht.

Cornet (Cornet et al., 1992b) entwickelte für die Batch-Kultivierung von *Spirulina* in einem Photo-Bioreaktor ein strukturiertes Modell. Die dabei berücksichtigten kinetischen Ansätze gelten für eine Licht- und Salz-Limitation.

Auch Frohlich (Frohlich et al., 1983) entwickelte ein strukturiertes Modell, um das Wachstum der Mikroalgen zu beschreiben.

Fernández (Fernández et al., 1997) kombinierte in seinem Modell das eingestrahelte Licht, die Geometrie der verwendeten Rohrreaktoren und die Verdünnungsrate, bei der Mikroalgen kontinuierlich kultiviert wurden. Das vorgestellte Makromodell kann angewendet werden, um die Biomasse-Produktivität der Mikroalge in einem Rohrreaktor zu bestimmen, solange der Standort der Anlage, die Jahreszeit, die Geometrie des Reaktors und die kinetischen Parameter des Algenstamms bekannt sind.

Spezifisch für die einzellige Mikroalge *Porphyridium purpureum* entwickelte Modelle können in der Literatur ebenfalls gefunden werden. Dermoun et al. stellten 1992 ein Modell vor, welches das Wachstum der Mikroalge in Abhängigkeit von zwei Parametern - Photonenflussdichte und Temperatur - beschreibt. Die bestimmte optimale Photonenflussdichte und die erreichten spezifischen Wachstumsraten waren jeweils abhängig von der Temperatur, ein Zusammenhang zwischen diesen Parametern wurde gefunden.

Bacquerisse et al. (1999) und Nouals (2000) stellten ein weiteres biologisches Modell vor. Dabei wird das Wachstum der Mikroalge durch die absorbierte Lichtquantität und die Bilanzierung des anorganischen Kohlenstoffs beschrieben. Dieses Modell wird durch die Berücksichtigung der Hydrodynamik des verwendeten Reaktors und des Gastransfers ergänzt.

Modelle, die das Verhalten der gebildeten Makromoleküle der Mikroalgen beschreiben, liegen dagegen kaum vor. Die einzige Quelle, die sich damit offenbar beschäftigt hat, ist Kopecký (1997). Ein kinetisches Modell wurde vorgeschlagen, das

---

die Bildung der Makromoleküle Polysaccharide in synchronisierten Kulturen von *Porphyridium purpureum* beschreibt. Dabei wurde die Akkumulation von Polysacchariden in den Zellen bei Tag und deren Freisetzung bei Nacht während eines Tag-Nacht-Zyklus berücksichtigt.

Die hier vorgestellten Modelle beschränken sich in den meisten Fällen auf die Anwendung kinetischer Ansätze. Es wurden nur in seltenen Fällen modernste Modellierungskonzepte angewendet, wie die Berücksichtigung von intrazellulären Speichern. Die Kultivierungsabhängigkeit und die Beschreibung des Verhaltens der erhaltenen funktionalen Makromoleküle und Produkte wurde in den wenigsten Fällen in das Modell integriert, obwohl gerade sie kommerziell gesehen am interessantesten sind.

### 3 Material und Methoden

Die im Verlauf dieser Arbeit verwendeten Methoden wurden zum Teil aus einer bereits vorliegenden Arbeit (Csögör, 2000) übernommen, zum Teil aber wurden sie neu entwickelt.

Die Schwierigkeit, eine neue Bestimmungsmethode für die zu untersuchenden Mikroorganismen etablieren zu können, beruht auf den spezifischen Rahmenbedingungen des verwendeten Systems, sowie auf den besonderen Eigenschaften der zu untersuchenden Mikroalgen.

Zum einen ist die maximal erreichbare Zellkonzentration bei der Kultivierung sehr klein ( $c_x = 0,2 \text{ g.l}^{-1}$ ), zum anderen ist das verfügbare Arbeitsvolumen sehr gering (maximal  $30 \text{ ml.d}^{-1}$ ). Zusätzlich besitzt die Mikroalge *Porphyridium purpureum* stabile Zellwände, sie bildet intrazelluläre Polysaccharide und enthält viele Salze.

Diese Vorgabe lässt in den meisten Fällen keine direkte Übertragung der in der Literatur beschriebenen Methoden auf die zu untersuchenden Mikroorganismen zu. Es muss zuerst eine umfassende Anpassung und Optimierung vorgenommen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Nachweismethoden neu etabliert worden:

- Die Ermittlung der intrazellulären Polysaccharide
- Die Bestimmung der verschiedenen enthaltenen Monosaccharide
- Die rheologische Charakterisierung der Polysaccharide
- Das Abtrennverfahren der Polysaccharide
- Die Bestimmung der Lipidzusammensetzung
- Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts
- Die Optimierung der eindimensionalen Elektrophorese

#### 3.1 Organismus und Stammhaltung

Die einzellige Rotalge *Porphyridium cruentum* Naegeli Stamm 1380-1a stammt aus der Sammlung von Algenkulturen am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen (Schösser, 1994). Die Mikroalge *Porphyridium purpureum* wurde aus mehreren Gründen als Forschungsobjekt ausgewählt. Zum einen ist das optimale Kultivierungsmedium sowie die Kultivierungsparameter Temperatur und pH-Wert aus

der Literatur bekannt, zum anderen bietet sie aufgrund ihrer Vielzahl an kommerziell interessanten Produkten ein wirtschaftliches Potential.

Die Kultur wurde auf einem Schrägagarröhrchen bezogen und in Flüssigmedium übergeimpft. Die Stammhaltung erfolgt im 500 ml Erlenmeyerkolben in einem synthetischen Flüssigmedium (ASW-Medium für artificial sea water medium nach Jones et al., 1963). Die Zusammensetzung des verwendeten Nährmediums ist im Anhang A1 nachzulesen.

Die Schüttelkolben wurden mit 250 ml ASW-Medium gefüllt und bei 121°C 20 Minuten lang autoklaviert, bevor sie mit 2 ml Vorkultur übergeimpft wurden. Die Kultivierung erfolgte auf einem Rotationsschüttler bei 120 Umdrehungen pro Minute und 20°C. Die Kolben wurden mit 4 Leuchtstoffröhren kontinuierlich beleuchtet, die dabei erreichte Photonenflussdichte betrug  $25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Die verwendeten Leuchtstoffröhren weisen ein homogenes Lichtspektrum im sichtbaren Bereich (400 nm bis 750 nm) auf, in dem die Mikroalge kultiviert wird.

## **3.2 Kultivierung im Photo-Bioreaktor**

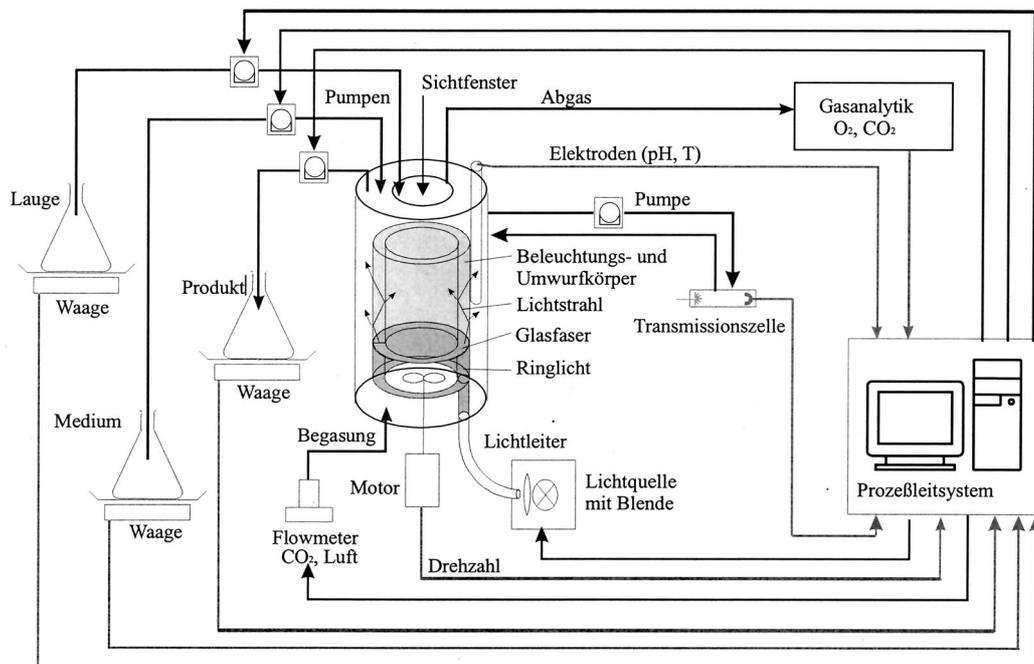
### **3.2.1 Photo-Bioreaktor**

Der verwendete Photo-Bioreaktor wurde am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik der Universität Karlsruhe entwickelt (Csögör, 2000). Es handelt sich dabei um einen Rührkessel mit drei Liter Füllvolumen, welcher als Umwurfreaktor betrieben wird (Abbildung. 3.1). Aufgrund seines Aufbaus kombiniert er die Vorteile eines Rührkessels (homogene Verteilung) und eines Platten-Reaktors (kürzere Licht-Eindringwege). Der Umwurfkörper wird gleichzeitig als Bestrahlungskörper (Lichtleitrohr) genutzt. Er ist aus Glas und wird stirnseitig über ein Ringlicht angestrahlt. Das Licht wird in einer externen Lichtquelle erzeugt und über einen Lichtleiter in das Ringlicht eingestrahlt.

An den angerauten Oberflächen des Lichtleitrohrs wird das Licht gestreut und homogen in das Medium abgestrahlt, von dem das Lichtleitrohr beidseitig umströmt wird. Durch die Trennung von Lichtquelle und Bestrahlungseinrichtung wird erreicht, dass das Licht in Bezug auf Wellenlängenzusammensetzung, Intensität und Fluktuationen nahezu beliebig variierbar ist.

Für die Kultivierung wird eine Halogen-Lampe mit einer Leistung von 150 Watt als Lichtquelle verwendet. Das Spektrum dieser Lampe zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem Spektrum der aktiven Pigmente Chlorophyll a, Phycobiliproteide und Carotinoide, die in der Mikroalge *Porphyridium purpureum* enthalten sind. Die Kultivierungen werden im Turbidostat-Betrieb gefahren.

Bei den Versuchsreihen wurde der mit synthetischem Salzwassermedium gefüllte Reaktor mit einem externen Dampferzeuger 20 Minuten lang bei 121°C sterilisiert. Die Begasung erfolgte mit einem Gemisch aus 2,5% Kohlendioxid und Druckluft. Das Gasmisch wurde mit Hilfe von Durchflussmessern und einem Gaskontrollgerät der Firma MKS Instruments eingestellt, wobei je nach Begasungsrate zwei unterschiedliche Flowmeter angewendet wurden ( $10 \text{ ml. min}^{-1}$  bis  $100 \text{ ml. min}^{-1}$ ). Das Medium wurde bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes mit dem Gasmisch begast und anschließend mit Vorkulturen aus der Schüttelkolbenkultivierung angeimpft. Die Probenahme erfolgte über eine sterile Probenahmeverrichtung in autoklavierte Probenahmegefäße. Die Drehzahl wurde im Verlauf einer Kultivierung konstant bei  $500 \text{ U. min}^{-1}$  gehalten. Die Peripherie besteht aus einer mit 4 Molarer NaOH gefüllten Flasche, die den pH-Wert konstant auf 7,6 hält, einem als Vorratsbehälter dienenden zweiten Reaktor mit identischen Kultivierungsbedingungen und einer Ernte-Flasche.



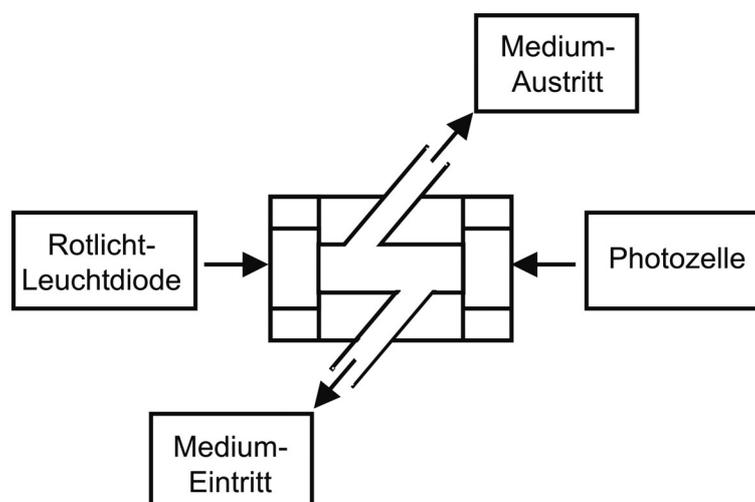
**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung des verwendeten Photo-Bioreaktors und der dazugehörigen Peripherie

Mindestens zwei Proben pro Tag wurden aus dem Reaktor entnommen. Dabei wurde sowohl die Monoseptizität der Kultivierung überprüft als auch die Charakterisierung der gebildeten Makromoleküle der Mikroalgen durchgeführt.

### 3.2.2 Online-Messungen

#### 3.2.2.1 Inline-Sonden

Unterschiedliche in den Reaktor eingebrachte Sonden ermöglichen die online-Kontrolle der Kultivierungsbedingungen. Am Reaktordeckel befinden sich die pH-Sonde, die  $pO_2$ -Sonden der Firma Mettler Toledo und im Bypass die Transmissionszelle. Die Kalibrierung der pH-Sonde erfolgte vor dem Einbau in den Reaktor mit Hilfe von zwei verschiedenen Pufferlösungen ( $pH=7$  und  $pH=4$ ). Im Fall der  $pO_2$ -Sonde wurde nach dem Sterilisationsvorgang des Reaktors zuerst mit Stickstoff begast, um den Nullpunkt der Sonde einstellen zu können, danach mit Druckluft. Während der Kultivierungen wurde das Medium im Kreislauf durch eine Transmissionszelle gepumpt (Abbildung 3.2). In die abgedichtete Öffnung wurde von der einen Seite eine Rotlicht-Leuchtdiode eingesetzt (geringere Wechselwirkung des Rotlichtes mit den Algen als bei Verwendung von Weißlicht), von der anderen Seite wurde eine Photozelle eingesetzt, die das transmittierte Licht registrierte. Ihr Signal wurde von einem angeschlossenen Operationsverstärker verstärkt und an das Prozessleitsystem weitergeleitet. Das Prozessleitsystem steuerte mit einem PI-Regler die Zuflussrate des Mediums (Turbidostat-Betrieb).



**Abbildung: 3.2:** Schematische Darstellung der Transmissionsmesszelle

Die Algensuspension wird mit Hilfe einer Schlauchpumpe kontinuierlich durch die Transmissionszelle gepumpt. Die Photozelle misst abhängig von der Transmission ein Signal, das durch einen Operationsverstärker verstärkt wird. Das verstärkte Signal wird an das Prozessleitsystem weitergeleitet, das mit einem PI-Regler die Zuflussrate steuert.

Am Reaktorboden des Reaktors wurde für die Messung der Temperatur ein Pt100 Widerstandsthermometer verwendet.

### **3.2.2.2 Abgasanalytik**

Die Abgaszusammensetzung des Reaktors wurde mit einem Gasanalysator der Maihak AG, Hamburg gemessen. Der Gasanalysator MULTOR 610 der Firma Maihak misst die Kohlendioxidkonzentration differenziell über die Infrarotabsorption. Der Sauerstoffanalysator OXOR 610 bestimmt die Sauerstoffkonzentration im Gasstrom unter Ausnutzung des paramagnetischen Verhaltens von Sauerstoff. Für die Kalibrierung der Abgasanalytik wurden drei Gase bekannter Zusammensetzung verwendet: Stickstoff, Druckluft sowie ein Referenzgas, das 2,5 % Kohlendioxid und 18,5 % Sauerstoff enthielt.

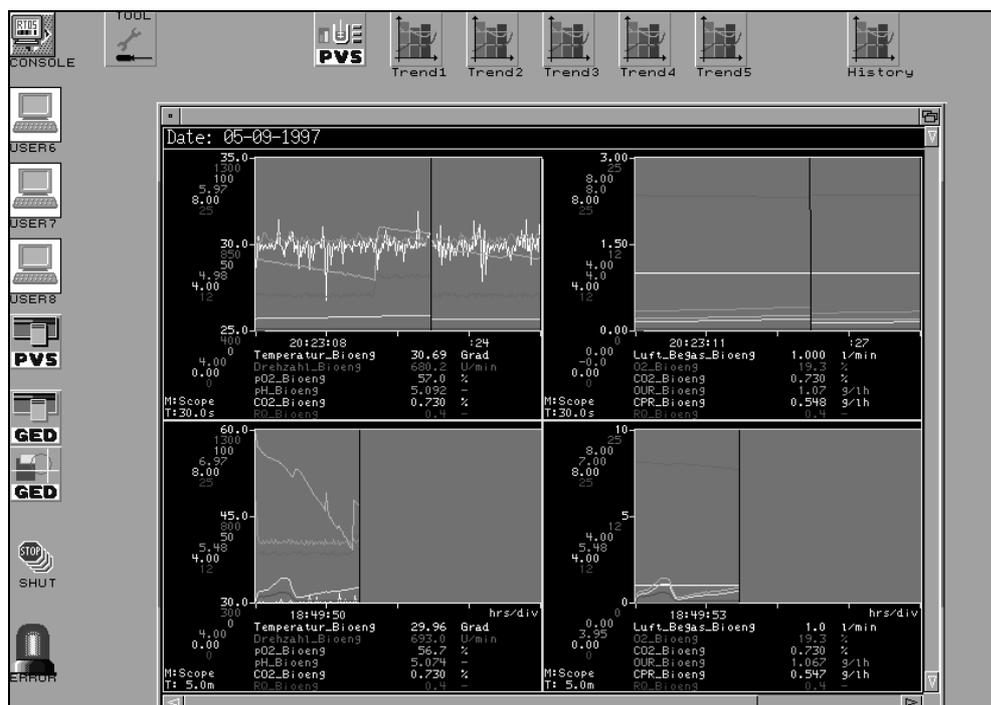
Die Kalibrierung erfolgte zu Beginn der Kultivierung, dies wurde dann je nach Dauer der Kultivierung ein- oder zweimal wiederholt.

Bei geringen Begasungsraten wurde das zu messende Gas in einer gasdichten Tüte gesammelt und von dort zum Abgasanalysator geschickt. Bei der Messung des Photo-Bioreaktors, der mit einer Begasungsrate von 80 ml. min<sup>-1</sup> begast wird, wurde das Gas 20 Minuten lang gesammelt, bevor eine Messung durchgeführt wurde.

### **3.2.2.3 Prozessleitsystem**

Das Prozessleitsystem UBICON (ESD GmbH, Hannover) wurde für die Datenspeicherung der verschiedenen Parameter und für die Prozesskontrolle verwendet. Durch verschiedene Ein- und Ausgabekarten für analoge und digitale Signale und die seriellen Schnittstellen konnte das Prozessleitsystem an die spezifische Problemstellung der Turbidostat-Prozesse angepasst werden. Die externen Geräte wie Waagen, Pumpen und der Sonden-Messwertverstärker des Photo-Bioreaktors (Temperatur, pH-Wert, pO<sub>2</sub>) wurden über die Schnittstellen

hardwaremäßig angedockt. Dadurch wurde sowohl die Aktualisierung der Prozessvariablen im Variablenpool, als auch die Ausgabe von Stellgrößen zeitnah realisiert. Die angewandten Turbidostat-Strategien und die Auswertung der Abgasanalysedaten wurden mit einem symbolischen Formel-Interpreter umgesetzt. Die graphische Darstellung der Prozessparameter während des Versuches ermöglichte es, frühzeitig eventuelle Trends im Prozessverhalten zu erkennen. Die nicht vom Prozessleitsystem online erfassten Parameter konnten vom Bediener während des Prozesses von Hand eingegeben werden (Begasungsrate, Probevolumen, Startvolumen, u.a.).



**Abbildung 3.3:** Bildschirmausdruck des UBICON Prozessleitsystems

### 3.2.2.4 Messwertverarbeitung

Die Übergabe der Messwerte an das UBICON erfolgte im Sekundentakt, während die Speicherung der ausgewählten Daten auf die Festplatte alle zwei Minuten erfolgte. Die Messwerte der Waagen und der Pumpen wurden ebenfalls im Sekundentakt an das UBICON übermittelt und zusammen mit den anderen Werten ebenfalls alle zwei Minuten gespeichert.

Die Berechnung der Prozessparameter über die Messwerte wurde extern mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel durchgeführt.

### **3.2.2.5 Lichterzeugung und Lichtmessung**

#### **Lichterzeugung**

Zwei unterschiedliche Lichtquellen wurden für die Kultivierungen verwendet.

Eine Lichtquelle war die ACE Light Source der Firma Schott mit einer integrierten steuerbaren Blende. Mit ihr wurden alle Versuche mit erhöhter Lichtintensität und die Versuche mit Hell-Dunkel-Zyklen im Bereich zwischen Stunden und Minuten durchgeführt.

Zur Erzeugung von Blitzlicht können im Wesentlichen zwei Methoden angewendet werden: der Einsatz einer Blitzlampe oder die Verwendung einer rotierenden Scheibe (Emerson et al., 1932). Da der Einsatz von Blitzlampen in der Regel mit schaltungstechnischen Begrenzungen bei der realisierbaren Pulsdauer einhergeht, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine rotierende Scheibe gewählt. Zusätzlich bietet der Einsatz der rotierenden Scheibe die Möglichkeit der Erzeugung von nahezu idealen Rechteckimpulsen, die mit Blitzlampen nicht zwangsläufig erzielt werden.

Für die Realisierung dieser Zyklen wurde eine neue Lichtquelle gebaut. Hierfür war der Einsatz einer rotierenden Scheibe mit speziellem Zuschnitt erforderlich. Um das Problem der Lichtfokussierung zu lösen, wurde außerdem eine spezielle Aluminiumschiene gebaut. Auf diese Schiene wurde zur Vermeidung zu großer Streuungseffekte der Halogenlampe eine eigene Fokussierungseinrichtung gebaut.

Die Schiene wurde längsseitig zur Lichtquelle befestigt und mit vier gleichartigen Linsen versehen, die paarweise auf der Schiene aufgeschraubt wurden.

Parallel zur Schiene wurde ein Elektromotor installiert und dessen Welle mit der senkrecht zur Schiene angeordneten Rotierscheibe versehen. Bei Lichtbetrieb wurden nun die Lichtstrahlen durch das erste Linsenpaar auf die Rotierscheibe, die über zwei  $66,9^\circ$ -winklige Ausschnitte verfügt, fokussiert und nach Durchgang durch die Scheibe wieder gestreut. Anschließend gelangten sie über einen Lichtleiter in das Reaktorinnere.

Über die Drehzahl des Elektromotors konnten die verschiedenen Frequenzen eingestellt werden. Photos der Vorrichtung sind im Anhang A3 zu sehen.

## Lichtmessung

Zur Bestimmung der Photonenflussdichte (PFD) im Reaktor wurde ein Miniquantensensor MQS der Firma Walz verwendet. Der Sensor ist mit einem  $2\pi$ -Messkopf ausgestattet, der einen Messbereich zwischen 0 und  $3000 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  ermöglicht. Die Sensorfläche beträgt  $7,45 \text{ mm}^2$ . Der erfassbare Spektralbereich liegt zwischen 400 nm und 700 nm und deckt somit den photosynthetisch aktiven Bereich der Pigmente ab. Gemessen wurde innen und außen an drei Stellen des Glaskörpers. Es wurden zwei Lampentypen (EJA und DDL) bei unterschiedlichen Öffnungen der Irisblende untersucht. Während der Messung war der Photo-Bioreaktor mit VE-Wasser gefüllt.

### 3.3 Analytische Methoden

#### 3.3.1 Biotrockenmassenkonzentration

##### 3.3.1.1 Gravimetrische Bestimmung

Die gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmassenkonzentration erfolgt mit Hilfe von Metall-Zentrifugenröhren in einer Doppelbestimmung, die bis zum Erreichen ihrer Gewichtskonstanz in einem Exsikkator aufbewahrt werden. In jedes abgewogene Zentrifugenröhrchen werden 25 ml Probe bekannter optischer Dichte gefüllt und bei  $20^\circ\text{C}$ ,  $8000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$  für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert, das Pellet wird in vollentsalztem Wasser resuspendiert und unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Der Waschvorgang der Pellets wird wiederholt. Die Zentrifugenröhren werden bei  $80^\circ\text{C}$  in einem Trockenschrank bis zum vollständigen Wasserentzug getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und gewogen.

Aus der Gewichts Differenz der Röhrchen wird die Biotrockenmassenkonzentration nach Gleichung (3.1) bestimmt.

$$c_x / (\text{g}\cdot\text{l}^{-1}) = \frac{m_{\text{Röhrchen,voll}} - m_{\text{Röhrchen,leer}}}{V_{\text{Pr obenvolumen}}} \quad (3.1)$$

### 3.3.1.2 Spektrometrische Bestimmung

Die optische Dichte wird in einem Spektrophotometer UV2-100 von Unicam bei einer Wellenlänge von 750 nm gegen Wasser gemessen, dabei werden Küvetten aus optischem Glas mit einer Lichtweglänge von 10 mm angewendet. Die Auswahl der Wellenlänge wurde wegen des überwiegenden Streueffekts an den einzelnen Algenzellen im Vergleich zu der Absorption der vorhandenen Pigmente ausgesucht. Eine lineare Abhängigkeit besteht zwischen der ermittelten optischen Dichte und der Partikelkonzentration, solange der ermittelte Extinktionswert zwischen 0,1 und 0,5 liegt, bei Überschreitung dieses Werts wird die Probe mit vollentsalztem Wasser entsprechend verdünnt. Die Bestimmung erfolgt gegen VE-Wasser.

Zwischen der optischen Dichte bei 750 nm ( $OD_{750\text{nm}}$ ) und der Biotrockenmassenkonzentration besteht eine lineare Korrelation (Anhang 4):

$$c_x / (\text{g} \cdot \text{l}^{-1}) = 0,34 * OD_{750 \text{ nm}} \quad (3.2)$$

### 3.3.1.3 Mikroskopische Bestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt durch das Auszählen der Zellen unter dem Mikroskop bei einer 500fachen Vergrößerung mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer. Die Probe wird dabei auf einen plangeschliffenen Objektträger mit Messquadraten definierter Fläche aufgebracht und mit einem planen Deckgläschen abgedeckt.

Dabei müssen die Newton'schen Ringe sichtbar werden. Die Probe wird mit Hilfe eines Glasstabes oder einer Impföse entnommen und in die Kammer eingebracht. Die Zählkammer ist in 16 Großquadrate eingeteilt, die wiederum jeweils 16 Kleinquadrate enthalten. Die Umrechnung der in der Thoma-Zählkammer ermittelten Mikroalgen in die Konzentration der Zellen pro ml erfolgt dann nach der folgenden Gleichung:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellen in den Zählkreuzen}}{\text{Fläche} \cdot \text{Tiefe}} \quad (3.3)$$

Fläche: Fläche der Thomakammer = 0,0025 mm<sup>2</sup>

Tiefe: Tiefe der Thomakammer = 0,1 mm

### 3.3.2 Polysaccharide: Konzentration und Charakterisierung

#### 3.3.2.1 Spektrometrische Bestimmung

Die Bestimmung der intrazellulären, der an die Zelle gebundenen und der im Medium gelösten (freien) Polysaccharide erfolgt nach der Bestimmungsmethode von Ramus (1977). Die angewandte Methode beruht auf der Eigenschaft von Alcian Blue, das kationische Verbindungen enthält, mit anionischen Gruppen des Polysaccharides Komplexe bilden zu können. Die Schwächung der Farbintensität wird mit Hilfe von einem Spektrometer UV2-100 von Unicam bestimmt und dient als Maß für die Polysaccharidkonzentration.

In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß werden 0,5 ml Algensuspension (gesamte Polysaccharide), 0,5 ml Alcian-Blue-Lösung (1g. l<sup>-1</sup> Alcian blue in 0,5 molarer Essigsäure, pH=2,5) und 0,2 ml einer 0,5 molaren Essigsäure zugegeben und 1 Minute lang mit Hilfe eines Vortex durchgemischt, und anschließend 24 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Bei 18000 U.min<sup>-1</sup> und 20°C werden die Eppendorf-Reaktionsgefäße 20 min lang in einer Zentrifuge (Hettich Zentrifuge EBA 12R) zentrifugiert. Die Absorption des Überstandes wird bei 610 nm gegen Essigsäure in Mikroplastik-Küvetten gemessen, dabei wird bei Bedarf die zu messende Probe mit ASW-Medium verdünnt, damit die Absorption zwischen 0,1 und 0,5 liegt.

Die intrazellulären und die freien Polysaccharide werden mit Hilfe der oben beschriebenen Methode bestimmt. Gewonnen werden die freien Polysaccharide, indem 1 ml der Algensuspension bei 8000 U.min<sup>-1</sup>, 20°C, 10 Minuten lang abzentrifugiert und der dabei gewonnene Überstand weiter bearbeitet wird. Die intrazellulären Polysaccharide werden durch Zellaufschluss in einer Schwingmühle (MM300, Retsch) gewonnen. Dabei wird 1 ml Algensuspension bei 8000 U.min<sup>-1</sup>, 20°C, 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und zum Rückstand (Pellet) 6 Wolframkugeln und 1 ml VE-Wasser zugegeben. Die Zellen werden dann bei einer Frequenz von 27,5 Hz drei mal drei min lang mit einer Minute Pause dazwischen aufgeschlossen. Nach der Schwingmühle werden die Reaktionsgefäße bei 8000 U.min<sup>-1</sup>, 20°C, 10 Minuten abzentrifugiert, und der Überstand weiter behandelt.

Die Bestimmung der Polysaccharide wird in Doppelbestimmung vorgenommen.

Die Konzentration an gebundenen Polysacchariden ergibt sich aus der Differenz zwischen gesamten und freien Polysacchariden.

Für die Bestimmung des Blindwertes wird ASW-Medium verwendet.

### 3.3.2.2 Kalibrierungskurve

Die Bestimmung der Kalibrierungskurve erfolgt durch die Fällung des Kulturüberstandes, der die freien Polysaccharide enthält, mittels Zugabe von Ethanol. Die so gewonnenen gefällten Polysaccharide werden gewaschen und durch dieselbe gravimetrische Bestimmung wie bei der Biotrockenmassenkonzentration bestimmt (Ramus, 1977; Klyachko-Gurvich et al., 1994). Der Nachteil der hier beschriebenen Nachweismethode beruht auf den unspezifischen Eigenschaften der eingesetzten Ethanol-Lösung sowie auf der Entstehung einer gelartigen Struktur der gefällten Polysaccharide. Somit werden viele andere Mediumbestandteile mit ausgefällt wie zum Beispiel Salze oder Proteine.

Der durchgeführte Waschvorgang der gefällten Polysaccharide und die im Vorfeld angewendete Dialyse der polysaccharidhaltigen Überstände bietet nicht die hundertprozentige Sicherheit, dass dadurch kein zu hoher Schätzwert der Polysaccharidkonzentration entsteht. Aus diesem Grund wurde die Konzentration des organisch gebundenen Kohlenstoffes im Überstand und im ASW-Medium bestimmt. Die Messungen wurden am Forschungszentrum Umwelt an der Universität Karlsruhe durchgeführt. Der Kohlenstoffgehalt der durch *P. purpureum* gebildeten Polysaccharide wird mit 44,35 % angenommen (errechnet aus Vonshak, 1988 und in guter Übereinstimmung mit El-Banoby, Rudolph, 1997).

Die Konzentration an Gesamtkohlenstoff (TC) wird mit Hilfe eines HighTOC-Analysators bestimmt. Im HighTOC-Analysator wird parallel die Konzentration an Gesamtkohlenstoff (TC) und die Konzentration des gesamten anorganisch gebundenen Kohlenstoffs (TIC) bestimmt, aus der Differenz wird rechnerisch die Konzentration des gesamten organisch gebundenen Kohlenstoffs (TOC) ermittelt.

#### TC-Bestimmung

10 ml der Probe werden in den TOC-Analysator injiziert, davon wird 1 ml in die heiße Einspritzpatrone überführt und auf 870 °C erhitzt. Die dabei entstandenen Verbrennungsprodukte werden vom Trägergas zum Katalysator (Cerdioxid  $\text{CeO}_2$ ) befördert. Die kohlenstoffhaltigen Substanzen werden quantitativ zu  $\text{CO}_2$  oxidiert. Das Messgas wird mit Hilfe eines Kondensators und eines Trockenrohres getrocknet, und die enthaltenen Halogene werden an Silberwolle absorbiert. Das enthaltene  $\text{CO}_2$  im Messgas wird dann im Infrarot-Detektor analysiert.

### TIC-Bestimmung

Die zu untersuchende Probe wird mit HCl-Lösung (1,6% Salzsäure-Lösung) angesäuert, die enthaltenen Karbonate werden in Form von CO<sub>2</sub> und anderen austreibbaren Verbindungen (POC) ausgetrieben. Das Messgas wird in einem Trockenrohr von Wasserdampf befreit, die HCl-Dämpfe werden an Silberwolle absorbiert. Der CO<sub>2</sub>-Gehalt des Messgases wird in der zweiten Küvette des Infrarot-Detektors analysiert.

### Angewendete Methode

Differenz-Modus, TOC-Extra

Bei der TOC-Extra-Methode liegt die Einspritztemperatur zunächst bei 250°C und wird dann langsam auf 870°C erhöht. Dieser Modus wurde gewählt, weil die zu untersuchende Probe einen hohen Salzgehalt aufweist. Das Injektionsvolumen für die TC-Bestimmung entspricht 1 ml und für die TIC-Bestimmung 2 ml.

Für die Polysaccharidkonzentration  $c_{PS}$  ergibt sich eine Regressionsgerade (Anhang 4).

$$c_{PS} / (\text{g.l}^{-1}) = -0,1336 \ln (\text{Abs}_{610 \text{ nm}}) + 0,3133 \quad (3.4)$$

### **3.3.3 Monosaccharidbestimmung**

Die Zusammensetzung der freien Polysaccharide wird mittels RP-HPLC (Reverse Performance High Chromatography)-Analyse untersucht. Für die Messungen wird das Gerät HPLC HP 1100 verwendet. Die Messungen werden am Forschungszentrum Umwelt der Universität Karlsruhe durchgeführt. Die Methode für die Probearbeitung und Messung der Monosaccharide wird aus einer am Institut laufenden Arbeit (Minorescu, 2003) übernommen, nachdem getestet wurde, dass die Probearbeitung sich auch sehr gut für die Polysaccharide von *Porphyridium purpureum* eignet.

Die extrazellulären Polysaccharide werden durch Zentrifugation der Algensuspension (20°C, 10 Minuten bei 8000 U.min<sup>-1</sup>) gewonnen. Sie werden dann mit 3 M Trifluoressigsäure bei 100 °C 7 Stunden hydrolysiert. Dafür werden verschlossene Gefäße verwendet, um ein Verdampfen der Proben zu vermeiden. Dieser Schritt

dient dazu, die Polysaccharide in einzelne Monomere zu spalten. Nach der Hydrolyse werden die Proben über Nacht im Vakuum getrocknet. Nach der Trocknung wird 1% Essigsäure zugegeben, um den Rückstand mit den Monosacchariden zu lösen und überflüssigen Wasserstoff zu entfernen. Anschließend wird Anthranilsäure pipettiert und 60 min bei 80 °C derivatisiert. Die einzelnen Monosaccharide werden durch die Derivatisierung fluoreszierend gemacht und können mit dem Fluoreszenz-Detektor in der RP-HPLC gemessen werden.

Die RP-HPLC unterscheidet sich von der normalen Adsorption-HPLC dadurch, dass die Säule nicht polar und der Eluent polar (wasserlöslich) ist. Das Prinzip einer solchen Messung beruht auf der Adsorption der hydrophoben Gruppen der Moleküle an die funktionellen Alkylgruppen  $(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3$  der Säule (hydrophobe Retention). Dabei wird die im polaren Eluent gelöste Analysesubstanz unter Druck (80 bar) durch die Säulen gedrückt. Je weniger polar eine Substanz ist, desto stärker wird sie von der Säule angezogen, dadurch wird ihre Verweilzeit in der Säule verlängert. Die Substanzen werden durch einen Fluoreszenz-Detektor detektiert. Der Vorteil solcher Detektoren gegenüber DAD-Detektoren (Diodenarray mit Photodioden) liegt darin, dass die Empfindlichkeit der Detektion höher ist und die Messung von sehr kleinen Konzentrationen ermöglicht wird. Die Identifizierung der Peaks wird durch einen Vergleich mit einem Multistandard durchgeführt, der die Monosaccharide, die aus der Literatur bekannt sind, enthält.

Die RP-HPLC-Aufbereitung der Proben, die genaue Zusammensetzung der verwendeten Chemikalien und Eluenten und die benutzte Methode für die RP-HPLC-Messung sind im Anhang A5 beschrieben.

### 3.3.4 Rheologische Messungen

Die rheologischen Eigenschaften der gebildeten Polysaccharide werden durch die Verwendung von zwei Mess-Systemen charakterisiert. Die Vorbereitung der Probe erfolgt für beide Messungen gleich. Die zu messenden Polysaccharide werden aus einer Biosuspension gewonnen, die bei  $8000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$  10 min bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert wurde. Der Überstand, welcher die Polysaccharide enthält, wird gesammelt und dialysiert. Die Dialyse erfolgt mit Hilfe eines Dialyseschlauches gegen VE-Wasser. Die Dauer des Dialysevorgangs wird durch die Bestimmung der Leitfähigkeit kontrolliert und bestimmt.

#### 3.3.4.1 Kapillarviskosität

Die Messungen werden mit einem KPG-Ubbelohde-Viskosimeter der Firma Schott Geräte, Deutschland durchgeführt. Die verwendete Kapillare hat einen Innendurchmesser von 0,53 mm und entspricht dem Typ 0a. Die Korrekturwerte der Durchflusszeit sind der zugehörigen Tabelle des Typs 0a für die Hagenbachkorrektur zu entnehmen. Die Zeiterfassung für den Kapillardurchfluss erfolgt manuell mit einer Digitalstoppuhr. Für jede Probe werden fünf Durchflusszeiten gemessen, aus denen ein Mittelwert gebildet wird. Nach jedem Lauf wird das Viskosimeter gespült und für mindestens 20 min mit der neuen Messlösung auf  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  temperiert. Die Dichte der Lösungen wird mittels einer Waage bei Raumtemperatur bestimmt. Aus den Durchlaufzeiten und den tabellierten Korrekturfaktoren wird die kinematische Viskosität nach der Formel

$$\nu /(\text{mm}^2\cdot\text{s}^{-1}) = K \cdot (t - \vartheta) \quad (3.5)$$

berechnet und mit der gemessenen Dichte der Proben wird die dynamische Viskosität bestimmt.

$$\mu /(\text{Kg}\cdot\text{m}\cdot\text{s}^{-1}) = \nu \cdot \rho \quad (3.6)$$

#### 3.3.4.2 Rheometer

Die rheometrischen Messungen werden mit einem Rheometer der Firma Haake vom Typ Rheostreß 100 durchgeführt. Das Rheometer wird in eine Kegel-Platte-Geometrie eingesetzt und mit gesteuerter Schubspannung (CS) benutzt. Der Kegeldurchmesser beträgt 60 mm mit einem Kegelwinkel von  $2^\circ$ . Alle Experimente werden bei einer Temperatur von  $20^\circ\text{C}$  durchgeführt.

### 3.3.5 Trennung von Polysacchariden

Im Verlauf von mehreren Kultivierungen sollten im Bypass einerseits die Mikroalgen aus dem Kultivierungsmedium und andererseits die freien Polysaccharide aus dem Nährmedium abgetrennt werden. Mehrere Filtrationsmodule wurden für die Abtrennung der Zellen und die Abtrennung der freien Polysaccharide getestet. Es handelt sich dabei um mehrere autoklavierbare Hohlfaser-Membranen aus Polysulfon der Firma Amersham. Das erste Filtrationsmodul hat einen Innendurchmesser von 1 mm, eine Länge von 30 cm und eine Membranfläche von 16 cm<sup>2</sup>. Der cut-off des Filtrationsmoduls beträgt 0,45 µm. Mit diesem Modul sollen im Verlauf der Kultivierung die Mikroalgen vom Kulturmedium mit den vorhandenen freien Polysacchariden in achtstündigen Zyklen kontinuierlich abgetrennt werden.

Die zweite Filtrationseinheit besteht aus einer Ultrafiltrationsmembran, bei der mehrere Module mit Porengrößen zwischen 100 kDa und 5 kDa getestet wurden. Die Abmessungen dieser Module sind in der Tabelle 3.1 dargestellt. Mittels Ultrafiltration sollen die Polysaccharide aus dem zellfreien Nährmedium entfernt werden.

**Tabelle 3.1:** Abmessungen der verwendeten Mikrofiltrations- und Ultrafiltrationsmodule.

	Porengröße	Fläche	ID	Länge
Mikrofiltration	0,45 µm	16 cm <sup>2</sup>	1,0 mm	30,0 cm
Ultrafiltration	100 KDa	42 cm <sup>2</sup>	0,5 mm	60,0 cm
	10 KDa	26 cm <sup>2</sup>	0,5 mm	30,8 cm
	5 KDa	26 cm <sup>2</sup>	0,5 mm	30,8 cm

Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

**Tabelle 3.2** : Tabellarische Charakterisierung der verwendeten Mikro- und Ultrafiltration, um die Zellen und die Polysaccharide aus der Suspension abtrennen zu können

	Porengröße	Filtrations- Geschwin- digkeit [l.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> ]	Trans- membran- Druck [Pa]	Absolute Trenn- leistung <sup>1</sup>	Trenn- Leistung <sup>2</sup>
Mikrofiltration	0,45 µm	34,00	0,70	100	100
Ultrafiltration	100 KDa	31,08	176,75	4,27	43,20
	10 KDa	44,11	175,75	2,37	42,92
	5 KDa	80,30	63,62	2,37	0

1. Absolute Trennleistung (%) =  $[F \text{ (l/h)} \cdot C^F_{ps} \text{ (mg/l)}] / [E \text{ (L/h)} \cdot C^E_{ps} \text{ (mg/l)}] \cdot 100$

2. Trennleistung (%) =  $1 - [C^F_{ps} \text{ (mg/l)} / C^E_{ps} \text{ (mg/l)}] \cdot 100$

F und E sind dabei Filtrat- und Eingangsvolumenstrom.

$C^F_{ps}$  und  $C^E_{ps}$  sind Polysaccharidkonzentrationen im Filtrat- und im Nährvolumenstrom. Sie sind mittels Alcian Blue bestimmt worden.

Die erzielten Ergebnisse zeigen eine vollständige Abtrennungsmöglichkeit der Zellen aus dem Kultivierungsmedium beim Einsatz der Mikrofiltration mit einer Porengröße von 0,45 µm. Dagegen zeigen die verwendeten Ultrafiltrationen nur eine maximale Trennleistung der freien Polysaccharide von 50%. Der Einsatz einer Ultrafiltration mit Porengröße unter 5 KDa wurde aufgrund zu großer Verstopfungsgefahr nicht herangezogen. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Ultrafiltration mit einer Porengröße von 10 KDa für die Versuche verwendet.

Die Versuchsanlage wird an den Bypass für die Transmissionszelle angeschlossen. Sie besteht aus der Filtrationseinheit mit zwei Druckanzeigen am Eingang und am Ausgang der Säule, einer Umwälzpumpe, die die Biosuspension bzw. das Filtrat in die Säule pumpt, einer Flasche und einer Waage. Vor jedem Experiment werden die hydraulische Permeabilität der Membran mit VE-Wasser und der Volumenstrom der Filtrationseinheit in Abhängigkeit von der verwendeten Pumpe ermittelt. Vor jedem Einsatz muß das Filtrationsmodul mit VE-Wasser gespült werden.

Mit der Umwälzpumpe wird die zu filtrierende Lösung in die Membran gepumpt. Am Schlauch am Ausgang der Säule ist eine Klemme vorgesehen. Wenn die Säule

vollständig mit Lösung gefüllt ist und sich keine Luftblasen mehr darin befinden, wird die Klemme langsam zuge dreht bis die gewünschte Druckdifferenz zwischen Ein- und Ausgang der Säule eingestellt ist. Die Mikrofiltration zur Abtrennung der Zellen wird bei einem Druck am Ausgang der Säule von  $1,5 \pm 0,2$  bar durchgespült. Die Ultrafiltration zur Abtrennung der Polysaccharide soll bei einem Druck am Ausgang der Säule von  $1,8 \pm 0,2$  bar durchgespült werden. Zu beachten ist, dass der Druck nicht über 2 bar steigt, die Säule könnte ansonsten zerstört werden. Anschließend wird die Membran mit VE-Wasser von  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  mehrmals gespült.

### 3.3.6 Bestimmung des Pigmentgehaltes

#### 3.3.6.1 *In vivo*-Bestimmung

Die Absorptionskurve der Algensuspension wird in einer Glasküvette in einem Spektrophotometer Cary 50 Conc (Varian) in einem Bereich von 350 bis 800 nm gegen Wasser aufgenommen, die optische Dichte der zu untersuchenden Probe sollte zwischen 0,1 und 0,5 liegen. Das Spektrophotometer wird mit einem zusätzlichen Detektor ausgerüstet, der unmittelbar hinter der Küvette angeordnet ist. Durch diese Messanordnung wird der Einfluss der Streuung auf die Messung unterdrückt, indem alle Strahlen erfasst werden, die innerhalb eines Winkels von  $78^{\circ}$  nach vorne gerichtet sind (bezogen auf die Küvettenmitte).

Die Pigmentkonzentrationen lassen sich für Phycoerythrin nach

$$C_{\text{Phycoerythrin}}/(\text{g}\cdot\text{l}^{-1}) = 0,235 \cdot (\text{Abs}_{560} - 1,2 \text{ Abs}_{750}) \quad (3.7)$$

und für Chlorophyll a nach

$$C_{\text{Chlorophyll a}}/(\text{g}\cdot\text{l}^{-1}) = 0,0125 \cdot (\text{Abs}_{560} - 1,1 \text{ Abs}_{750}) \quad (3.8)$$

aus den Absorptionsspektren errechnen (Csögör, 2000).

### 3.3.6.2 *In vitro*-Bestimmung

Es werden vier mal 10 ml Algensuspension zentrifugiert ( $10000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ , 10 min,  $20^\circ \text{C}$ ) und der Überstand verworfen. Für die Chlorophyll a-Bestimmung werden zwei der gebildeten Pellets in je 1,5 ml 100 % Aceton- $\text{CaCO}_3$ -Lösung gelöst und jeweils in ein Eppendorfgefäß gefüllt. Die Zellen werden aufgeschlossen, indem sie drei mal drei Minuten bei 27,5 Hz in einer Schwingmühle geschüttelt werden. Die Proben werden dann sofort abgedunkelt und auf Eis gestellt.

Zur Bestimmung von Phycoerythrin werden die beiden übrigen Pellets in jeweils 5 ml Pufferlösung (CertiPUR 1.07294, MERCK) gelöst, bei  $-18^\circ \text{C}$  eingefroren und langsam unter mäßigem Schütteln aufgetaut. Der Vorgang wird wiederholt.

### 3.3.7 Bestimmung des Lipidgehaltes

Zur Analyse der Fettsäuren wird das Verfahren nach MIDI verwendet. Dabei werden Fette gespalten und die freien Fettsäuren in Fettsäure-Methylester umgewandelt, die in einem Gaschromatographen mit anschließender Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert werden können.

4 ml Algensuspension werden bei  $20^\circ \text{C}$ ,  $5000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ , 20 min abzentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Die Algenpellets werden mit 1ml Reagenz 1 aufgenommen und 5-10 s gevortext. Anschließend werden sie 5 min in ein kochendes Wasserbad getaucht, wieder 5-10 s gevortext und noch einmal für 25 min in  $100^\circ \text{C}$  heißes Wasser gegeben. Bei dieser Behandlung werden die Triglyceride aufgespalten und die freien Fette verseift. Danach wird auf Raumtemperatur abgekühlt, 2 ml Reagenz 2 hinzugefügt und 5-10 s gevortext. Für 10 min werden die Reagenzgläser bei  $80^\circ \text{C}$  gehalten und danach sofort auf Eis abgekühlt. Nach diesem Schritt liegen die Fettsäure-Methylester in der wässrigen Phase vor. Zur Extraktion in die organische Phase werden 1,25 ml Reagenz 3 hinzugegeben und 10 min geschwenkt. Die untere wässrige Phase wird abpipettiert. In der oberen Phase befinden sich jetzt die Fettsäure-Methylester, die noch einmal gewaschen werden. Hierfür werden 3 ml Reagenz 4 zur organischen Phase hinzugefügt. Die Reagenzien lassen sich in größerem Umfang vorbereiten, so dass tägliche Analysen in kurzer Zeit und

Mehrfachbestimmungen möglich sind. Bis zur Analyse im Gaschromatographen werden die Proben bei  $-18^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die Zusammensetzung der verschiedenen verwendeten Chemikalien, die charakteristischen Eigenschaften der verwendeten Säule sowie das Programm zur Analyse der Fettsäuremethylester sind im Anhang A6 beschrieben.

### **Analyse im Gaschromatograph-Massenspektrometer (GC-MS)**

Die Analyse der Fettsäuremethylester erfolgt in einem GC-MS. Neben der Analyse kann bei diesem Gerät aufgrund unterschiedlicher Siedepunkte noch die Molmasse der zu analysierenden Substanz ermittelt und zur Auswertung herangezogen werden. Ein Trägerstrom (hier: Helium) wird über einen Durchflussregler zur Einspritzstelle geführt. Dort wird die Probe zur Analyse durch die Säule mitgeschleppt. Das Einspritzen sollte so schnell wie möglich erfolgen, was durch die geringe Probemenge von  $1\mu\text{l}$  gewährleistet werden kann. Das Trägergas und die Probe durchlaufen dann die Säule in einem thermostatisierten Ofen, in der die Komponenten der Probenmischung aufgrund der unterschiedlichen Siedepunkte getrennt werden. Hinter der Säule befindet sich ein Detektor, der die ankommenden Gase registriert. Durch Analyse einer geeigneten Standardprobe (Rotichrom FA3 von Roth) besteht die Möglichkeit, sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage über die Zusammensetzung der Probe durchzuführen.

### **3.3.8 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes**

Zur Analyse der Gesamtproteinkonzentration wird das Verfahren nach Bradford angewendet. Diese Methode basiert auf der Eigenschaft des Coomassie Brilliantblau G-250, sich an Proteine zu binden, wobei sich sein Absorptionsmaximum von  $465\text{ nm}$  nach  $595\text{ nm}$  verschiebt. Der Farbstoff bindet sich dabei unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine. Die Absorption bei  $595\text{ nm}$  dient als Messgröße für die Proteinkonzentration.

Als Reagenzlösung wird BIOQUANT 1.10306 (Merck, Darmstadt) verwendet.

Die Proben werden vor der Gesamtproteinbestimmung aufgeschlossen, dabei werden  $5\text{ ml}$  der Algensuspension bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit  $8000\text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$   $10\text{ Minuten}$  lang zentrifugiert.  $2\text{ ml}$  von Puffer A ( $0,1\text{ mM}$  Perfabloc SC-proteaseinhibitor in  $0,1\text{ M}$  Tris-

HCL) werden dem gewonnenen Rückstand zugegeben. Die Proben werden dann bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  mindestens 8 Stunden aufbewahrt. Nach dem Auftauen der Probe wird das Algen-Pellet mit Flüssigstickstoff in einem vorgekühlten Mörser aufgeschlossen. 1,5 ml der somit bearbeiteten Suspension wird in einem Reaktionsgefäß gesammelt und bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bei  $11000\text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ , 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand kann anschließend analysiert werden.

In Abhängigkeit von der geschätzten Gesamtproteinkonzentration werden zwei unterschiedliche Bradford-Methoden verwendet.

Bis zu einer Gesamtproteinkonzentration von  $0,06\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  werden  $500\text{ }\mu\text{l}$  der Reagenzlösung mit  $500\text{ }\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Probe in eine Mikroküvette aus Plastik gegeben.

Bei einer größeren Gesamtproteinkonzentration werden  $900\text{ }\mu\text{l}$  der Reagenzlösung mit  $100\text{ }\mu\text{l}$  Probelösung gemischt.

Die Extinktion wird in beiden Fällen bei  $595\text{ nm}$  nach  $5\text{ min}$  gemessen. Die Messung erfolgt gegen eine Mischung aus VE-Wasser und Puffer A ( $500\text{ }\mu\text{l}$  oder  $100\text{ }\mu\text{l}$ ).

### **Kalibrierungskurve**

Die Kalibrierungsgeraden werden mit Rinderserumalbumin als Modellsubstanz erstellt.

Die Gleichung der Kalibrierungsgeraden für eine Gesamtproteinkonzentration kleiner  $0,06\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  lautet

$$C_{\text{proteine}} / (\text{g}\cdot\text{l}^{-1}) = 0,0651 \cdot \text{OD}_{595\text{nm}} - 0,008 \quad (3.9)$$

mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,9979$  (Anhang 3).

Die Gleichung der Kalibrierungsgeraden für eine Gesamtproteinkonzentration größer als  $0,06\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  lautet

$$C_{\text{proteine}} / (\text{g}\cdot\text{l}^{-1}) = 0,1383 \cdot \text{OD}_{595\text{nm}} + 0,0121 \quad (3.10)$$

mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,9929$  (Anhang 3).

### **3.3.9 Eindimensionale Elektrophorese**

Die eindimensionale Elektrophorese für *Porphyridium purpureum* wurde in einer Mini PROTEAN 3 Cell von Biorad durchgeführt.

#### **3.3.9.1 Probenvorbereitung**

Bei der optimierten Probenvorbereitung werden 10 ml Algensuspension bei 20°C, 8000 U.min<sup>-1</sup>, 10 Minuten abzentrifugiert. Da die Algen extrazelluläre Polysaccharide bilden, wird zuerst das Pellet gewaschen. Dadurch soll die Konzentration der extrazellulären Polysaccharide vermindert werden. Das Pellet wird in VE-Wasser resuspendiert, danach gevortext und wieder bei 20°C und 8000 U.min<sup>-1</sup>, 10 Minuten abzentrifugiert. Der Vorgang wird einmal wiederholt. Die Zellsuspension wird dann mit flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Danach wird der Sample-Puffer mit der Probe in einem Verhältnis von eins zu zwei zugemischt.

#### **3.3.9.2 Herstellung des Polyacrylamidgels**

Die Glasplatten des Geräts „Mini Protean 3 Cell“ der Firma Amersham müssen zunächst in das Casting Frame eingesetzt werden, danach werden die Chemikalien für das Trenngel mit der gewünschten Konzentration zusammengemischt. Dabei muss APS und TEMED als Letztes zugegeben werden, da diese den Polymerisationsprozess starten. Danach wird die Lösung mit einer Eppendorf-Pipette sofort in den Spalt zwischen den Glasplatten bis etwa 1 cm unter den oberen Rand eingefüllt. Dabei ist zu beachten, dass keine Luftblasen in der noch flüssigen Lösung eingeschlossen werden. Um ein Austrocknen des oberen Gelrandes zu verhindern, wird die Trenngel-Lösung mit 96%igem Ethanol überschichtet. Der Polymerisationsprozess ist abgeschlossen, wenn die flüssige Lösung zu festem Gel umgewandelt ist. Bei Raumtemperatur dauert der Prozess etwa 30 bis 60 Minuten. Das gleiche Verfahren gilt auch für das Sammelgel. Nachdem das Ethanol restlos mit Papiertüchern aufgesaugt ist, wird die Sammelgel-Lösung bis kurz vor dem Überlaufen zugegeben. Danach wird der sogenannte Comb (Gelkamm) eingesetzt. Damit werden die Taschen zum Auftragen der zu untersuchenden Probe angefertigt.

Es ist immer darauf zu achten, dass keine Luftblasen beim Einsetzen des Combs in der Gelschicht eingeschlossen werden. Die Polymerisation dauert bei Raumtemperatur etwa 15 bis 30 Minuten.

Die bereits gegossenen Gele können in feuchte Papiertücher und Frischhalte- bzw. Aluminiumfolie eingewickelt und bei 4°C für ca. 4 Wochen aufbewahrt werden.

### **3.3.9.3 Durchführung der elektrophoretischen Trennung**

Die vorbereitete Probe wird vor dem Auftragen in die Geltasche 20 Minuten mit der doppelten Menge des Sample-Puffers gemischt und im kochenden Wasserbad für 3 Minuten aufgekocht. Die optimale Mengenzugabe des Sample-Puffers wird untersucht, die dabei erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 zu sehen.

Der Sample-Puffer enthält den Farbstoff Bromphenolblau. Dieser Farbstoff reagiert nicht mit den Proteinen und hat die gleiche Wandergeschwindigkeit wie ein Protein mit Molekulargewicht von 5 kDa. Der Farbstoff wird als Marker bei der Elektrophorese eingesetzt, um den Prozess rechtzeitig beenden zu können. Nachdem zwei mit Gel gefüllte Glassplatten in der inneren Kammer vertikal eingespannt wurden, wird der dadurch entstandene Kathodenraum mit Laufpuffer aufgefüllt. Dabei soll der Kathodenraum auf seine Dichtigkeit überprüft werden. Wenn nur eine Gelplatte für die Elektrophorese vorbereitet ist, muss für die zweite Platte ein sogenannter Pufferdamm eingesetzt werden.

Die ganze Apparatur wird dann in einen Minitank gestellt. Der Anodenraum muss mit ausreichend Laufpuffer gefüllt werden. Nur so kann ein geschlossener Stromkreis gewährleistet werden. Beim Auftragen der gekochten Proben sollten die Geltaschen mit Hilfe von Eppendorf-Pipetten mit Laufpuffer umspült werden.

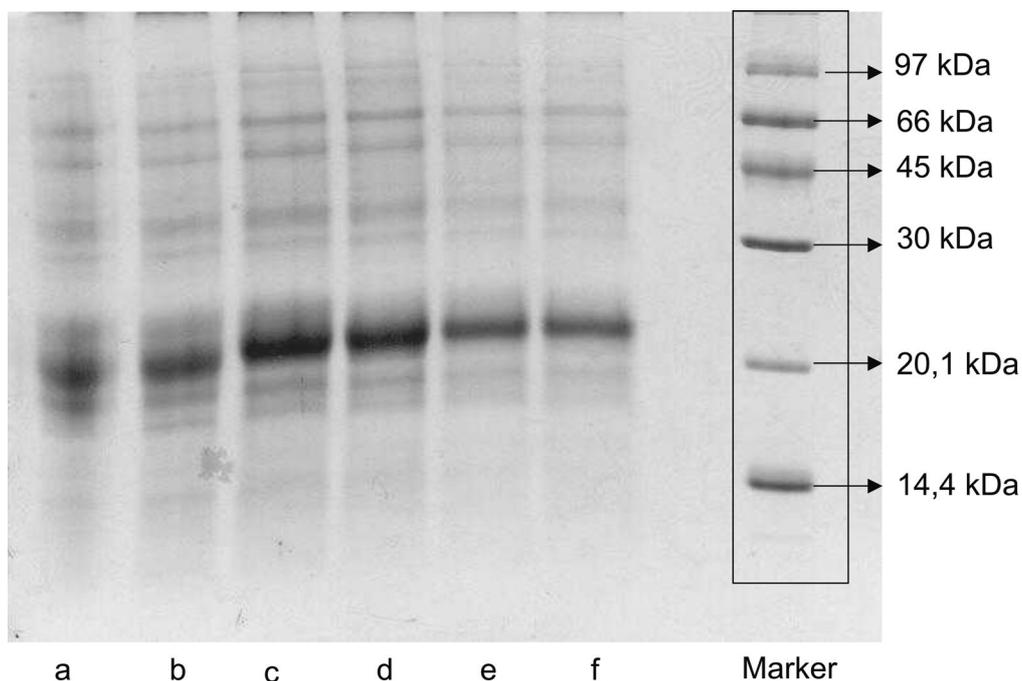
Standardproteine sind Proteine mit bekanntem Molekulargewicht, dadurch lässt sich das Molekulargewicht eines unbekanntes Proteins abschätzen. Mit einer Mikropipette werden 10 µl Proben und 3 µl Standardproteine in die Geltasche aufgetragen. Es sollten nicht mehr als 10 µl Probenvolumen in eine Tasche gegeben werden, damit ein Überlaufen in die nächste Tasche verhindert wird.

Zuletzt wird die Elektrophoresekammer mit einem Deckel verschlossen und an ein Spannungsnetzgerät angeschlossen. Solange die Proben im Sammelgel wandern,

wird das Netzgerät auf 10 mA eingestellt. Beim Eintritt in das Trenngel kann die Stromstärke auf 20 mA erhöht werden. Um die Wärmeentwicklung in Grenzen zu halten, darf die Stromstärke nicht höher als 45 mA sein. Sonst kann durch die Wärme Wasser verdunsten, wodurch sich die Ionenkonzentration ändert. Außerdem kann sich mit der Temperatur das Gleichgewicht der Dissoziationsreaktion ändern und es kann zu thermischer Konvektion kommen.

Wenn die blau gefärbte Linie des Sample-Puffers den unteren Rand des Gels erreicht, ist die Elektrophorese beendet. Sie dauert zwischen 2 und 6 Stunden. Danach wird das Gel vorsichtig aus der Elektrophorese-Apparatur genommen und für den Färbevorgang vorbereitet.

Um die Optimierung der Probenbearbeitung für die eindimensionale Elektrophorese zu veranschaulichen, ist in Abbildung 3.4 die eindimensionale Auftrennung der vorhandenen Proteine der Mikroalge *Porphyridium purpureum* auf ein 15%iges Gel aufgetragen. In diesem Versuch wird der Einfluss der Menge an zugegebenem Sample-Puffer zu der Menge an Probevolumen untersucht.



**Abbildung 3.4:** Eindimensionale Auftragung der Proteine der Mikroalge *Porphyridium purpureum* auf ein 15%iges Gel. Das Verhältnis zwischen der zugegebenen Menge an Sample-Puffer und dem Probevolumen wurde variiert. Die zugegebene Menge an Sample-Puffer entspricht einem Vielfachen des Volumens der Probe (a=0,5; b=1; c=1,5; d=2; e=2,5 und f=3).

### 3.4 Abgeleitete Größen

#### 3.4.1 Offline-Größen

Aus der experimentell bestimmten Konzentration der Biotrockenmasse  $c_x$  wird die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  während der exponentiellen Wachstumsphase in der Batch-Kultivierung nach

$$\frac{dc_x(t)}{dt} = \mu \cdot c_x(t) ; c_x = c_{x,0} \cdot e^{\mu \cdot t} \quad (3.11)$$

bestimmt.

Dabei bezeichnet  $c_x$  die Zellkonzentration in der Lösung und  $\mu$  die spezifische Wachstumsrate.

Zur Beschreibung des Wachstums während des kontinuierlichen Betriebs muss die Verdünnungsrate  $D$  berücksichtigt werden:

$$\frac{dc_x(t)}{dt} = \mu \cdot c_x(t) - D \cdot c_x(t) \quad (3.12)$$

Die Wachstumsrate lässt sich über die Verdünnungsrate berechnen

$$\mu = D = \frac{q(t)}{V_R} , \quad (3.13)$$

$q$  beschreibt dabei den Zufluss an frischem Medium und  $V_R$  das Arbeitsvolumen.

### 3.4.2 Produktbildungsraten

Die Produktbildungsraten werden im Batch-Betrieb mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{dc_p(t)}{dt} = r_p \cdot c_x(t) \quad (3.14)$$

mit  $c_p$       Konzentration des Produkts  
 $c_x$       Zellkonzentration  
 $r_p$       Produktbildungsrate

Die Produktbildungsraten im kontinuierlichen Betrieb werden unter Berücksichtigung der Verdünnungsrate berechnet:

$$\frac{dc_p(t)}{dt} = r_p \cdot c_x(t) - D \cdot c_p(t) \quad (3.15)$$

Die spezifische Bildungsrate der freien Polysaccharide in der Kultivierung mit Einsatz der Mikrofiltration wird während dieser Phase mit der Formel

$$\frac{dc_{fps}(t)}{dt} = \frac{q_{\text{Filtrat}} - q}{V_R} \cdot c_{fps_{\text{Reaktor}}}(t) - \frac{q_{\text{Filtrat}}}{V_R} \cdot c_{fps_{\text{Filtrat}}} + r_{fps} \cdot c_x(t) \quad (3.16)$$

berechnet.

mit  $c_{fps}$       Konzentration der freien Polysaccharide  
 $c_{fps_{\text{Reaktor}}}$       Konzentration der freien Polysaccharide im Reaktor  
 $c_{fps_{\text{Filtrat}}}$       Konzentration der freien Polysaccharide im Filtrat der Mikrofiltration.  
 $c_x$       Zellkonzentration  
 $q$       Zufluss an frischem Medium  
 $q_{\text{Filtrat}}$       Als Filtrat abgezogener Zufluss bei der Mikrofiltration

Für die Kultivierung mit Mikro- und Nanofiltration wird während dieser Phase die spezifische Bildungsrate der freien Polysaccharide mit folgender Formel bestimmt:

$$\frac{dc_{fps}(t)}{dt} = \frac{q_{\text{Konzentrat}} - q}{V_R} \cdot c_{fps_{\text{Reaktor}}}(t) - \frac{q_{\text{Konzentrat}}}{V_R} \cdot c_{fps_{\text{Konzentrat}}} + r_{fps} \cdot c_x(t) \quad (3.17)$$

mit  $c_{\text{fpsKonzentrat}}$  Konzentration der freien Polysaccharide im Retentat der Nanofiltration  
 $q_{\text{Konzentrat}}$  Als Retentat gesammelter Zufluss der Nanofiltration

### 3.4.3 Online-Größen

Die photosynthetische Aktivität wird mit Hilfe der  $\text{CO}_2$ -Aufnahmerate und der  $\text{O}_2$ -Produktionsrate bestimmt.

Während der Dunkelreaktion wird  $\text{CO}_2$  fixiert. Die Fixierung kann in Form der  $\text{CO}_2$ -Aufnahmerate  $r_{\text{CO}_2}$  aus den Daten der Abgasbilanz berechnet werden.

Gesamte  $\text{CO}_2$ -Aufnahmerate:

$$R_{\text{CO}_2} = \frac{\text{aufgenommenes\_CO}_2[\text{g}]}{\text{Zeit}[\text{d}]} \quad (3.18)$$

Spezifische  $\text{CO}_2$ -Aufnahmerate:

$$r_{\text{CO}_2} = \frac{\text{aufgenommenes\_CO}_2[\text{g}]}{\text{Masse\_an\_Zellen}[\text{g}] \cdot \text{Zeit}[\text{d}]} \quad (3.19)$$

Der aufgenommene  $\text{CO}_2$ -Volumenstrom wird aus der Differenz des  $\text{CO}_2$ -Volumenstroms in der Zuluft und des  $\text{CO}_2$ -Volumenstroms in der Abluft ermittelt.

$$r_{\text{CO}_2} \left[ \frac{\text{g}}{\text{g} \cdot \text{d}} \right] = \frac{dV_{\text{CO}_2}}{dt} \cdot \frac{M_{\text{CO}_2}}{V_M \cdot V_R \cdot c_x} \quad (3.20)$$

Alle Auswertungen dieser Arbeit werden mit Matlab-Funktionen durchgeführt.

### 3.4.4 Matlab / Simulink

Für die Modellierung von Bioprozessen wird das am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik der Universität Karlsruhe vorhandene Softwarepaket MATLAB-SIMULINK von MathWorks verwendet. Verschiedene TOOLBOXES, wie z.B. die CONTROL SYSTEM TOOLBOX für die Regelung, erweitern das Paket.

Der Begriff MATLAB steht für MATrix LABoratory. Es ist ein numerisches Berechnungs- und Simulationswerkzeug, das aus den ursprünglich in der Programmiersprache Fortran geschriebenen numerischen Funktionsbibliotheken LINPACK und EISPACK zu einem kommerziellen Werkzeug mit benutzerfreundlicher Bedienoberfläche entwickelt wurde. MATLAB ermöglicht einfaches Programmieren unter Verwendung eingebauter und eigener Funktionen, sowie die Visualisierung von Daten.

SIMULINK ist eine weitere TOOLBOX, mit der unter anderem dynamische Systeme auf einer graphischen Oberfläche mittels Blockschaltbildern konstruiert werden können. Das Programm enthält schon eine umfangreiche Bibliothek an Einzelschaltblöcken, die vom Nutzer erweitert werden kann. *s-functions* sind solche Blöcke, die selbst programmiert werden müssen. Sie werden in der MATLAB-Ebene wieder aufgerufen und die entsprechenden Daten werden weiterverarbeitet. In der Kommunikation zwischen MATLAB und SIMULINK liegt auch eine wesentliche Eigenschaft der Software.

In der vorliegenden Arbeit wird mit der MATLAB-Version 6.5 (Release 13) und der SIMULINK-Version 5.0 gearbeitet. Hierbei stellt SIMULINK die grobe Modellstruktur und in MATLAB findet die eigentliche Programmier- und Rechenarbeit statt.

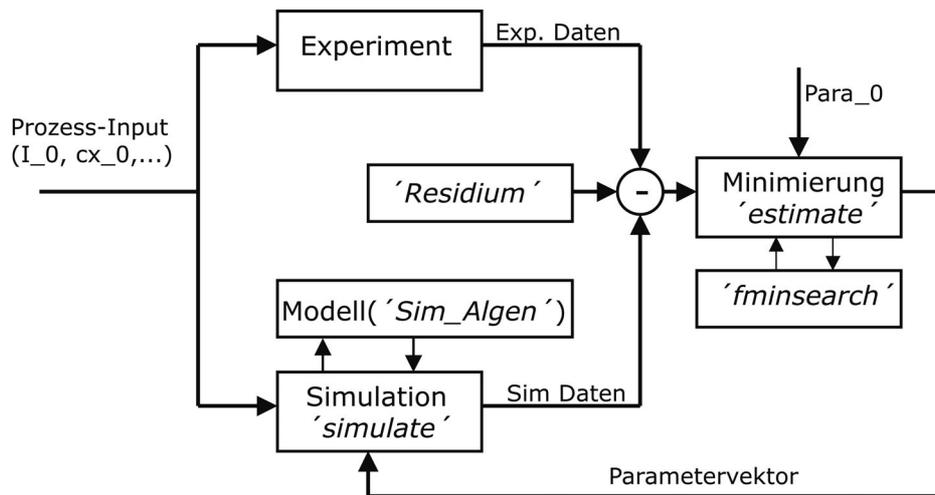
### 3.4.5 Optimierungsprogramm

Um ein bestehendes Modell an experimentelle Daten anzupassen, müssen einige Modellparameter abgeschätzt werden, da es nicht immer möglich ist, nur anhand von theoretischen Überlegungen alle Parameter bestimmen zu können. Das Ziel eines solchen Anpassungsalgorithmus ist die Minimierung der Abweichungen von experimentellen und simulierten Daten. Das Optimierungsprogramm basiert auf dem Prinzip des Simplexverfahrens nach Nelder und Mead (1965). Dabei erfolgt die Ermittlung der Parameter mit der Methode der kleinsten Quadrate, wobei der kumulierte quadratische, mit der Varianz normierte Fehler zwischen Simulation und Messwerten

$$J(P_1, P_2, \dots, P_n) = \min \sum_{i=1}^n \frac{\Delta_i^2}{x_i^2} \quad (3.21)$$

als Gütefunktional für die Anpassung gewählt wird. Die dabei entwickelte Struktur der Parameterbestimmung ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

Zunächst gibt es noch einige mathematische Aspekte, die bei einer Parameterschätzung beachtet werden müssen. So sollten die Startwerte der Parameterschätzung ( $para_0$ ) möglichst nahe bei den optimalen Parametern liegen, in etwa dieselbe Größenordnung haben und nur in gewissen Grenzen gelten, um lokale Minima außerhalb des Gültigkeitsbereichs zu vermeiden. Dies kann beispielsweise dadurch geschehen, dass zunächst eine manuelle Parameterschätzung mit jeweils nur einem Parameter durchgeführt wird, bis alle Parameter geschätzt wurden. Die Ergebnisse dieser ersten Schätzung können dann als Startwerte für den Anpassungsalgorithmus dienen.



**Abbildung 3.5:** Struktur der Parameteranpassung: unbekannte Modellparameter (*para*) werden mit Hilfe einer in Matlab implementierten Optimierungsfunktion (*'fminsearch'*) angepasst. Diese Funktion minimiert den kumulierten Fehler zwischen experimentellen und simulierten Daten.

Zuerst wird der anzupassenden Variablen ein Startwert gegeben, dann errechnet das Programm die simulierten Ergebnisse und vergleicht diese mit den experimentellen Daten. Nach einer kompletten Simulation mit den gegebenen Startwerten (*para\_0*, *I\_0*, *cx\_0*, usw.) wird das Funktional *J*, also der kumulierte quadratische Fehler zwischen den experimentellen und simulierten Daten mit Hilfe der Matlab-Funktion *'residuals'* berechnet. Dieses Funktional soll in Abhängigkeit von den zu schätzenden Parametern minimiert werden (*'estimate'*). Dazu bedient man sich einer in Matlab implementierten Optimierungsfunktion (*'fminsearch'*), in der nach einer Suchstrategie ein neuer Parametervektor aus den zurückliegenden Parameter- und Funktionalwerten ermittelt wird.

Mit dem neu bestimmten Parametervektor geht es dann erneut in den Simulationsblock, bis der Algorithmus eine zufriedenstellende Konvergenz erreicht hat. Anschließend werden die Ergebnisse der Simulation gespeichert und können graphisch dargestellt werden (*'dataplot'*).

### 3.4.6 Sensitivitätsfunktion

Die Genauigkeit der Schätzung zeigt die Qualität des Modells. Unpräzise bestimmte und zu viele Parameter können zu Ungenauigkeiten und linearen Abhängigkeiten führen, was zu falschen biologischen Interpretationen führen kann. Ferner werden eventuelle Modellfehler verschleiert. Es können nur jene Parameter richtig geschätzt werden, die einen Einfluss auf die Ausgangsgröße haben, aber nicht durch andere Parameter kompensiert werden. Es ist möglich, dass ein Parameter überschätzt wurde und ein anderer unterschätzt, diese Fehler aber auf das System keine Auswirkung haben. Für eine erste Beurteilung der Güte der Parameterschätzung können die Sensitivitätsfunktionen

$$\frac{\partial X}{\partial P} = \frac{c(P^+, X, t) - c(P^-, X, t)}{c(P, X, t)} \cdot \frac{P}{\Delta} \quad (3.22)$$

herangezogen werden.

Die Anfangsbedingung lautet wie folgt:

$$X_p(0) = \frac{\partial x_0}{\partial p} \quad (3.23)$$

Sie berechnet die Auswirkungen auf die Ausgangsgrößen bei kleinen Änderungen der Parameterwerte. Sind die Sensitivitäten klein, haben schon kleine Messfehler große Auswirkungen auf die entsprechenden Parameter, weil diese kaum in das Simulationsergebnis eingehen. Aber auch große Sensitivitäten schließen Modellfehler nicht aus. Zeigen zwei Sensitivitätsfunktionen ähnliches Verhalten, sind sie linear zu einander abhängig und können nicht unterschieden bzw. geschätzt werden.

Weitaus aussagekräftiger sind die Eigenvektoren der Fisher-Informationsmatrix  $\vec{F}$

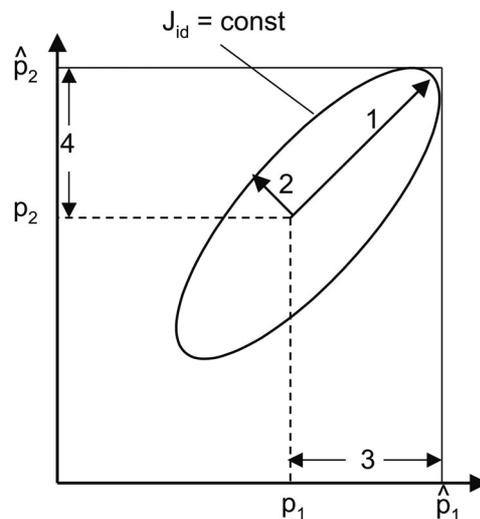
$$\vec{F} = \sum_{i=1}^n \vec{Y}_p^T(t_i) \cdot \vec{C}^{-1} \cdot \vec{Y}_p(t_i), \quad (3.24)$$

welche die Inverse der Parameterschätzfehlerkovarianzmatrix  $C$  ist.

$Y_p$  ist die Ausgangsmatrix der Sensitivitäten. Eine Veranschaulichung bietet das Gütefunktional  $J_{id}$ , das durch die Gewichtung der Inversen der Messfehlerkovarianzmatrix  $C$  und der quadrierten Fehler  $e_i$  gebildet wird.

$$J_{id}(p) = \sum_{i=1}^n \vec{e}_i^T \cdot \vec{C}^{-1} \cdot \vec{e}_i \quad (3.25)$$

Die Linien konstanter Werte von  $J_{id}$  sind Ellipsen. Die Längen der Halbachsen der Ellipsen sind umgekehrt proportional zu den Quadratwurzeln der Eigenwerte der Matrix  $F$  (Strecke 1,2 in Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6:** Kontur des Identifikationsfunktionals  $J_{id}$ . Die Längen der Halbachsen der Ellipsen sind umgekehrt proportional zu den Quadratwurzeln der Eigenwerte der Matrix  $F$  (Strecke 1,2).

Ihre Richtungen sind durch die zugehörigen Eigenvektoren gegeben. Die Länge der größeren Halbachse (Strecke 1) ist der Standardabweichung  $\sigma_{p_1, p_2}$  bezüglich der Schätzgenauigkeit dieser Parameterkombination proportional. Der Wert kann als Maß für die Güte der Schätzung dieser Parameterkombination dienen. Ein großer Wert (im Verhältnis zum Eigenwert) bedeutet, dass die Ellipse sehr lang gezogen ist. Es besteht dann eine (nahezu) lineare Abhängigkeit zwischen diesen Parametern, die deshalb schlecht zu identifizieren sind. Die Quadratwurzeln der Hauptdiagonale der Matrix sind proportional zu den Abweichungen der einzelnen Parameterschätzung. Der kleinste Eigenwert  $\lambda_{\min}$  gibt die größtmögliche Ungenauigkeit der Schätzung an. Infolgedessen sollte durch geeignete Modellierung der kleinste Eigenwert erhöht werden, um eine größere Schätzgenauigkeit zu erzielen.

Die Standardabweichung ist gegeben durch

$$\sigma_p = \frac{1}{\sqrt{\lambda_{\min}}} \quad (3.26)$$

Das Modell wurde mit Hilfe der beschriebenen Sensitivitätsfunktionen auf seine Robustheit getestet und damit validiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zielsetzung der experimentellen Untersuchungen

Das Sammeln von Informationen zu den von der Alge produzierten Makromolekülen und deren Bildungsmechanismen war einer der Schwerpunkte der Arbeit. Daher war es zum einen erforderlich, eine Reihe von Kultivierungen der Alge unter genau definierten und reproduzierbaren Bedingungen durchzuführen. Zum anderen mussten zum Teil neue Bestimmungsmethoden etabliert werden, um die gewünschten Informationen gewinnen zu können.

Parallel zu den experimentellen Untersuchungen wurde das mathematische Modell von Wachstum und Produktbildung der Alge mit Hilfe der Messergebnisse weiterentwickelt. Dieses Modell soll zu einem besseren Verständnis der in der Alge ablaufenden Mechanismen führen und in Zukunft Vorhersagen zum Verhalten der Alge unter spezifischen Bedingungen – wie z.B. in einer Produktionsanlage - erlauben.

Die im Verlauf der Arbeit durchgeführten Kultivierungen hatten zum Teil unterschiedliche Ziele, d.h. dass je nach Kultivierungsverlauf und Randbedingungen bestimmte Eigenschaften der Alge und deren Produkte untersucht wurden. Die wesentlichen Versuchstypen sind in der Folge dargestellt.

#### Kontinuierliche Beleuchtung

Bei der Realisierung von Versuchen mit Dauerbeleuchtung wurden stationäre Zustände bei unterschiedlichen Lichtintensitäten gefahren. Dabei sollte in Abhängigkeit von der Lichtintensität das stationäre Verhalten der Makromoleküle untersucht werden. Begleitend dazu wurden Kultivierungen mit sprungartiger Änderung der Lichtintensität durchgeführt. Damit sollte das dynamische Verhalten der unterschiedlichen Makromoleküle der Mikroalgen beobachtbar gemacht und dann in das mathematische Modell integriert werden.

### Zyklen

Mit so genannten Hell-Dunkel-Zyklen unterschiedlicher Periodendauer sollten Auskünfte über die möglichen Einflüsse von zyklischen Helligkeitsschwankungen auf das Wachstum und die Produktbildung der Mikroalgen gewonnen werden. Aufgrund der abnehmenden Eindringtiefe des Lichts mit zunehmender Zelldichte entstehen in Produktionsanlagen unvermeidliche Lichtgradienten, die im Zusammenwirken mit Turbulenzen der Flüssigphase zu Hell-Dunkel-Zyklen im Bereich von Sekunden bis Millisekunden führen. Parallel dazu wurden Hell-Dunkel-Kultivierungen im Stunden-Bereich durchgeführt. Diese Kultivierungen sollten in erster Linie nähere Informationen über die Photosynthese bzw. über die Atmung bei der untersuchten Mikroalge liefern. Diese Zyklendauer tritt ebenfalls in industriellen Anlagen auf, z.B. bei der Anwendung offener Kultivierungssysteme.

### Bildungskinetik der Makromoleküle

Zusätzliche Kultivierungen wurden durchgeführt, um gezielt biologische Hypothesen zur Regelung der Bildung der Makromoleküle zu überprüfen. Hierbei wurde insbesondere der Bildungsmechanismus der Polysaccharide untersucht.

## 4.2 Kultivierung der Mikroalge *P. purpureum*

### 4.2.1 Kultivierungsverlauf

Die meisten der durchgeführten Kultivierungen wiesen einen ähnlichen zeitlichen Ablauf und vergleichbare Kultivierungsparameter auf. Die Mikroalgen wurden bei einer konstanten Temperatur von 20 °C und einem pH-Wert von 7,6 kultiviert und mit einer 2,5%igen Luft-Kohlendioxid-Mischung begast. Nach dem Überimpfen der Mikroalgen in den Reaktor erfolgte jeweils eine Batch-Phase mit exponentiellem Wachstum der Algen bis zum Erreichen einer gewünschten Soll-Zellkonzentration von 0,2 g l<sup>-1</sup>.

Die Soll-Zellkonzentration im Reaktor wurde so gewählt, dass einerseits eine homogene Lichtverteilung ohne gegenseitige Abschattungseffekte der Mikroalgen gewährleistet wird, andererseits sollte die vorhandene Zellkonzentration ausreichend groß sein, um mit den verwendeten offline-Bestimmungsmethoden vernünftige und reproduzierbare Werte erhalten zu können.

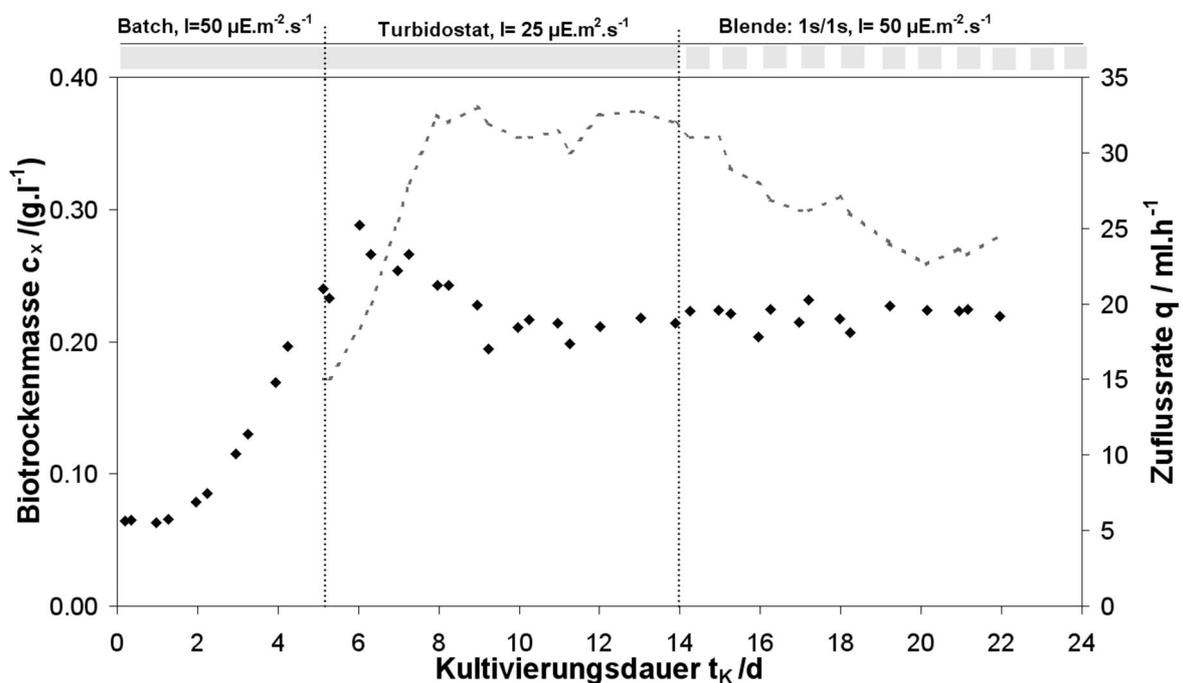
Nach dem Ende der Batch-Phase (und dem Erreichen der Soll-Zellkonzentration) wurde der Reaktor im Turbidostat-Betrieb gefahren. Dabei wurde in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen die Zuflussrate so eingestellt, dass die eingestellte Zellkonzentration konstant blieb, und die spezifische Wachstumsrate der Verdünnungsrate entsprach. Die detaillierte Beschreibung der Realisierung dieses Turbidostat-Betriebs befindet sich in Kapitel 3.

Die Lichtintensität wurde während des Übergangs von der Batch-Phase zur kontinuierlichen Phase (Turbidostat) in den meisten Fällen konstant gehalten. Hiermit sollte eine Überschneidung der physiologischen Antwort der Mikroalgen auf den Wechsel der Betriebsarten mit der Antwort infolge einer Lichtintensitätsänderung vermieden werden.

Im ersten Abschnitt der kontinuierlichen Phase wurde gewartet, bis ein stationärer Zustand der interessierenden Makromoleküle erreicht wurde. Im zweiten Abschnitt der kontinuierlichen Phase wurde dann je nach Ziel der Kultivierung entweder die Lichtquantität oder die Lichtqualität gezielt verändert.

Mit Hilfe von zwei Kultivierungen sollen nun beispielhaft zum einen die durchgeführten Kultivierungen in ihren Einzelheiten dargestellt werden. Zum anderen wird die Auswertung dieser Kultivierungen vorgestellt, die auch bei allen anderen Kultivierungen angewendet wurde. Hierbei sollen auch die grundsätzlichen Verläufe der unterschiedlichen offline bestimmten Makromoleküle beschrieben werden.

In diesem Abschnitt sollen ausschließlich die unterschiedlichen Kurvenverläufe analysiert werden. Die Einflüsse der jeweils realisierten Lichtqualitäten und Lichtquantitäten auf das Wachstum und die Produktbildung der Mikroalge werden in den nächsten Abschnitten im Zusammenhang mit anderen Kultivierungen verglichen und interpretiert. Ausgewählt wurden zwei Kultivierungen, in deren Verlauf der Einfluss von Hell-Dunkel-Zyklen untersucht wurde. Bei der ersten Kultivierung wurde die Wirkung eines Zyklus mit einer Periodendauer von 1s/1s untersucht. Die Dauer der erwähnten Kultivierung betrug insgesamt 23 Tage. Die Kultivierung lässt sich in drei Phasen unterteilen. In der ersten Phase wurden die Mikroalgen im Batch-Betrieb kultiviert, danach wurde die kontinuierliche Phase gestartet. Der zeitliche Verlauf der ermittelten Biotrockenmassenkonzentration ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

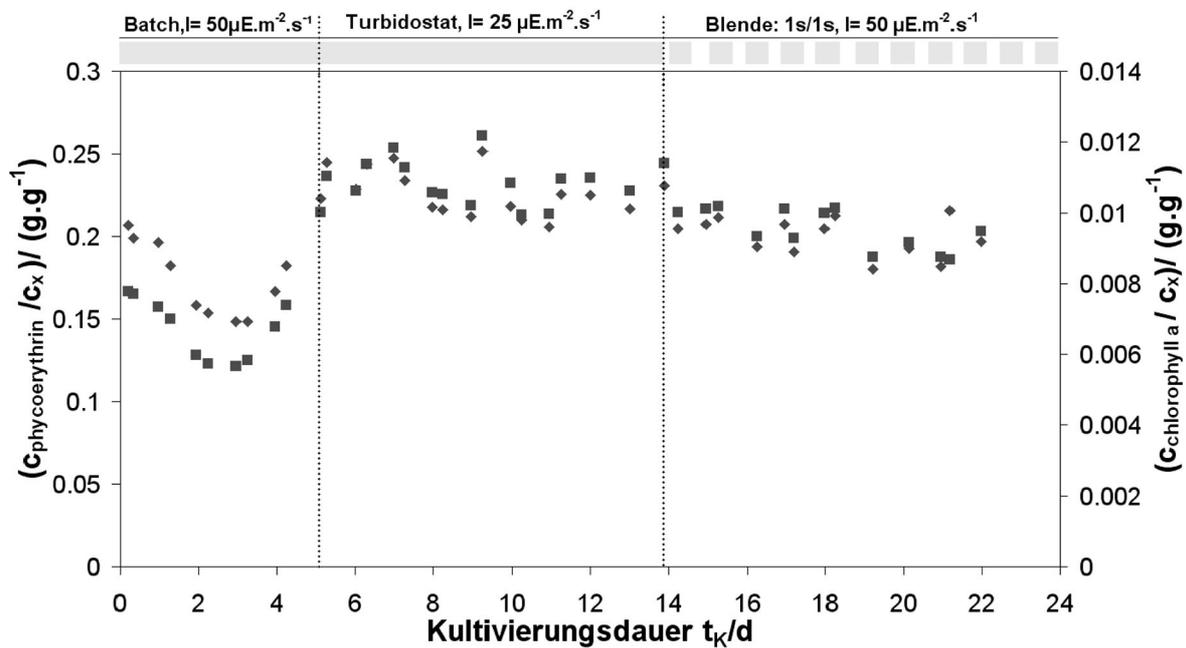


**Abbildung 4.1:** Verlauf der Biotrockenmassenkonzentration (◆) und der Zuflussrate (--) während einer Kultivierung der Mikroalge *Porphyridium purpureum*, bei der der Einfluss eines Hell-Dunkel-Zyklus (1s/1s) untersucht wurde. Der kontinuierliche Betrieb folgt im Anschluss an ein exponentielles Wachstum der Mikroalgen. Im Verlauf einer dritten Phase wurde jeweils die Lichtquantität oder die Lichtqualität verändert.

Die Biotrockenmassenkonzentration nahm nach einer Lag-Phase von zwei Tagen exponentiell zu. Hierbei betrug die spezifische Wachstumsrate  $\mu = 0,376 \text{ d}^{-1}$ . Ein lineares Wachstum würde aufgrund von gegenseitigen Abschattungseffekten der vorhandenen Mikroalgen hervorgerufen werden, dies traf bei den durchgeführten Kultivierungen jedoch nicht zu. Nach dem Erreichen der gewünschten Biotrockenmassenkonzentration ( $0,2 \text{ g l}^{-1}$ ) wurde der kontinuierliche Betrieb (Turbidostat) gestartet. Diese Umschaltung äußerte sich in einem Anstieg der Biotrockenmassenkonzentration. Am vierten Kultivierungstag wurde der Regler, der für die Regelung der Zuflussrate zuständig ist, eingeschaltet. Ein Überschwingverhalten des Reglers führte dabei zu einer Erhöhung der Biotrockenmassenkonzentration. Ab dem neunten Kultivierungstag bis zum Ende der Kultivierung glichen sich die geregelte Verdünnungsrate und das spezifische Wachstum der Mikroalgen aus, wodurch eine nahezu konstante Biotrockenmassenkonzentration erreicht wurde. Innerhalb der ersten drei Tage der kontinuierlichen Phase stieg die spezifische Wachstumsrate von  $0,12$  auf  $0,25 \text{ d}^{-1}$ , danach blieb sie konstant bis zum Starten des Hell-Dunkel-Zyklus.

Bei der Veränderung der Lichtqualität stellte sich dann eine ermittelte spezifische Wachstumsrate von  $\mu=0,2 \text{ d}^{-1}$  bis zum Ende der Kultivierung ein. Die Wirkung der Veränderung der Betriebsart und der Lichtqualität auf die produzierten Makromoleküle werden an den Beispielen der Pigmente und der Polysaccharide in den nächsten zwei Diagrammen beschrieben.

In Abbildung 4.2 sind die ermittelten spezifischen Pigmentgehalte bei dieser Kultivierung dargestellt.



**Abbildung 4.2:** Spezifische Pigmentgehalte von Reaktionszentrenpigment Chlorophyll a (◆) und Antennenpigment Phycoerythrin (■) im Verlauf einer Kultivierung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* für unterschiedliche Lichtqualitäten und -quantitäten. Eine Abnahme der spezifischen Pigmentgehalte charakterisiert den Anfang der Batch-Phase. Die zweite Phase des kontinuierlichen Betriebs wird von einer leichten Abnahme der spezifischen Pigmentgehalte begleitet.

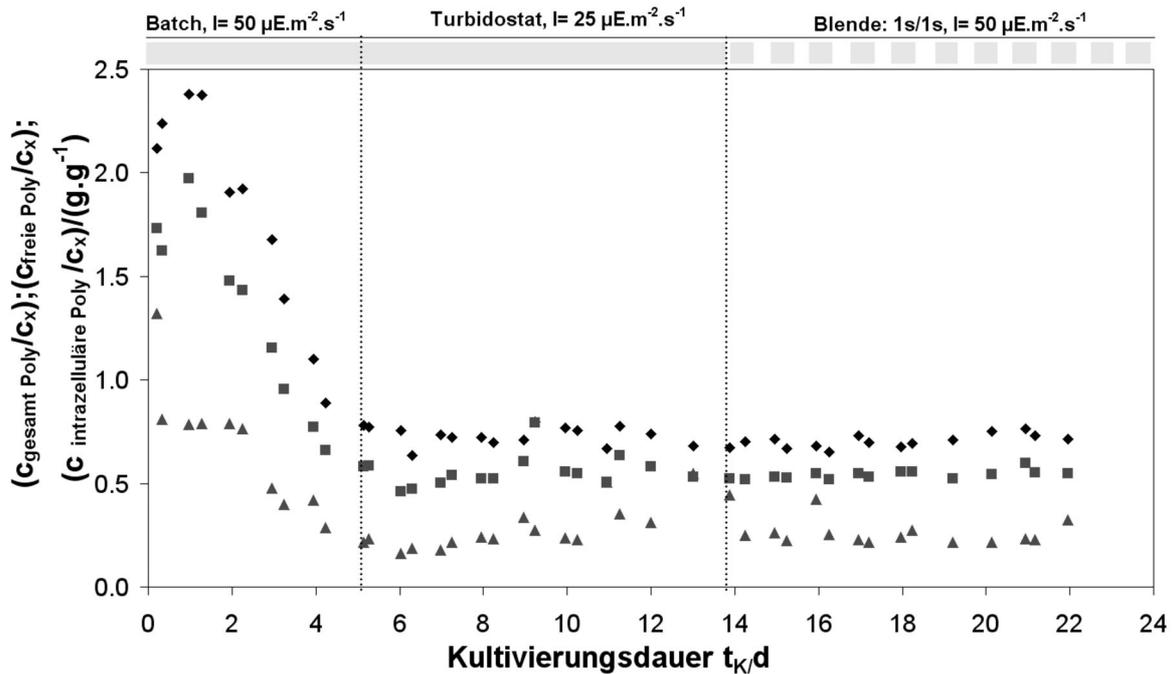
Der auffällige Verlauf des spezifischen Pigmentgehalts innerhalb der Batch-Phase (Fallen und anschließendes Ansteigen) erwies sich als typisch. Er wurde bei allen durchgeführten Kultivierungen wieder gefunden. Dieser Verlauf lässt sich dadurch erklären, dass am Anfang der Batch-Phase die relative Zunahme der Pigmente langsamer als die Zunahme der Zellmasse verläuft. Dies führt zu einer Abnahme des spezifischen Pigmentgehalts. Dann folgte eine Umkehrung des Verhaltens: Nach dem dritten Tag der Kultivierung übersteigt die Zunahme der Pigmente die der Zellmasse. Mit zunehmender Lichtintensität war die Dauer dieses Wechsels des Verhaltens der Mikroalgen immer größer und der dabei erreichte minimale Pigmentgehalt lag immer tiefer. Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

**Tabelle 4.1:** Tabellarische Darstellung der Ergebnisse von vier Batch-Kultivierungen mit unterschiedlichen Photonenflussdichten bezüglich des Verhaltens des spezifischen Pigmentgehalts. Betrachtet wurden die Dauer der Abnahme der spezifischen Pigmentgehalte sowie die dabei erreichten minimalen Werte.

Lichtintensität / $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	10	25	50	72
Zeit / $\text{d}^{-1}$	1,8	2,5	3,0	3,7
Minimaler spezifischer Phycoerythringehalt / $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0,150	0,140	0,125	0,109

Dieses Verhalten trifft sowohl auf die Pigmente des Reaktionszentrums Chlorophyll a als auch auf das Antennenpigment Phycoerythrin zu. Die Abnahme des minimalen spezifischen Pigmentgehalts mit zunehmender Lichtintensität deutet auf eine immer langsamere Zunahme der Pigmente im Vergleich zur Zunahme der Zellmasse mit zunehmender Lichtintensität am Anfang der Batch-Phase hin. Die Kultivierungsdauer, bei der die Zellmasse den relativen Pigmentgehalt übersteigt, nimmt mit zunehmender Lichtintensität zu. Bei einer Lichtintensität von  $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  betrug diese Dauer 1,8 Tage, dagegen verlängerte sie sich auf bis zu 3,7 Tage bei einer Lichtintensität von  $72 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Mit zunehmender Lichtintensität scheinen die Mikroalgen demnach am Anfang der Batch-Phase die Zunahme ihrer Zellmasse gegenüber der Zunahme ihrer Pigmente zu bevorzugen.

Die Polysaccharide stellen eine weitere Gruppe von funktionalen Makromolekülen dar, die detailliert untersucht wurden. In Abbildung 4.3 ist der Verlauf sowohl der extrazellulären Polysaccharide (unterschieden wird in diesem Fall zwischen den freien, also den im Nährmedium gelösten Polysacchariden und den gebundenen Polysacchariden, die eine Schutzhülle um die Zellmembran bilden) als auch der intrazellulären Polysaccharide für die durchgeführte Kultivierung dargestellt.



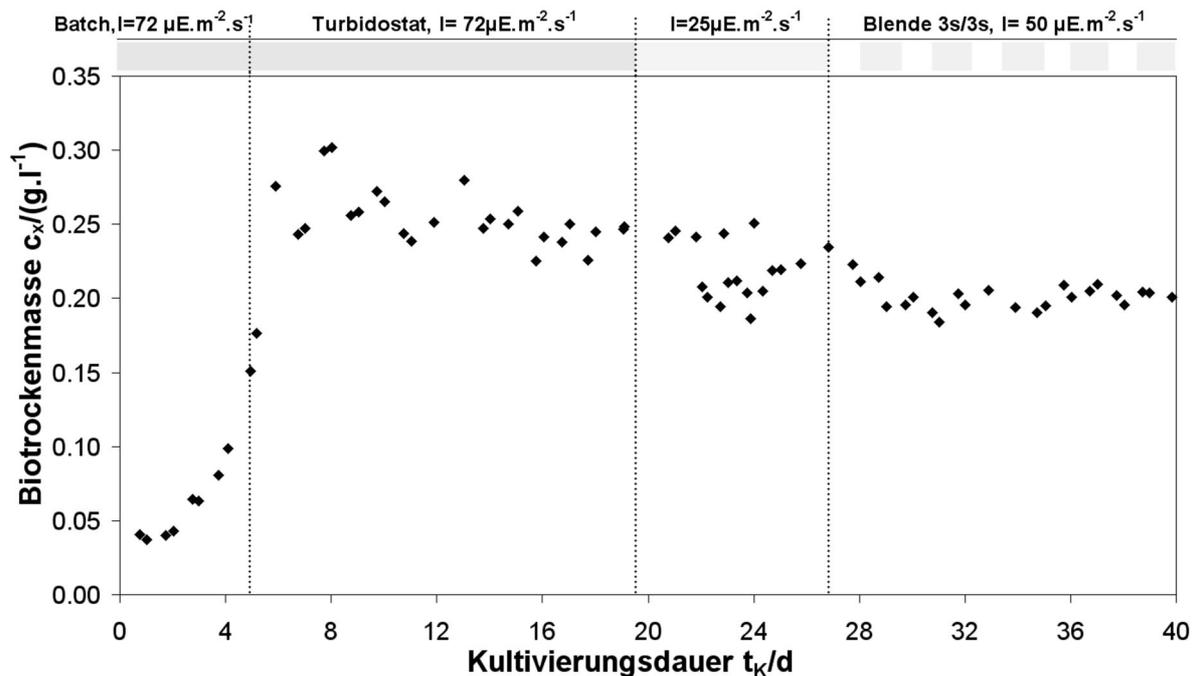
**Abbildung 4.3:** Spezifische Polysaccharidgehalte: spezifischer Gesamtpolysaccharidgehalt (◆); spezifischer freier Polysaccharidgehalt (■) und intrazellulärer Polysaccharidgehalt (▲) für die drei Kultivierungsphasen einer Kultivierung der Mikroalge *Porphyridium purpureum*. Die hier dargestellten Kurvenverläufe charakterisieren alle erzielten Ergebnisse zu den Polysacchariden unabhängig von der eingestellten Lichtqualität oder -quantität.

Innerhalb der Batch-Phase war die spezifische Wachstumsrate relativ gesehen größer als alle drei ermittelten spezifischen Polysaccharidbildungsraten, was zu einer Abnahme der jeweiligen spezifischen Polysaccharidgehalte führte. Bei der Umschaltung in die kontinuierliche Phase blieb der spezifische Polysaccharidgehalt nahezu konstant.

Die Veränderung der Lichtqualität verursachte keine Veränderung des Verhaltens der Polysaccharide. Dieses Verhalten wurde nicht nur in dieser Kultivierung beobachtet, es wurde bei allen während dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen wieder gefunden. Dieses von der Lichtqualität und Lichtquantität unabhängige Verhalten des spezifischen Polysaccharidgehalts wird in einem separaten Abschnitt (4.3) erläutert.

Mittels der Präsentation der Ergebnisse einer zweiten Kultivierung werden die Verläufe von zusätzlichen Makromolekülen, sowie spezielle Eigenschaften der zu untersuchenden Mikroalge vorgestellt. Diese zweite Kultivierung dauerte insgesamt 40 Tage. Dabei wurde sowohl die Lichtqualität als auch die Lichtquantität variiert.

Die Abbildung 4.4 stellt den Verlauf der Biotrockenmassenkonzentration dar.



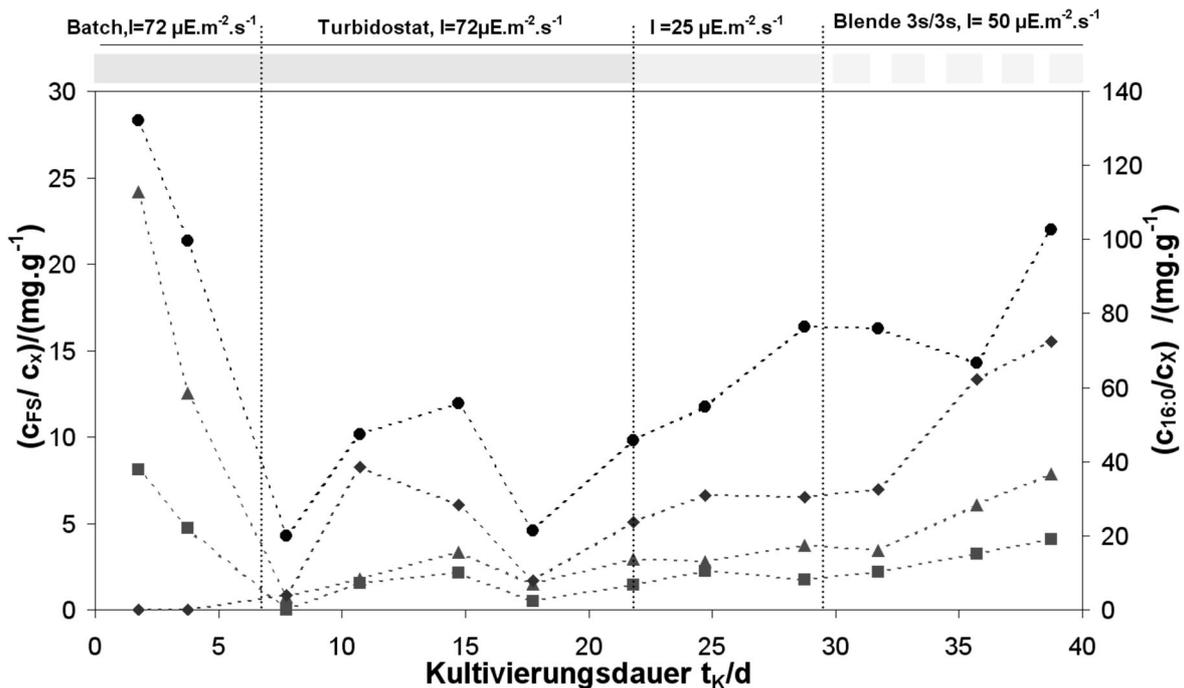
**Abbildung 4.4:** Verlauf der Biotrockenmassenkonzentration während einer zweiten Kultivierung der Mikroalge *Porphyridium purpureum*, bei der der Einfluss eines Hell-Dunkel-Zyklus (3s/3s) untersucht wurde. Die Kultivierungsbedingungen wurden beim Übergang von Batch- auf Turbidostat-Betrieb beibehalten, um eine Überlappung mit der physiologischen Antwort der Mikroalgen zu vermeiden.

Bevor bei dieser Kultivierung ein exponentielles Wachstum mit einer spezifischen Wachstumsrate von  $\mu=0,46 d^{-1}$  erreicht wurde, sank die Biotrockenmassenkonzentration zuerst innerhalb der ersten zwei Tage der Kultivierung ab. Diese Absenkung der Biotrockenmassenkonzentration in der Lag-Phase wurde bei mehreren Kultivierungen beobachtet. Mikroskopische Aufnahmen der Mikroalgen zeigen, dass die Mikroalgen nach dem Animpfen des Reaktors Zellaggregate bilden. Diese Struktur der Mikroalgen konnte dann jeweils ein bis zwei Tage lang beobachtet werden. Diese mikroskopische Beobachtung könnte eine Erklärung der Absenkung der Biotrockenmassenkonzentration sein, da zu deren Ermittlung eine spektrometrische Bestimmungsmethode verwendet wurde, die auf Streueffekten

beruht. Die Bestimmungsmethode verursacht daher wahrscheinlich eine Verfälschung der gemessenen Biotrockenmassenkonzentration während der ersten Tage der Kultivierung.

Ein weiteres kommerziell sehr interessantes Produkt der Mikroalge *P. purpureum* sind die Fettsäuren.

In Abbildung 4.5 ist der Verlauf der spezifischen Konzentrationen von vier Fettsäuren der Mikroalge *P. purpureum* dargestellt.



**Abbildung 4.5:** Verlauf der spezifischen Konzentrationen der vier am meisten gebildeten Fettsäuren der Mikroalgen *Porphyridium purpureum*: Palmitinsäure C16:0 (●), Linolsäure C18:2 (▲), Arachidonsäure C20:4 (■) und Eicosapentaensäure C20:5 (◆) während der Kultivierung mit dem Hell-Dunkel-Zyklus 3s/3s. Die hier ermittelten Fettsäuren wurden mittels GC-MS bestimmt.

Während des Batch-Betriebs ist ein Absinken der spezifischen Konzentrationen fast aller ermittelten Fettsäuren zu erkennen. Die Bildungsrate von Palmitinsäure (C16:0) betrug  $-18,8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , die von Linolsäure (C18:2)  $-3,76 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  und die von Arachidonsäure (C20:4)  $-1,33 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . Nur bei C20:5 konnte ein Anstieg der spezifischen Konzentration mit einer Rate von  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  beobachtet werden. Nach dem Absenken der Lichtintensität von  $72$  auf  $25 \text{ }\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  wurde dann ein Anstieg der spezifischen Fettsäurenkonzentrationen festgestellt. Der Einsatz der

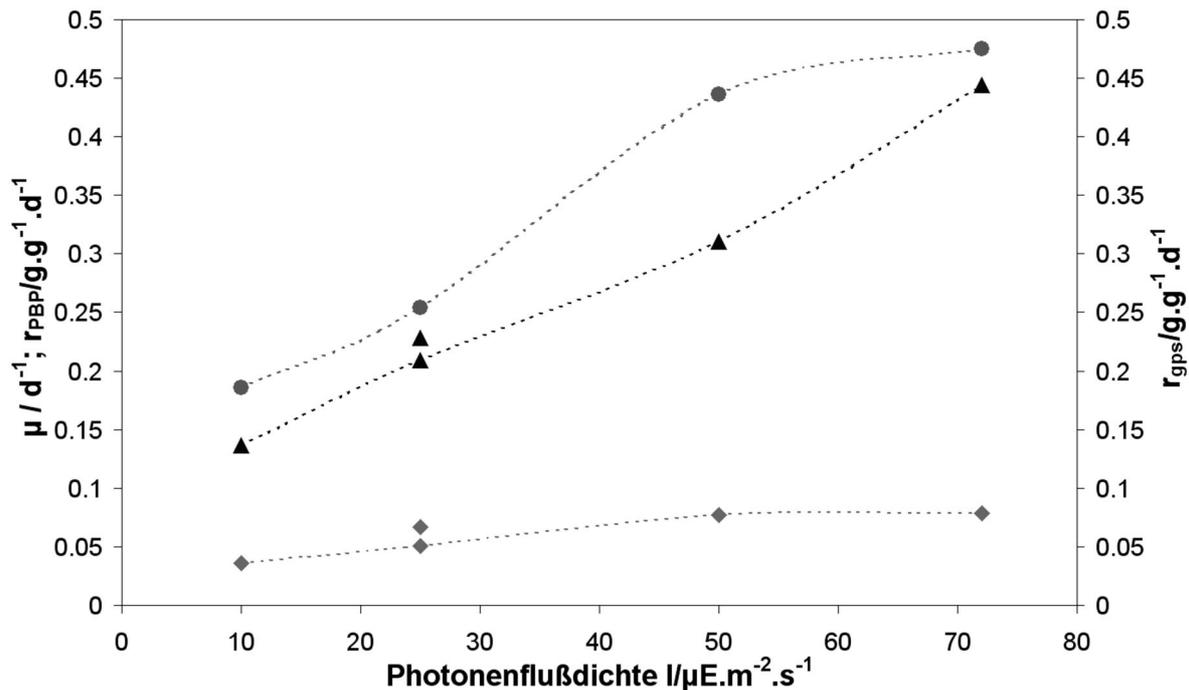
Blende nach 30 Kultivierungstagen veränderte die Bildungsraten der Fettsäuren kaum und sorgte für ein weiteres Ansteigen der Konzentrationen aller Fettsäuren.

Nachdem exemplarisch zwei Kultivierungsverläufe präsentiert wurden, werden nun die Ergebnisse zum Einfluss der Lichtqualität und Lichtquantität vorgestellt. Die Ergebnisse stellen dabei die Mittelwertbildung über die zweite kontinuierliche Phase dar. Für alle untersuchten Veränderungen wurde eine Kultivierung mit einer Länge von durchschnittlich 23 Tagen durchgeführt.

#### **4.2.2 Experimente zum Einfluss der Dauerbeleuchtung**

Der Einfluss unterschiedlicher Lichtintensitäten auf Wachstum und Produktbildung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* wurde sowohl für den Batch- als auch für den kontinuierlichen Betrieb des Reaktors untersucht. Die eingestellten Lichtintensitäten, die zwischen  $10$  und  $80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  lagen, stellen laut Literaturangaben Werte im Schwachlichtbereich dar. Dieser Bereich ist durch den linearen Bereich der photosynthetischen Lichtkurve gekennzeichnet (Abschnitt 2.3.1), in dem alle absorbierten Photonen zu einer erfolgreichen Umsetzung der Lichtenergie in chemische Energie führen.

Die gewonnenen Ergebnisse wurden verwendet, um das mathematische Modell zu verfeinern. Die experimentellen Ergebnisse der unterschiedlichen Makromoleküle sind in Diagramm 4.6 in Abhängigkeit von der Lichtintensität für den kontinuierlichen Betrieb dargestellt.



**Abbildung 4.6:** Experimentell ermittelte spezifische Wachstumsraten (▲) und Produktbildungsrate - Phycoerythrinbildungsrate (◆) sowie Gesamtpolysaccharidbildungsrate (●) für die Rotalge *Porphyridium purpureum* während kontinuierlicher Kultivierungen in Abhängigkeit von der Photonenflußdichte. Alle dargestellten Punkte stellen den Mittelwert einer Kultivierungsphase mit einer Dauer von mindestens zehn Tagen dar. Um diese Ergebnisse zu erhalten, wurden Kultivierungen mit einer durchschnittlichen Dauer von dreiundzwanzig Tagen durchgeführt. Die zusätzlichen Messpunkte stammen von einer zweiten Kultivierung, die unter identischen Bedingungen durchgeführt wurde. Sie sind ein Beleg für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Die graphische Darstellung der hier vorgestellten Makromoleküle zeigt in allen drei Fällen eine ähnliche Linearabhängigkeit bezüglich der Photonenflußdichte. Mit zunehmender Lichtintensität wurde eine lineare Zunahme der spezifischen Wachstumsrate ( $\mu$ ), der spezifischen Phycoerythrinbildungsrate ( $r_{\text{PBP}}$ ) und auch der spezifischen Gesamtpolysaccharidbildungsrate ( $r_{\text{gps}}$ ) beobachtet.

Die Linearabhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate kennzeichnet ein lichtlimitiertes Verhalten der Mikroalgen. Dies äußert sich durch eine ständige Zunahme der spezifischen Phycoerythrinbildungsrate. Mit einer linearen Anpassung der experimentell ermittelten spezifischen Wachstumsrate ergibt sich ein Erhaltungsstoffwechsel von  $0,09 \text{ d}^{-1}$ . Mit den erzielten Kultivierungsergebnissen war es nicht möglich, einen Lichtkompensationspunkt graphisch zu bestimmen. Die in der

Literatur zu findenden Lichtkompensationspunkte resultieren aus der Annahme, dass im Schwachlichtbereich eine lineare Abhängigkeit zwischen der spezifischen Wachstumsrate und der Photonenflussdichte vorhanden ist. Dabei sind kaum experimentelle Daten in diesem Bereich vorhanden, die diese Annahme bestätigen könnten, da die kleinste in der Literatur zu findende Photonenflussdichte bei  $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  liegt. Deswegen ist nicht auszuschließen, dass eine andere Abhängigkeit diese beiden Größen verbinden könnte.

Zusätzlich wurde das Verhalten der Zusammensetzung der vier am meisten gebildeten Fettsäuren der Mikroalge *Porphyridium purpureum* in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

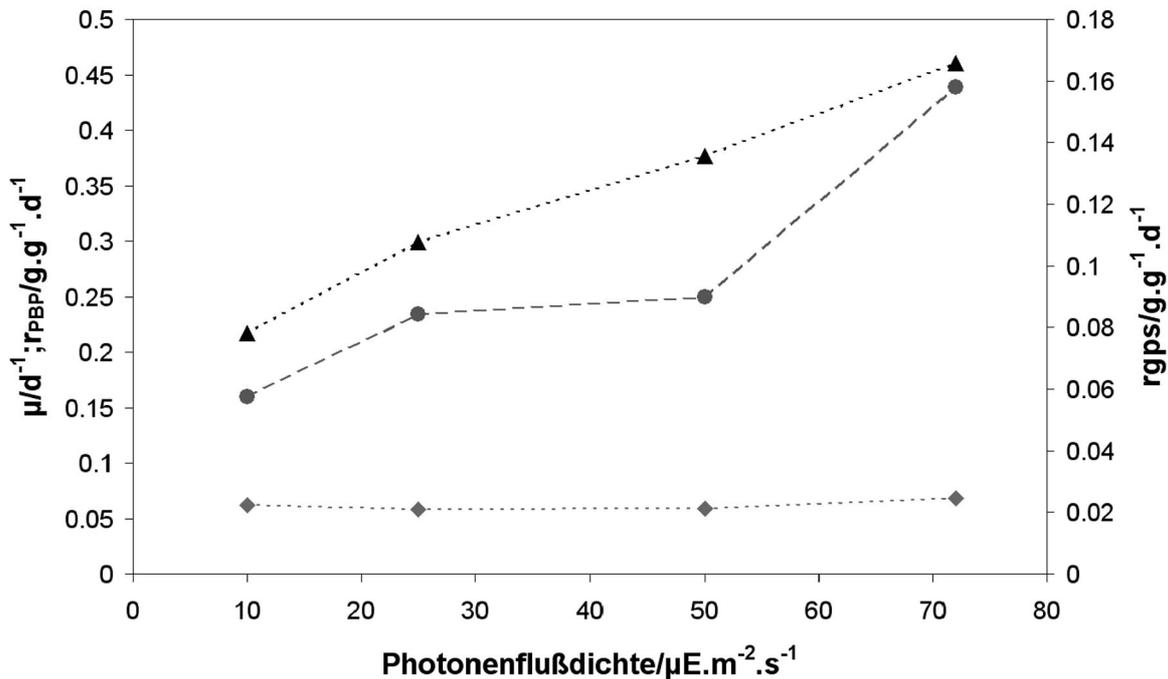
**Tabelle 4.2:** Abhängigkeit der spezifischen Bildungsrate der vier häufigsten Fettsäuren der Mikroalge *Porphyridium purpureum* von der Photonenflussdichte für drei kontinuierlich durchgeführte Kultivierungen

Fettsäure	$25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$72 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
C16:0 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	21,21	20,20	17,70
C18:2 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	2,58	1,80	1,40
C20:4 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	1,05	0,87	0,61
C20:5 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	2,25	2,31	2,42

Mit Hilfe der neu eingeführten Bestimmungsmethode war es trotz der kleinen Zellkonzentration und der kleinen zu bearbeitenden Volumina möglich, die Zusammensetzung der vorhandenen Fettsäuren der Mikroalge *Porphyridium purpureum* zu bestimmen.

Erkennbar ist die Abnahme der spezifischen Bildungsrate von Palmitinsäure (C16:0), von Linolsäure (C18:2) und von Arachidonsäure (C20:4) mit zunehmender Lichtintensität. Im Gegenzug bewirkt eine Zunahme der Photonenflussdichte eine Zunahme der spezifischen Rate von Eicosapentaensäure (C20:5).

Das gleiche Experiment wurde für den Batch-Betrieb durchgeführt, die dabei gewonnenen offline-Größen sind in Abbildung 4.7 dargestellt.



**Abbildung 4.7:** Experimentell ermittelte spezifische Wachstumsraten (▲), spezifische Phycoerythrinbildungsrate (◆) und spezifische Polysaccharidbildungsrate (●) für die Rotalge *Porphyridium purpureum* während Batch-Kultivierungen in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte. Die Batch-Phase ist durch die exponentielle Zunahme der Mikroalgen charakterisiert.

Die beobachtete lineare Abhängigkeit der unterschiedlichen Makromoleküle von der eingestellten Photonenflussdichte ist ebenso im Fall von Batch-Kultivierungen vorhanden. Im Batch-Betrieb wurde insgesamt für alle eingestellten Lichtintensitäten eine größere spezifische Wachstumsrate als im kontinuierlichen Betrieb ermittelt. Festgestellt wurde ebenso eine deutliche Veränderung der spezifischen Polysaccharidbildungsrate zwischen den beiden betrachteten Betriebsarten. Exemplarisch sind in Tabelle 4.3 die Ergebnisse einer Kultivierung für die spezifische Wachstumsrate und die spezifische Gesamtpolysaccharidbildungsrate dargestellt.

**Tabelle 4.3:** Spezifische Wachstumsrate und spezifische Gesamtpolysaccharidbildungsrate für Batch- und Turbidostat-Kultivierung bei gleicher Photonenflussdichte.

	25 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ /Batch	25 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ /Turbidostat
$\mu / \text{d}^{-1}$	0,299	0,209
$r_{\text{gps}} / \text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	0,084	0,254

Ein Faktor von 2,5 bis 3 liegt bei identischer Lichtintensität zwischen der ermittelten spezifischen Bildungsrate von Polysacchariden im Batch- und im kontinuierlichen Betrieb. Die Abnahme der spezifischen Wachstumsrate könnte aufgrund der starken Zunahme der spezifischen Polysaccharidbildungsrate hervorgerufen werden. Diese Annahme wurde mittels experimenteller Versuche untersucht, die dabei gewonnenen Ergebnisse sind in Abschnitt 4.3 zu entnehmen.

### 4.2.3 Experimente zum Einfluss von Hell-Dunkel-Zyklen

#### 4.2.3.1 Zyklen im Millisekunden-Bereich

Im Rahmen der Arbeit wurden zwei Kultivierungen mit sehr kurzen Zyklen durchgeführt. Realisiert wurden diese kurzen Hell- und Dunkelphasen mittels einer rotierenden geschlitzten Scheibe. Der Aufbau der Lichteinrichtung ist in Anhang A 3 beschrieben. Der Einfluss der beiden untersuchten Frequenzen 10 Hz und 20 Hz auf das Wachstum und die Produktbildung der Mikroalgen ist in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

**Tabelle 4.4:** Spezifische Bildungsraten der offline bestimmten Größen für die beiden Kultivierungen mit kurzen Zyklendauern im Bereich von Millisekunden, realisiert durch den Einsatz einer rotierenden Scheibe

Offline-Messwerte	Zyklusdauer 10 Hz	Zyklusdauer 20 Hz
$\mu / \text{d}^{-1}$	0,017	0,061
$r_{\text{PBP}} / \text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	0,037	0,015
$r_{\text{chla}} / \text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	$1,6\cdot 10^{-4}$	$6,1\cdot 10^{-4}$
$r_{\text{gps}} / \text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	0,025	0,305
$r_{\text{fps}} / \text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	0,001	0,022

Erkennbar sind bei beiden durchgeführten Kultivierungen die sehr kleinen spezifischen Wachstumsraten sowie die sehr geringe errechnete spezifische Pigmentbildungsrate. Diese Ergebnisse konnten durch mikroskopische Beobachtung schon nach nur zweitägigem Einsatz der rotierenden Scheibe festgestellt werden. Die mikroskopische Beobachtung zeigte dabei eine Änderung der Physiologie der Mikroalgen: Die Zellen lagen zusammen und bildeten somit Agglomerate. Des Weiteren wurde beim Einsatz der rotierenden Scheibe eine ständige Bleichung der Zelle beobachtet. Die Kultivierungsbedingungen, die durch den Einsatz der rotierenden Scheibe realisiert wurden, verursachen bei der Mikroalge somit offenbar sowohl für das Wachstum als auch für die Produktbildung eine Stresssituation. Das einzige Makromolekül, das bei der Durchführung des 20 Hz-Versuchs nicht direkt von dieser Situation betroffen, zu sein schien, waren die Polysaccharide, wie anhand ihrer spezifischen Bildungsrate festgestellt wurde.

#### **4.2.3.2 Zyklen im Sekunden-Bereich**

Es wurde der Einfluss von vier unterschiedlichen Hell-Dunkel-Zyklen mit einer Dauer der einzelnen Phasen zwischen 1 und 9 s untersucht. Die Untersuchung der Zyklendauer im Bereich von Sekunden soll die Hell-Dunkel-Zyklen nachbilden, die in einer Pilot-Anlage oder in realen Produktionsreaktoren bei höherer Zelldichte aufgrund der geometrischen Randbedingungen vorhanden sind.

Die biologischen Auswirkungen dieser Zyklen, die mit einer Blende realisiert wurden, wurden durch die Auswertung von offline bestimmten Prozessgrößen untersucht. Die Dauer der Hell- und der Dunkel-Phase wurde in allen Fällen gleich groß gewählt, um in gleicher Weise die Photosynthese und die Atmung in der Zelle zu beanspruchen.

Die durchgeführten Kultivierungen mit unterschiedlichen Hell-Dunkel-Zyklen wurden sowohl untereinander als auch mit einer Referenz-Kultivierung verglichen. Bei dieser Referenz-Kultivierung wurde permanent beleuchtet, die Lichtintensität entsprach der durchschnittlichen Lichtintensität der zyklischen Kultivierungen.

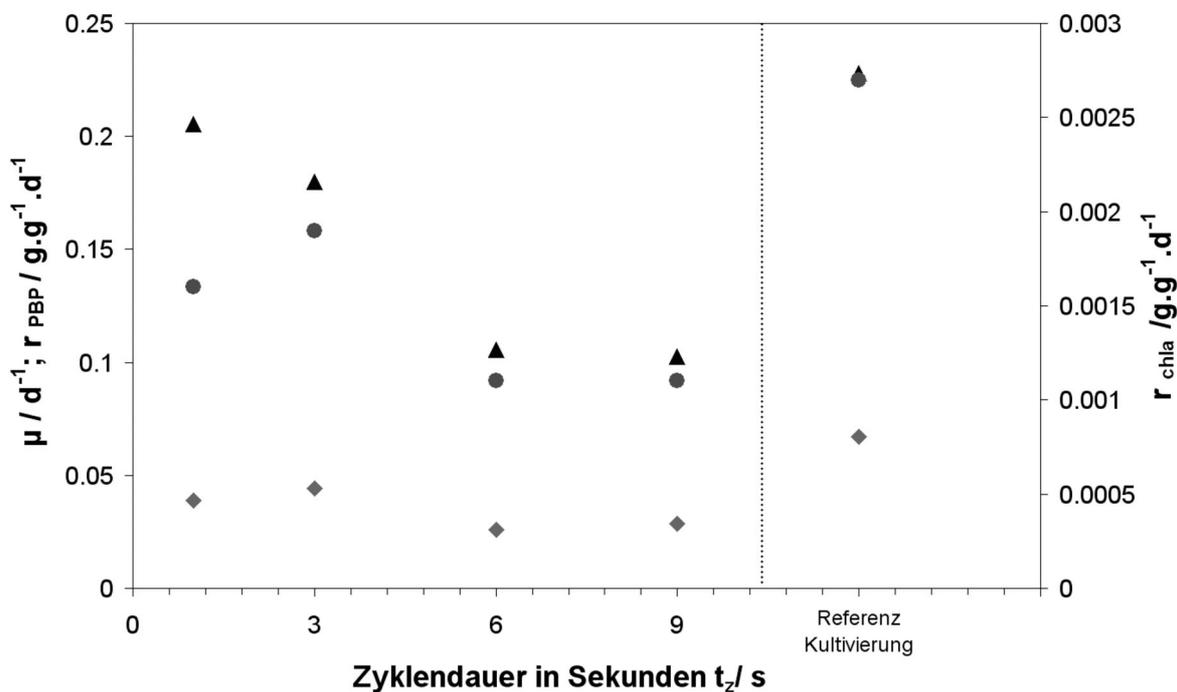
In der Abbildung 4.8 ist die Abhängigkeit der Makromoleküle von der Zyklusdauer dargestellt.

Die spezifische Wachstumsrate nahm zwischen den beiden ersten Zyklen leicht ab, dann fiel sie mit zunehmender Zyklendauer weiter ab. Eine Absenkung der spezifischen Wachstumsrate um die Hälfte ihres Werts wurde zwischen dem Zyklus

mit einer Dauer von einer Sekunde und dem Zyklus mit einer Dauer von sechs Sekunden beobachtet. Identisch verhielt sich der Verlauf der beiden Pigmente Phycoerythrin und Chlorophyll a.

Im Vergleich mit den Daten, die aus der Kultivierung mit Dauerbeleuchtung stammen, waren die ermittelten Werte bei der Kultivierung mit der Blende kleiner.

Obwohl die Quantenanzahl bei den durchgeführten Kultivierungen gemittelt über eine Zeitperiode konstant blieb, war die Quantenausbeute bei der Anwendung der Blende wesentlich geringer als bei Dauerbeleuchtung.



**Abbildung 4.8:** Spezifische Wachstumsrate (▲) und Phycoerythrin-(◆) bzw. Chlorophyll a-(●) Bildungsrate in Abhängigkeit von der Zyklendauer. Im Vergleich dazu befinden sich auf der rechten Seite die Ergebnisse der Kultivierung bei Dauerbeleuchtung, durchgeführt bei gleicher gemittelter Photonendichte von  $25 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ . Die Realisierung der Zyklen erfolgte mittels einer online gesteuerten Blende.

Allgemein bewirkten die Hell-Dunkel-Zyklen im Sekunden-Bereich eine verschlechterte photosynthetische Aktivität der Mikroalgen und somit eine kleinere Produktbildungsrate im Vergleich mit der Dauerbeleuchtung. Die Energie und die Glucose, die von der Photosynthese produziert werden, werden im Verlauf der Dunkelheit zum Teil verbraucht. Es bleibt somit weniger Glucose und Energie für die Mikroalgen, um neue Makromoleküle zu bilden.

Die Dauer der realisierten Zyklen hat darüber hinaus aber auch unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstum und die Produktbildung der Mikroalgen. Für die meisten ermittelten Kultivierungsgrößen zeigte sich bei dem Zyklus mit einer Dauer von drei Sekunden ein Maximum der jeweiligen Kurvenverläufe.

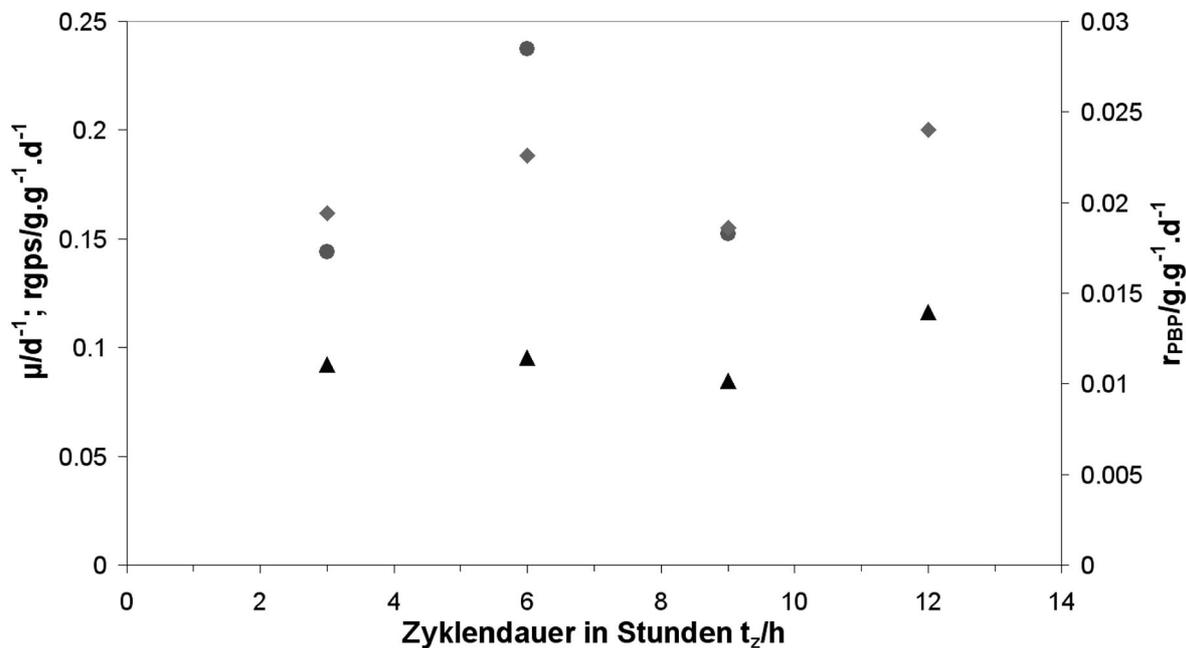
Obwohl die Nettobilanzierung der Energie und der Glucoseerzeugung für die lichtzyklischen Kultivierungen kleiner ist als für die Kultivierung mit Dauerbeleuchtung, schaffen es die Mikroalgen nur im Falle der ersten beiden realisierten Zyklen, eine gewisse Stoffwechselaktivität aufrecht zu erhalten. Im Fall der Kultivierung mit einer Sekunde weichen die zyklische spezifische Wachstumsrate und die bei Dauerbeleuchtung um weniger als zehn Prozent voneinander ab.

#### **4.2.3.3 Zyklen im Stunden-Bereich**

Photosynthese und Atmung sind zwei der wichtigsten biologischen Vorgänge der Mikroalgen, zu denen detaillierte Informationen gewonnen werden sollten. Hierzu wurden Hell-Dunkel-Zyklen mit einer langen Periode verwendet, um den Einfluss dieser beiden Prozesse gut auflösen zu können. Untersucht wurde der Einfluss von vier Zyklen unterschiedlicher Dauer: 3h/3h, 6h/6h, 9h/9h und 12h/12h.

Genau wie bei den anderen Kultivierungen wurde der Einfluss der realisierten Zyklen sowohl auf die offline, als auch auf die online bestimmten Prozessgrößen ermittelt. Hierbei wurden die online bestimmten Werte jedoch nicht über die ganze Zeitdauer der Hell-Dunkel-Phasen betrachtet, statt dessen wurde jeder einzelne Zyklus für sich allein ausgewertet. Dabei sollte untersucht werden, ob die Größe der Totzeiten und Zeitkonstanten, die das dynamische Verhalten von Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration charakterisieren, von der Dauer der realisierten Zyklen abhängt.

In der Abbildung 4.9 sind die Konzentrationen der Makromoleküle der Mikroalgen über der Zyklendauer aufgetragen.



**Abbildung 4.9:** Experimentell ermittelte spezifische Wachstumsraten (▲), spezifische Phycoerythrinbildungsrate (◆) und spezifische Polysaccharidbildungsrate (●) für die Rotalge *Porphyridium purpureum* für vier Hell-Dunkel-Zyklen im Stunden-Bereich. Die dargestellten Ergebnisse stellen den Mittelwert der Auswirkung der langen Zyklen dar.

Die realisierten Hell-Dunkel-Zyklen zeigten so gut wie keinen Einfluss der Zyklendauer auf die spezifische Wachstumsrate der Mikroalge, ein ähnliches Verhalten wurde bei der spezifischen Phycoerythrinbildungsrate beobachtet. Die Verlängerung der Dunkelphase wird in diesem Fall nicht mit einer Erhöhung der Pigmentproduktivität verbunden sein. Ein leichter Anstieg der spezifischen Gesamtpolysaccharidbildungsrate lässt sich im Fall des Hell-Dunkel-Zyklus mit einer Dauer von sechs Stunden beobachten. Die hier ermittelte Abweichung der Polysaccharidproduktivität könnte jedoch durch eine Erhöhung der Polysaccharidkonzentration aufgrund der Änderung der Nachweismethode entstanden sein. Hierfür spricht, dass die unterschiedlichen Versuche sehr ähnlich verliefen und die online eingestellten Verdünnungsraten des Reaktors für alle Versuche in derselben Größenordnung lagen.

Parallel zur Auswertung des Verhaltens der Makromoleküle über die ganze Zyklendauer wurden auch die Veränderungen der Makromoleküle in Abhängigkeit

von einzelnen Zyklen untersucht sowie die Analyse der online-Abgasanalytik durchgeführt.

Exemplarisch wurde für den Zyklus mit einer Dauer von zwölf Stunden die Auswirkung von vier unterschiedlichen Einschalt- bzw. Ausschaltvorgängen des Lichtes auf Wachstum und Produktbildung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* untersucht.

Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 dargestellt.

**Tabelle 4.5:** Spezifische Bildungsraten der offline bestimmten Größen für vier betrachtete einzelne Zyklen einer Kultivierung, bei der die Auswirkung eines zwölfstündigen Zyklus untersucht wurde.

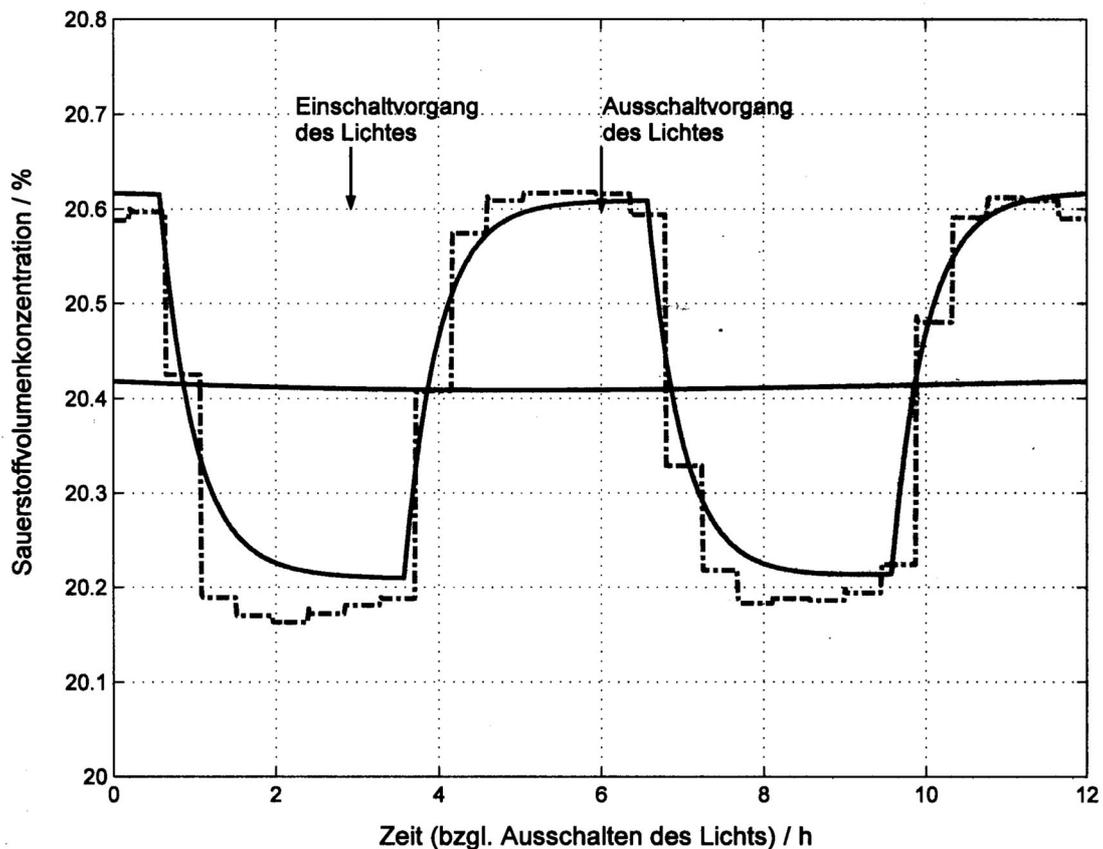
	1 Zyklus	2 Zyklen	3 Zyklen	4 Zyklen
	Hellwachstum	Dunkelwachstum	Hellwachstum	Dunkelwachstum
$\mu / d^{-1}$	0.1020	0.0890	0.1660	0.0390
$r_{PBP}/g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	0.0109	0.0370	0.0048	0.0049
$r_{Chla}/g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	$5.53 \cdot 10^{-4}$	0.0012	$8.59 \cdot 10^{-4}$	0.0015
$r_{gps}/g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	0.3520	0.3000	0.4000	0.3420
$r_{fps}/g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	0.0210	0.4900	0.0810	0.0820

Die Auswertung der einzelnen Phasen zeigt eine Abnahme der spezifischen Wachstumsrate im Verlauf der Dunkelphase, dagegen bewirkt die Lichtabwesenheit eine Zunahme der spezifischen Pigmentbildungsrate. Diese Zunahme betrifft stärker die spezifische Chlorophyllbildungsrate ( $r_{Chla}$ ) als die spezifische Bildungsrate von Phycoerythrin ( $r_{PBP}$ ). Keine deutliche Lichtabhängigkeit konnte bei den beiden spezifischen Polysaccharidbildungsraten beobachtet werden.

Ähnliche Muster der Lichtabhängigkeit konnten bei den anderen ausgewerteten Zyklen festgestellt werden. Der Vergleich der verschiedenen Hell- und Dunkelwachstumsraten bei den vier realisierten Zyklen im Stunden-Bereich (12h-9h-6h-3h) ergab keine Abhängigkeit des Verhaltens der Makromoleküle von der Zyklendauer.

Die online-Werte aus der Abgasanalytik wurden aufgenommen, um u.a. Informationen über den Übergang der Algen von photosynthetischer Aktivität zu Atmung zu bekommen. Hierbei war ein periodischer Kurvenverlauf der Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration zu beobachten. Der Verlauf der Konzentration innerhalb einer Periode ließ sich mit Hilfe von MATLAB durch zwei verzögerte PT1-Glieder annähern. Das erste PT1-Glied beschreibt den Ausschaltvorgang des Lichtes, das zweite den Einschaltvorgang. In Abbildung 4.10 sind Ausschnitte aus Kurvenverläufen mit den zugehörigen PT1-Gliedern exemplarisch dargestellt.

Die Zeitkonstanten der durchgeführten Kultivierungen sind der Tabelle 4.6 zu entnehmen. Durch die Anpassung mit verzögerten PT1-Gliedern wurden auch die Totzeiten abgeschätzt. Sowohl die Zeitkonstanten als auch die Totzeiten spiegeln die Verzögerung wider, die durch das Speicherverhalten der Flüssigkeit, den Gasübergang, den Kopfraum und die Leitung zur Abgasanalytik hervorgerufen wird. Die Totzeit ist somit eine Eigenschaft des Reaktorsystems und des Aufbaus der Abgasanalytik.



**Abbildung 4.10:** Sprungantwort der Sauerstoffvolumenkonzentration bei einer dreistündigen Hell- und Dunkelphase, gemessen (- · -) aus der Abgasanalytik sowie mit PT1-Gliedern mit einer Matlab-Funktion geschätzt (—).

**Tabelle 4.6:** Zeitkonstanten und Totzeiten für die Umschaltung von Photosynthese zu Atmung in Abhängigkeit von unterschiedlich langen Hell-Dunkel-Zyklen. Ermittelt aus den online-Werten der Abgasanalytik.

	<b>Sauerstoff</b>		<b>Kohlendioxid</b>	
	Totzeit [min]	Zeitkonstante [min]	Totzeit [min]	Zeitkonstante [min]
3h/3h	35	25	50	35
6h/6h	30	20	50	40
9h/9h	35	25	40	35

Bei der Auswertung der online-Größen der Kultivierungen im Stunden-Bereich wurden keine Unterschiede zwischen den geschätzten Zeitkonstanten für den Ausschaltvorgang und den Einschaltvorgang des Lichtes beobachtet, deswegen wurde jeweils nur eine Zeitkonstante berücksichtigt.

Bei Kohlendioxid wurden insgesamt größere Totzeiten als bei Sauerstoff gefunden. Dies ist auf die andere Dissoziationskonstante der gelösten Kohlenstoffform, sowie auf die gute Pufferwirkung des Nährmediums zurückzuführen. Eine Abhängigkeit der Zeitkonstanten von Sauerstoff und Kohlendioxid von der Dauer der Zyklen konnte nicht festgestellt werden.

Die Erkenntnis des unabhängigen Verhaltens der Mikroalgen von der Zyklendauer kann für die Beschreibung des Verhaltens des Umschaltvorgangs von Photosynthese zu Atmung oder umgekehrt im zu entwickelnden mathematischen Modell verwendet werden.

### 4.3 Quorum-Sensing-Nachweis

Untersuchungen zur Abhängigkeit der spezifischen Bildungsraten der Polysaccharide von den Kultivierungsbedingungen haben in einer vorangegangenen Arbeit (Csögör, 2000) vermuten lassen, dass diese weder von der Kultivierungsart (Reaktor oder Schüttelkolben) noch von der Lichtintensität beeinflusst werden. Weitere Experimente, die während dieser Arbeit durchgeführt wurden, haben nicht nur dieses Verhalten bestätigt, sondern auch gezeigt, dass auch Lichtqualität und Lichtquantität keinen Einfluss besitzen.

Die durchgeführten Kultivierungen zeigen, dass *Porphyridium purpureum* eine bestimmte Konzentration an freien Polysacchariden anstrebt. Die gebildete Polysaccharidkonzentration beeinflusst also die Polysaccharid-Produktion selber. Die Mikroalgen produzieren Polysaccharide in dem Maß, dass sich eine konstante Konzentration im Medium einstellt. Des Weiteren wiesen die Kultivierungen, bei denen die Konzentration an intrazellulären Polysacchariden bestimmt wurde, relativ konstante Werte auf. Diese unterschiedlichen Befunde unterstellen eine Wahrnehmung der Konzentration an freien Polysacchariden im Nährmedium durch die Mikroalgen.

Die Kommunikationssysteme von Bakterienzellen miteinander, die die Expression bestimmter Gene in Abhängigkeit von der Zelldichte koordinieren, werden unter dem Begriff "Quorum-Sensing" zusammengefasst. Diese Systeme fungieren mittels diffusionsfähiger Signalmoleküle (Lengeler et al., 1999). Typisch für derartige Systeme ist, dass sich bestimmte bakterielle Eigenschaften nur dann ausprägen, wenn eine entsprechende Anzahl von Bakterien vorliegt. Die kleinste Einheit, die zu solchen koordinierten Aktionen befähigt ist, stellt per Definition das Quorum dar.

Das Quorum-Sensing-Verhalten ist schon bei manchen Bakterien bekannt. Dagegen gibt es keine Angaben darüber, ob ein möglicher Quorum-Sensing-Effekt bei Mikroalgen im Allgemeinen und speziell bei *Porphyridium purpureum* vorhanden ist. Um die Bildung der Polysaccharide bei dieser Mikroalge näher verstehen zu können, wurden im Verlauf dieser Arbeit unterschiedliche Experimente durchgeführt. Dabei wurde die Konzentration an freien Polysacchariden im Nährmedium absichtlich entweder erhöht oder erniedrigt. Die dabei erzielten Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

#### **4.3.1 Zugabe der Polysaccharide**

Für den Nachweis des Quorum-Sensing-Verhaltens wurden drei Batch-Kultivierungen durchgeführt. Die Kultivierungsparameter der drei Kultivierungen waren identisch ( $T = 20^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7.6$ , 2.5 % Luft-Kohlendioxid-Gemisch, Lichtintensität  $25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ). Die Animpfkultur wurde so ausgesucht, dass sie für die drei Versuche aus derselben Stammkultur kam und gleichaltrig war.

Beim ersten der drei Versuche wurde steril gewonnene Polysaccharidlösung von *Porphyridium purpureum* aus verschiedenen Schüttelkolben in den Reaktor

zugegeben. Vor der Zugabe der freien Polysaccharide in den Reaktor wurde eine sterile Dialyse der Probe durchgeführt (cut-off von 100 kDa), um mögliche Signalmoleküle wie Proteine aus dem Überstand entfernen zu können.

Bei der zweiten Kultivierung wurde eine Dextran-Lösung zugegeben, deren Kohlenstoffgehalt dem der freien Polysaccharide in der ersten Kultivierung entsprach, um das Verhalten von *Porphyridium purpureum* auf unspezifische Polysaccharidzusammensetzung zu analysieren. Die Kohlenstoffkonzentration wurde durch eine TOC-Analyse der freien Polysaccharide und der Dextran-Lösung ermittelt. Bei der dritten Kultivierung wurde das identische Volumen der vorher zugesetzten Polysaccharide durch VE- Wasser ersetzt, dieses Ergebnis diene als Referenz. Die dabei gewonnenen Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen dargestellt. Um eine präzise Interpretation der durchgeführten Kultivierungen machen zu können, wurde die Batch-Phase der drei Kultivierungen unter Berücksichtigung der physiologischen Antwort der Mikroalge in zwei Abschnitte (Phase 1 und Phase 2) unterteilt. Die Ergebnisse, die den ersten Abschnitt der Batch-Phase charakterisieren, sind in Tabelle 4.7 zu sehen.

**Tabelle 4.7:** Offline-Ergebnisse der Batch-Phase der drei durchgeführten Kultivierungen. Eigene Polysaccharide der Mikroalgen, vollentsalztes Wasser, sowie Dextran wurden im Verlauf dieser Kultivierungen zugegeben.

	Zugabe von Polysacchariden	VE-Wasser	Dextran
$\mu / d^{-1}$	0,64	0,45	0,41
$r_{PBP} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	0,084	0,05	0,029
$r_{Chla} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	0,003	0,0027	0,0014
$r_{gps} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	0,163	0,195	0,122
$r_{fps} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	-0,196	0,041	0,0038
$r_{ips} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	-0,215	0,043	-0,29

Trotz einer deutlichen Verlängerung der Lag-Phase um 30% der Kultivierungsdauer verursachte die Zugabe von eigenen Polysacchariden eine bessere Wachstumsrate der Mikroalgen im Vergleich zu den anderen durchgeführten Kultivierungen. Unterschiedliches Verhalten lässt sich sowohl bei der Pigmentbildungsrate als auch bei der Polysaccharidbildungsrate erkennen. Die spezifische Pigmentbildungsrate

war bei der Zugabe der eigenen Polysaccharide am größten, obwohl die drei Kultivierungen bei gleicher Lichtintensität von  $25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durchgeführt wurden. Die Pigmentbildungsraten sind am größten, sowohl für das akzessorische Pigment Phycoerythrin als auch für das Reaktionszentrumspigment Chlorophyll a, bei der Zugabe der eigenen Polysaccharide.

Andere Verhaltensmuster wurden bei der Polysaccharidbildung beobachtet. Die markantesten Unterschiede sind bei dem Vergleich der freien Polysaccharidbildung zu sehen. Die Polysaccharidbildung war am niedrigsten bei der Kultivierung mit Zugabe von eigenen Polysacchariden. Die Zugabe von eigenen Polysacchariden verursachte im Fall der ersten Batch-Phase eine Erhöhung der spezifischen Wachstumsrate, eine Erhöhung der Pigmentbildungsrate und eine Absenkung der Polysaccharidbildungsrate. Die Erhöhung der spezifischen Wachstumsrate könnte durch eine Verschiebung der Glucosebilanzierung zwischen der Biomasse und den Polysacchariden erklärt werden. Aufgrund der zugegebenen Polysaccharide stellen die Mikroalgen deren Produktion ein und haben dadurch die Möglichkeit, die Bildung anderer Makromoleküle, wie hier zum Beispiel der Pigmente, zu bevorzugen.

Daneben könnte die Erhöhung der spezifischen Wachstumsrate mit der Erhöhung der Pigmentbildungsrate und der damit verbundenen Erhöhung der photosynthetischen Aktivität erklärt werden. Eine Auswertung des photosynthetischen Quotienten konnte an dieser Stelle jedoch nicht herangezogen werden, da die Zugabe von eigenen Polysacchariden unterschiedliche Kultivierungsparameter beeinflusst hat und somit ein Vergleich mit einer Referenz-Kultivierung bei identischer Photonenflussdichte erschwert wurde.

Ob die Erhöhung der spezifischen Wachstumsrate ausschließlich auf die zusätzliche Zugabe von Polysacchariden und auf die Erhöhung der Pigmentbildungsrate zurückzuführen ist, konnte anhand der durchgeführten Experimente nicht erkannt werden.

In Tabelle 4.8 befindet sich die Auswertung der zweiten Batch-Phase.

**Tabelle 4.8:** Ergebnisse der drei unterschiedlichen Batch-Versuche für die zweite betrachtete Batch-Phase

	Zugabe von Polysacchariden	VE-Wasser	Dextran
$\mu / d^{-1}$	0,268	0,265	0,295
$r_{PBP} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	0,072	0,036	0,063
$r_{Chla} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	0,033	0,0014	0,029
$r_{gps} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	-0,22	-0,102	0,105
$r_{fps} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	-0,114	0,012	0,045
$r_{ips} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	-0,0037	0,0056	-0,0037

In der zweiten Batch-Phase sind nur kleinere Unterschiede im Verhalten der Mikroalgen zwischen den verschiedenen Kultivierungen zu erkennen. Die Auswirkung, die die Zugabe der Polysaccharide bei der ersten Batch-Phase erzielt hatte, ist in der zweiten Phase kaum mehr zu sehen.

Eine fast identische spezifische Wachstumsrate wurde für die drei Kultivierungen errechnet. Die einzige weiterhin vorhandene Differenz betrifft die freie Polysaccharidbildungsrate, die noch immer bei der Kultivierung mit Zugabe von eigenen Polysacchariden am niedrigsten ist.

Die Kultivierungsveränderung, die durch die Zugabe der Polysaccharide verursacht wurde, erschwert die Interpretation der Ergebnisse. Obwohl eine kurzfristige positive Antwort der Stoffwechselaktivität der Mikroalgen im Verlauf dieser Versuche zu beobachten war, konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Um die biologische Funktion der Polysaccharide und die Regulierung ihrer Produktion weitergehend untersuchen und verstehen zu können, wurden daher Experimente durchgeführt, bei denen die Polysaccharide aus dem Kultivierungssystem entfernt wurden.

### 4.3.2 Kontinuierliche Abtrennung der Polysaccharide

Drei unterschiedliche Kultivierungen wurden zusätzlich durchgeführt, um eindeutige Hinweise auf das vermutete Quorum-Sensing der Mikroalge *Porphyridium purpureum* zu erhalten. Dabei sollten im Gegensatz zu den bereits vorgestellten Kultivierungen die gebildeten Polysaccharide im Bypass aus dem Reaktor entfernt werden.

Die ersten zwei Phasen der Kultivierung verliefen für die drei zu vergleichenden Kultivierungen identisch. Es wurde zuerst eine Batch-Phase mit einer Lichtintensität von  $25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durchgeführt. Dann wurde bei Erreichen der gewünschten Zellkonzentration die kontinuierliche Phase gestartet (mit gleichbleibender Lichtintensität). Bei der ersten Kultivierung wurden im Verlauf der dritten Phase mit Hilfe einer Mikrofiltration (MF) mit einem Cut-off von  $0,45 \mu\text{m}$  die Zellen kontinuierlich vom Rest des Reaktorinhalts abgetrennt. Die Zellen wurden in den Reaktor zurückgeführt, das Filtrat des Cross-Flows, das sich hauptsächlich aus Nährmedium und freien Polysacchariden zusammensetzt, wurde in einer Flasche gesammelt, die sich auf einer Waage befand. Damit war es möglich, den Filtratvolumenstrom zu ermitteln. Um eine Aufkonzentrierung der Zellen im Reaktor zu vermeiden, wurde zusätzlich zur normalen Verdünnungsrate frisches Nährmedium zugegeben. Das extra zugegebene Volumen an Nährmedium sollte den Filtratvolumenstrom kompensieren.

Mit Hilfe der zweiten Kultivierung sollte ermittelt werden, welchen Stress die Mikroalgen durch die Cross-Flow-Filtration und die Pumpen erfahren, und wie dieser sich auf die unterschiedlichen Bildungsraten der Produkte der Algen auswirkt. Deswegen wurde die Algensuspension durch den Cross-Flow geführt, das dabei gewonnene Filtrat und Konzentrat aber in den Reaktor zurückgeführt.

In der dritten Phase der zweiten Kultivierung wurde ähnlich wie bei der ersten Kultivierung eine Mikrofiltration eingesetzt, um die Zellen aus dem Reaktorinhalt zu entfernen, aber zusätzlich wurde das Filtrat des ersten Cross-Flows durch eine Ultrafiltration (UF) (Cut-off 10 kDa) gepumpt. Die eingesetzte Ultrafiltration ermöglicht die Abtrennung der Polysaccharide aus dem Nährmedium. Das Filtrat aus dem Cross-Flow wurde in den Reaktor zurückgeführt, das Konzentrat wurde in einer Flasche gesammelt. Da keine hundertprozentige Rückführung des Nährmediums möglich ist, wurde erneut zu der Verdünnungsrate zusätzlich frisches Nährmedium in den Reaktor zugegeben.

Die gewonnenen Ergebnisse der drei durchgeführten Kultivierungen wurden wieder tabellarisch aufgetragen. Um den Einfluss der jeweils eingesetzten Filtrationsmodule eindeutig darzustellen, wurden zusätzlich die Daten einer Referenz-Kultivierung eingefügt.

**Tabelle 4.9:** Ergebnisse der drei kontinuierlichen Kultivierungen mit Abtrennung der gebildeten Polysaccharide mittels Querstromfiltration, Mikrofiltration (MF) und Ultrafiltration (UF), im Vergleich zur Referenz-Kultivierung, die bei identischer Photonenflussdichte durchgeführt wurde.

	Kultivierung MF	Kultivierung Stressantwort	Kultivierung MF + UF	Referenz- Kultivierung
$\mu / d^{-1}$	0,104	-0,0163	-0,0173	0,2207
$r_{PBP} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	0,015	0,053	-0,021	0,054
$r_{Chla} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	0,018	0,0008	0,0095	0,0015
$r_{gps} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	<b>0,67</b>	0,482	0,42	0,214
$r_{fps} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	0,5	0,21	0,23	0,37
$r_{ips} / g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	0,52	0,3	0,19	0,14

Eine sehr hohe spezifische Polysaccharidbildungsrate wurde beim Einsatz der Mikrofiltration erzielt. Die dabei entstandene Polysacchariderniedrigung im Reaktor schien ausreichend zu sein, damit die Mikroalgen diese erfassen konnten und als Reaktion den Verlust an Polysacchariden in ihrer Umgebung durch eine messbare größere Polysaccharidproduktivität ausglich. Der Stress, den die Mikroalgen aufgrund des ständigen Umpumpens erfahren, sowie die Scherkräfte, die innerhalb der Filtrationsmodule herrschten, können nicht allein die beobachtete Erhöhung der Polysaccharidbildungsrate erklären. Die Auswirkung der Scherkräfte sowie der Einfluss der verwendeten Pumpe bei der Anwendung einer Querstromfiltration auf das Wachstum von Mikroorganismen sind in mehreren Literaturstellen (Vandanjou et al., 1999; Jaouen et al., 1999) beschrieben. Eine Verminderung des Wachstums der Mikroorganismen wurde dabei beobachtet, dies kann aber durch eine geeignete Wahl der Filtrationsmodule und der Pumpe stark minimiert werden.

Die offline-Werte, die den Stress der Kultivierung charakterisieren, zeigen außer für die Gesamtpolysaccharidbildungsrate eine wesentlich kleinere Produktivität der Polysaccharide als bei der kontinuierlichen Abtrennung der Polysaccharide mittels Mikrofiltration.

Der Vergleich der Kultivierungsbedingungen zwischen den Kultivierungen mit Mikrofiltration und der Kultivierung mit in Serie eingeschalteter Mikrofiltration und Ultrafiltration sollte Hinweise geben, welche Moleküle (Signalmoleküle oder Polysaccharide selber) oder Komponenten (Salze) für die Regulierung der Polysaccharidproduktion zuständig sind. Bei der Kultivierung mit der Mikrofiltration wurde sowohl die eigene Polysaccharidkonzentration als auch die Konzentration möglicher Signalproteine stark reduziert, zusätzlich wurde frisches Nährmedium zugegeben. Mit Hilfe des Einsatzes der Mikrofiltration und der Ultrafiltration sollte der Einfluss der Salzkonzentration ausgeschlossen werden, da der größte Teil des abgezweigten Nährmediums erneut in den Reaktor zurückgeführt wurde. Die möglichen Signalmoleküle sollten mittels der Ultrafiltration (10 kDa) zurückgehalten werden, und nur die Hälfte der Polysaccharidkonzentration wurde aus dem Reaktor entfernt.

Ein Ergebnis der dritten Kultivierung war, dass Signalproteine vermutlich nicht für die Regulierung der Polysaccharidproduktivität verantwortlich sind, da evtl. vorhandene Signalmoleküle aufgrund ihrer geometrischen Konfiguration mittels der Ultrafiltration vollständig abgetrennt worden waren. Die Entkopplung der Auswirkung der Salzkonzentration und der Polysaccharide auf die Regulation der Polysaccharidproduktivität ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht realisieren. Bei der dritten Kultivierung lag die Polysaccharidproduktivität unter derjenigen, die bei der ersten Kultivierung mit Mikrofiltration erzielt wurde. Dies kann zwei mögliche Ursachen haben: Zum einen wurden 50% der gebildeten Polysaccharide wieder in den Reaktor zurückgeführt, was eine geringere Neubildung der Polysaccharide zur Folge hatte. Zum anderen war das ASW-Medium eine Mischung aus frischem und altem Medium, wodurch die Salzkonzentration geringer als bei der ersten Kultivierung war – die erzielten Ergebnisse könnten also auch von der Salzkonzentration abhängen.

Aufgrund der nicht möglichen Entkopplung kann keine eindeutige Aussage über den Regulationsfaktor der Polysaccharidproduktion gemacht werden.

Begleitend zu den gerade vorgestellten Kultivierungen wurden zusätzlich die Polysaccharide charakterisiert. Zum einen wurde mittels RP-HPLC die Monosaccharid-Zusammensetzung der gebildeten Polysaccharide untersucht. Zum anderen wurden rheologische Messungen durchgeführt, um Informationen über das rheologische Verhalten der produzierten Polysaccharide zu erhalten.

In Tabelle 4.10 sind die ermittelten Monosaccharide in den von der Mikroalge gebildeten Polysacchariden normiert auf Glucose dargestellt.

**Tabelle 4.10:** Zusammensetzung der Monosaccharide der Mikroalge *Porphyridium purpureum*, ermittelt durch die Auswertung eines RP-HLPC-Spektrums. Die Werte wurden auf die Menge an Glucose normiert

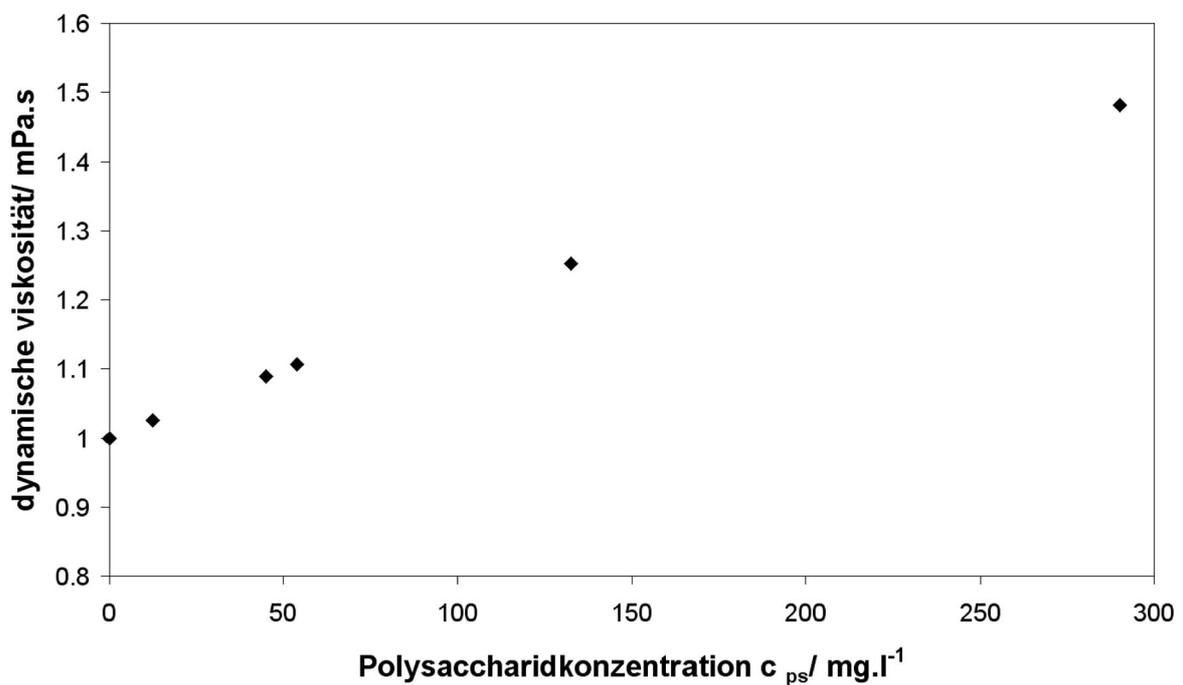
Monosaccharide	Normierung auf Glucose
Galactose	1,24
Xylose	2,27
Glucose	1,00
Glucuronsäure	0,15
Fructose	0,09
Glucosamin	0,03
Mannose	0,39

Ein Vergleich mit unterschiedlichen Angaben aus der Literatur (Percival et al., 1979; Kieras, 1976) ergab eine Übereinstimmung in der Zusammensetzung der Polysaccharide bezüglich Galactose, Xylose, Glucose und Glucuronsäure, wobei aber eine Abweichung bei den Prozentanteilen der Monosaccharide festgestellt wurde. Glucosamin, Fructose und Mannose wurden in den zitierten Literaturstellen nicht erwähnt. Ein direkter Vergleich ließ sich sehr schwer durchführen, da weder die Probenvorbereitung noch die verwendete Apparatur in der jeweiligen Literaturstelle beschrieben wurden.

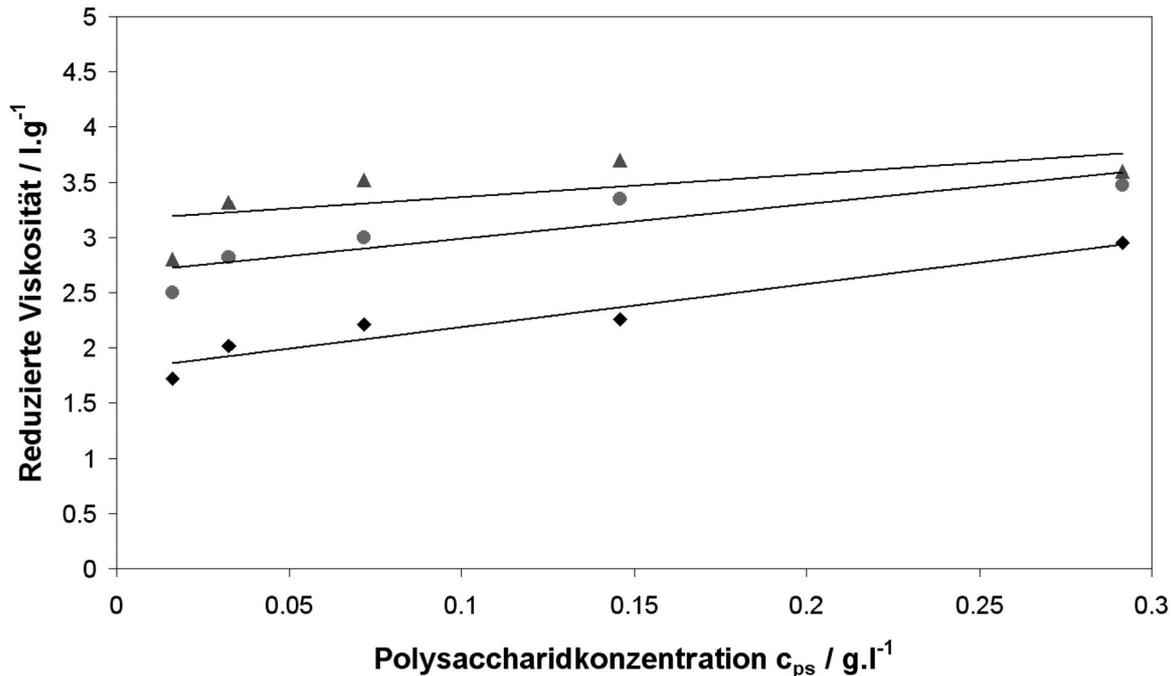
Die Untersuchung der Zusammensetzung der Polysaccharide im Verlauf von mehreren Kultivierungen ließ den Schluss zu, dass weder die Betriebsart (Batch- oder kontinuierliche Kultivierung) noch die Lichtintensität einen Einfluss auf die Bildung der Monosaccharide hat. Die Zusammensetzung blieb konstant und entsprach der in der vorgestellten Tabelle 4.10.

Parallel zur Charakterisierung der Zusammensetzung der Monosaccharide mittels RP-HPLC wurde das Strukturverhalten der gebildeten Polysaccharide mit Hilfe einer Kapillarviskosität und eines Rheometers untersucht.

In Abbildung 4.11 ist die Abhängigkeit der dynamischen Viskosität von der Polysaccharidkonzentration für unterschiedliche Lösungen dargestellt. Die Ergebnisse zeigen eine gute lineare Korrelation zwischen der Viskosität und der Konzentration der Polysaccharide in der vorhandenen Lösung im Bereich des Newton'schen Verhaltens. Diese Ergebnisse ermöglichen im Verlauf einer Kultivierung eine schnelle und kostengünstige Messung der offline-Viskosität.



**Abbildung 4.11:** Ermittlung des Viskositätsverhaltens in Abhängigkeit von der Polysaccharidkonzentration mit Hilfe eines Ubbelohde-Viskosimeters für eine konstante Temperatur von 20 °C. Die aufgetragenen Daten wurden aus fünf Messungen ermittelt.

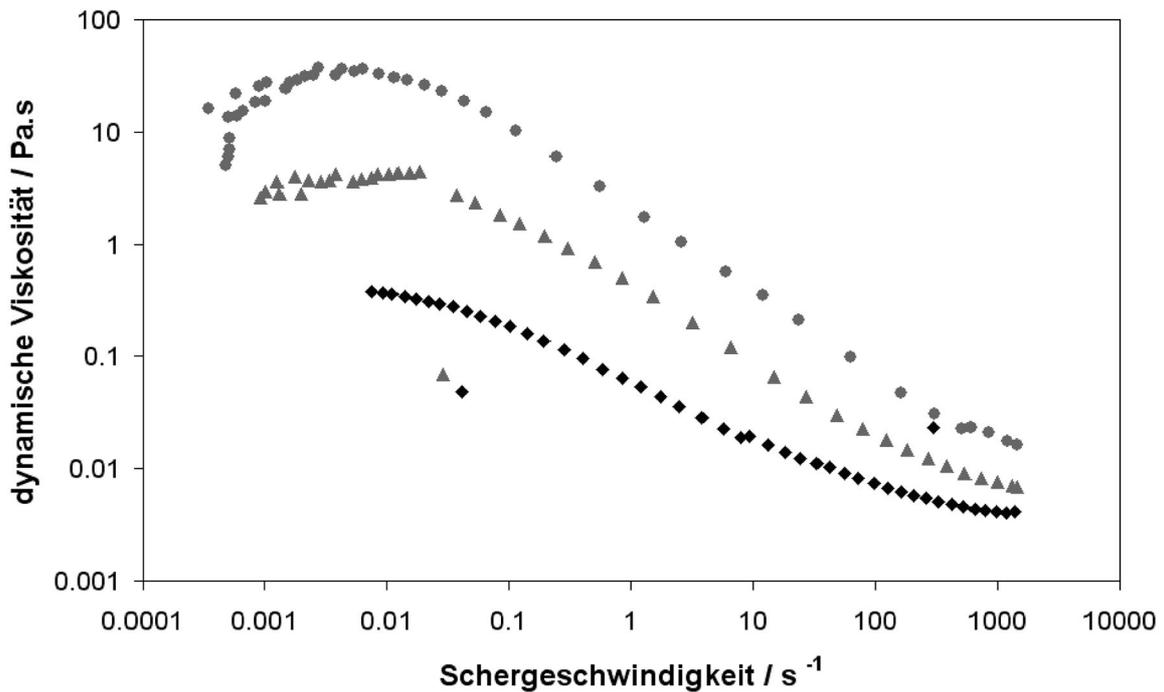


**Abbildung 4.12:** Ermittlung der reduzierten Viskosität in Abhängigkeit der Polysaccharidkonzentration bei einer Temperatur von 20 °C mittels eines Ubbelohde-Viskosimeters. Die Leitfähigkeit der Lösung variiert zwischen 3  $\text{mS.cm}^{-1}$  ( $\blacktriangle$ ), 30  $\text{mS.cm}^{-1}$  ( $\bullet$ ) und 55  $\text{mS.cm}^{-1}$  ( $\blacklozenge$ ).

In Abbildung 4.12 ist die Polysaccharidkonzentration in Abhängigkeit von der reduzierten Viskosität und der Leitfähigkeit dargestellt. Zu bemerken ist, dass die reduzierte Viskosität mit zunehmender Polysaccharidkonzentration zunimmt. Die innere Viskosität, die den Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse darstellt, nimmt mit zunehmender Leitfähigkeit ab.

Mit der Messung der Viskosität werden sowohl die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen als auch die Wechselwirkungen zwischen Molekülen und Lösungsmittel erfasst. Eine Abnahme der inneren Viskosität wird beobachtet, wenn sich die Ionenkonzentration erhöht. Die vorhandene Ladung der Polysaccharide wird die zugegebenen Ionen kompensieren, was zu einer Ausrichtung der Wasser-Moleküle führt und somit eine geringe Wechselwirkung zwischen den Molekülen entsteht. Dies hat eine Erhöhung der Beweglichkeit der Polymere zur Folge. Im Fall von sehr niedrigen Ionenkonzentrationen der Lösung sind die elektrostatischen Wechselwirkungen hauptsächlich durch die Ladungen der Polysaccharide verursacht. Die Steigung der ermittelten linearen Korrelation lässt eine Aussage über die Flexibilität der Polymere zu. Je größer die Steigung, desto mehr Flexibilität hat das Molekül. Bei

gleicher Ionenkonzentration und Polymerkonzentration ist die Steigung der untersuchten Polymere und Xanthan ähnlich.



**Abbildung 4.13:** Viskositätskurve der Polysaccharide der Mikroalge *Porphyridium purpureum*, für drei Polysaccharidkonzentrationen 0,6 g.l<sup>-1</sup>(◆), 1,1g.l<sup>-1</sup>(▲) und 2,5 g.l<sup>-1</sup>(●) ermittelt. Angewendet wurde eine Haake Z40 Bio DIN, die Temperatur wurde auf 20°C konstant gehalten.

Viskositätskurven von Polysaccharidlösungen aus *Porphyridium purpureum* werden in Abbildung 4.13 gezeigt. Zu erkennen sind dabei zwei Bereiche. Im ersten Bereich zeigen die Polysaccharide ein Newton'sches Fließverhalten. Im Gegensatz dazu ist im zweiten Bereich ein nicht-Newton'sches Fließverhalten zu erkennen. Die Polysaccharide zeigen bei zunehmenden Schergeschwindigkeiten eine strukturviskose Antwort. Die Unterteilung in zwei unterschiedliche Fließverhalten wurde nur ab einer bestimmten Polysaccharidkonzentration von 0,6 g.l<sup>-1</sup> beobachtet. Unterhalb einer Konzentration von 300 mg.l<sup>-1</sup> wurde nur Newton'sches Fließverhalten gemessen.

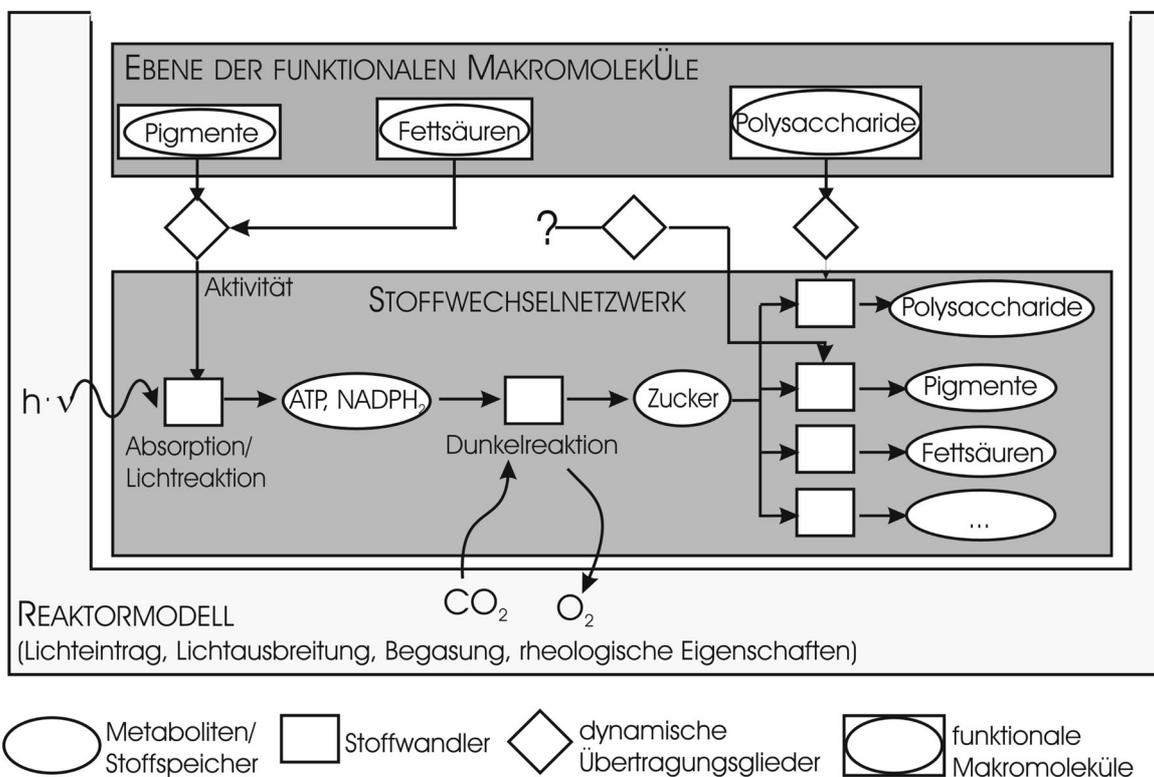
## 4.4 Mathematisches Modell

Das hier vorgestellte mathematische Modell stellt die Erweiterung eines Ansatzes dar, der in einer vorangegangenen Arbeit (Csögör, 2000) entwickelt wurde. Das Ziel bei der Entwicklung des mathematischen Modells besteht darin, Verständnis darüber zu gewinnen, wie das Wachstum und die Produktbildung der betrachteten Mikroalgen durch die Kultivierungsparameter gezielt beeinflusst werden können. Dieses Wissen kann dann angewendet werden, um Vorgänge in einer realen Produktionsanlage vorhersagen und steuern zu können.

### 4.4.1 Struktur

#### Konzept

Das entwickelte mathematische Modell unterteilt sich, wie die Abbildung 4.14 zeigt, in drei unterschiedliche Ebenen. Berücksichtigt werden die Reaktorebene, die Ebene der funktionalen Makromoleküle und die Ebene der Stoffwechselnetzwerke (Kendlbacher, 1998).



**Abbildung 4.14:** Struktur des mathematischen Modells zur Simulation des Wachstums der Mikroalge *Porphyridium purpureum*

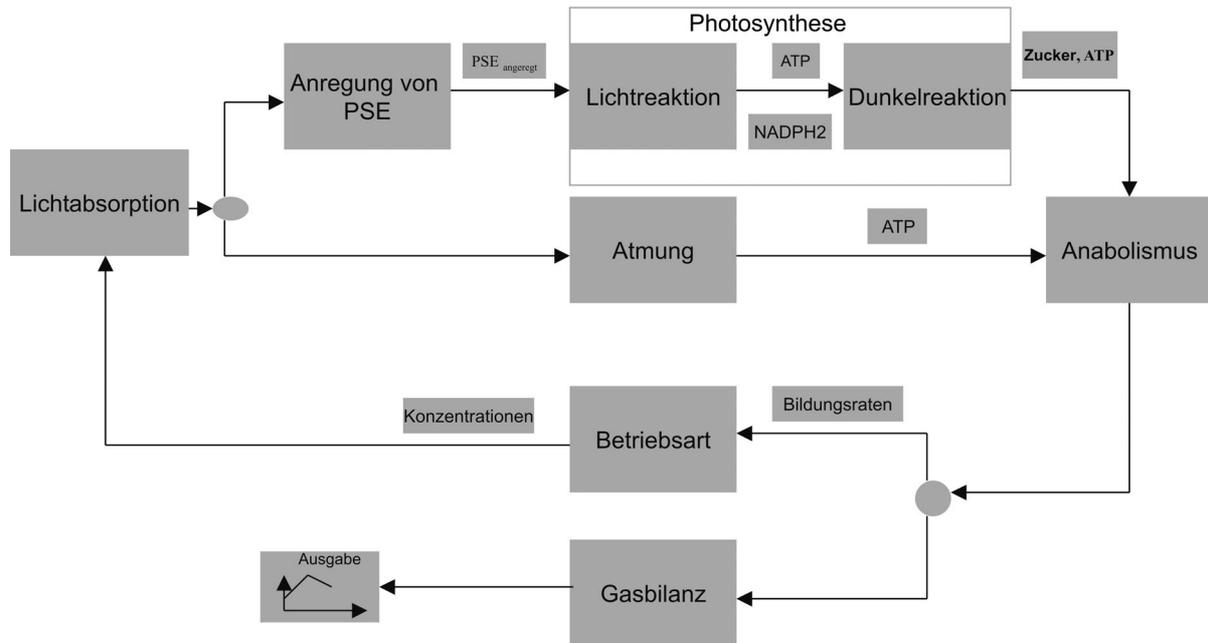
Die Reaktorebene berücksichtigt auf der einen Seite die Vorgänge in der Gas- und Flüssigphase, dabei wird der Gasaustausch zwischen der Gasphase und der Flüssigphase, sowie das Gleichgewicht von gelöstem Kohlendioxid, Hydrogencarbonat und Carbonat in der Flüssigphase betrachtet. Auf der anderen Seite wird das absorbierte Licht auf Basis der eingetragenen Photonenflussdichte, der Reaktorgeometrie, der angewendeten Lichtquelle und der Pigmentausstattung der vorhandenen Mikroalgen bestimmt.

Die Ebene der Stoffwechselnetzwerke betrachtet einen Teil der unterschiedlichen biologischen Vorgänge in den Zellen wie die Photosynthese oder die Atmung. Aus der Betrachtung dieser biologischen Vorgänge soll errechnet werden, welche Menge an Zucker die Zellen zur Verfügung haben, um neue Biomasse oder Produkte bilden zu können. Die hier beschriebenen Stoffflüsse sind mit Hilfe von stöchiometrisch determinierenden Gleichungen beschrieben. Die Zeitkonstanten der Stoffwechselnetzwerke des Intermediärstoffwechsels liegen im Bereich von Sekunden bis Minuten.

Die funktionalen Makromoleküle bilden die eigentliche Biomasse und steuern die physiologische Leistung der Zelle. Als Enzyme oder Pigmente stellen sie beispielsweise die eigentlichen Stoffwandler auf der Ebene der Flüsse dar. Somit greifen die neu gebildeten Makromoleküle in die Stoffflüsse ein, wobei sie selbst die Produkte der Stoffflüsse darstellen. Die hier berücksichtigten Wechselwirkungen zwischen den Makromolekülen beruhen hauptsächlich auf experimentellen Beobachtungen. Die Zeitkonstanten für die Bildung der funktionalen Makromoleküle liegen im Bereich von Stunden bis Tagen.

## Realisierung

Mit der schematischen Darstellung in Abbildung 4.15 wird die Modelloberfläche des mathematischen Modells veranschaulicht. Angegeben sind die Programmblöcke. Das mathematische Modell wird mit Hilfe von Matlab und Simulink realisiert.



**Abbildung 4.15:** Modelloberfläche des mathematischen Modells mit den verwendeten Programmblöcken, realisiert mit dem Programm Simulink.

Das absorbierte Licht wird in Abhängigkeit von der eingetragenen Photonenflussdichte, der Geometrie des Reaktors und der Pigmentzusammensetzung bestimmt (*Lichtabsorption*). Aus den absorbierten Photonen und der Anzahl der vorhandenen photosynthetischen Einheiten werden die erfolgreich absorbierten Photonen berechnet. Damit wird die gebildete Energie in Form von ATP und NADPH<sub>2</sub> sowie Zucker aus der Photosynthese errechnet. Der gegenläufige Vorgang von Photosynthese und Atmung wird ebenso berücksichtigt. Der Block *Anabolismus* beschreibt die Bildung der Makromoleküle der Mikroalgen. Durch die Stoffwechselaktivität der Mikroalgen werden Kohlendioxid und Sauerstoff gebildet oder aufgenommen, so dass sich die Konzentrationen in der Flüssigphase und in der Gasphase verändern. Diese Veränderungen werden im Block *Bilanz* beschrieben. Der Betriebsmodus des Reaktors wird durch den Block *Betriebsart* berücksichtigt.

Die unterschiedlichen Blöcke des Modells werden im folgenden Abschnitt erläutert.

#### 4.4.2 Stoffwechselnetzwerk

Die Ebene des Stoffwechselnetzwerks beschreibt die beiden wichtigsten Stoffwechselaktivitäten eines photoautotrophen Mikroorganismus: die Photosynthese und die Atmung. In der Reaktorebene wird aufgrund der Geometrie des Reaktors und des physiologischen Zustands der Mikroalgen die mögliche absorbierte Photonenflussdichte errechnet. Die dabei verwendeten Gleichungen befinden sich in Abschnitt 4.4.9.

Die Mikroalgen verfügen über eine bestimmte Anzahl an photosynthetisch aktiven Einheiten (PSE), welche die zur Verfügung stehenden Photonen absorbieren können. Welcher Anteil dieser Photonen tatsächlich von der Mikroalge absorbiert und dann genutzt werden kann, wird durch die Licht-photosynthetische-Kurve beschrieben.

Die Abhängigkeit der Photosyntheserate von der Lichtintensität wird durch eine typische Sättigungskurve charakterisiert, die in Abschnitt 2.2.2 vorgestellt wurde.

Dabei ist das Wachstum der Mikroalgen im linearen Bereich lichtlimitiert, aber die Lichtnutzung ist maximal (Goldmann, 1979), weil jedes absorbierte Photon unter diesen Bedingungen in chemische Energie umgewandelt wird. Dies ist nicht mehr der Fall für die Lichtsättigungsphase, dort können nicht mehr alle Photonen in chemische Energie umgewandelt werden. Zum einen können die Elektronentransportierenden Moleküle wie Plastochinon Q nicht schnell genug wieder regeneriert werden (Matthijs, 1996), zum anderen werden die in der Lichtreaktion reduzierten NADPH-Moleküle im Calvin-Zyklus zu langsam reoxidiert, um weitere Elektronen aufnehmen zu können.

Die experimentell realisierten Lichtintensitäten deckten ausschließlich den linearen Bereich der vorgestellten Kurve ab. Daher wird in diesem Modell davon ausgegangen, dass alle Photonen zu einer Umsetzung der Lichtenergie in chemische Energie führen.

Trotz dieser Annahme sollte die mathematische Funktion berücksichtigen, dass die betrachtete photosynthetische Einheit, die sich im angeregten Zustand befindet, nach der Aufnahme eines Photons nur nach einer gewissen Relaxationszeit erneut angeregt werden kann. Innerhalb dieser Relaxationszeit  $t_R$  kann dieselbe photosynthetische Einheit also nicht noch einmal angeregt werden, so dass die Energie weiterer Photonen in diesem Zeitintervall verloren geht.

Dies wird mit folgenden Gleichungen ausgedrückt:

$$\frac{dPSE_{\text{anregbar}}}{dt} = -\frac{PSE_{\text{anregbar}}}{PSE_{\text{gesamt}}} \cdot z_{\text{hv}} + \frac{1}{t_R} \cdot (PSE_{\text{gesamt}} - PSE_{\text{anregbar}}) \quad (4.1)$$

$$\frac{PSE_{\text{anregbar}}}{PSE_{\text{gesamt}}} = \frac{(PSE_{\text{gesamt}})}{z_{\text{hv}} \cdot t_R + PSE_{\text{gesamt}}} \quad (4.2)$$

Die verwendete Relaxationszeit wurde aus der Literatur entnommen, nach Peterson (1987) und Lawlor (1990) liegt sie im Bereich von Sekunden. Die Anzahl der photosynthetischen Einheiten wird mit dem Gehalt an Chlorophyll a der Zellen geschätzt.

Nicht berücksichtigt wurde der Strahlungs-Energietransfer zwischen den akzessorischen Pigmenten und den photosynthetischen Einheiten.

Mit dem Ergebnis der Berechnung der erfolgreich absorbierten Photonen kann die Entstehung der chemischen Energie durch die Lichtreaktion betrachtet werden.

#### 4.4.3 Lichtreaktion

Das Z-Schema beschreibt die Umsetzung der Strahlungsenergie in chemische Energie. Dabei wird die nicht zyklische und die zyklische Photophosphorylierung nicht getrennt berücksichtigt.

Nicht zyklische Photophosphorylierung

Die Bildung von Sauerstoff und von chemischer Energie im Form von NADPH<sub>2</sub> und ATP wird nach der Formel



beschrieben.

Theoretisch beträgt der minimale Quantenbedarf 8 Photonen. Im Vergleich dazu wurde experimentell für die photosynthetische Sauerstoffentwicklung ein Quantenbedarf von 9 bis 10 ermittelt. Für acht erfolgreich absorbierte Photonen werden zwei Wassermoleküle oxydiert, dabei wird ein Molekül Sauerstoff gebildet.

$$n_{O_2} = \frac{1}{8} \cdot n_{\text{erfolgreiche\_Photonen}} = \frac{1}{8} \cdot \frac{PSE_{\text{anregbar}}}{PSE_{\text{gesamt}}} \cdot \frac{A_R}{V_R} \cdot \frac{PFD_{\text{Abs}}(\lambda)}{c_X} \quad (4.4)$$

Parallel dazu wird ATP mittels der ATP-Synthase-Komplexe gebildet,

$$n_{ATP} = y_{ATP,O_2} \cdot n_{O_2} \quad (4.5)$$

sowie NADPH<sub>2</sub>

$$n_{NADPH_2} = y_{NADPH_2,O_2} \cdot n_{O_2} \quad (4.6)$$

Die Bildungsraten ergaben sich aus

$$r_{ATP,Photosynthese} = n_{ATP} \cdot MG_{ATP}, \quad (4.7)$$

in gleichem Maße wird die Bildungsrate von NADPH<sub>2</sub> berechnet:

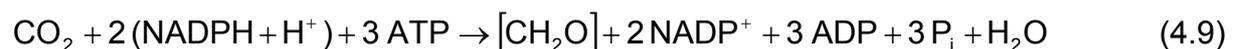
$$r_{NADPH_2,Photosynthese} = n_{NADPH_2} \cdot MG_{NADPH_2} \quad (4.8)$$

Aus der gebildeten Energie und den Redoxäquivalenten wird in der nächsten Funktion durch die Fixierung von Kohlendioxid Zucker gebildet. Dieser Vorgang wird durch den Calvin-Zyklus beschrieben.

#### 4.4.4 Calvin-Zyklus

Im Calvin-Zyklus wird aus der freigesetzten Energie der Lichtreaktion und dem aus dem Nährmedium aufgenommenen Kohlendioxid Zucker gebildet.

Die Fixierung von anorganischem Kohlenstoff zu Zuckerbausteinen [CH<sub>2</sub>O] erfolgt formal nach



wobei nur ein Teil der zur Verfügung stehenden Energie eingesetzt wird. Dies wird durch folgende Formeln beschrieben.

Durch eine stöchiometrische Bilanzierung wird die Menge an gebildetem Zucker aus den Energien berechnet:

$$r_{CH_2O} = y_{CH_2O,ATP} \cdot r_{ATP,calvin\_zyklus} \quad (4.10)$$

mit der Definition des Ausbeutekoeffizienten:

$$y_{CH_2O,ATP} = \frac{1}{3} \cdot MG_{CH_2O} \quad (4.11)$$

Mit der Kohlenstoff-Bilanzierung wird die erforderliche Menge an zu fixierendem Kohlendioxid aus der gebildeten Menge an Zucker ermittelt.

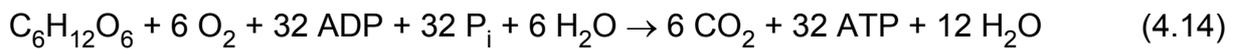
$$r_{CO_2} = r_{CH_2O} \cdot \frac{MG_{CO_2}}{MG_{CH_2O}} \quad (4.12)$$

$$r_{\text{NADPH}_2, \text{Calvin\_Zyklus}} = y_{\text{CH}_2\text{O}, \text{NADPH}_2} \cdot r_{\text{CH}_2\text{O}} \quad (4.13)$$

#### 4.4.5 Atmung

Der gegenteilige Prozess der Photosynthese ist die Atmung, die in den Mitochondrien der Zelle stattfindet. Bei Abwesenheit von Licht atmen die Zellen, um ihren Maintenance-Energiebedarf zu decken.

Die Atmung wird durch folgende Gleichung beschrieben:



Im Modell stellt der Restanteil die im Verlauf der Atmung abgebauten Substanzen dar. Zusammengestellt werden in der Atmung die akkumulierten Speicherstoffe wie Stärke, Proteine und Lipide, sowie Nucleinsäure.

$$r_{\text{Rest}} = -y_{\text{ATP}, \text{Rest}} \cdot r_{\text{ATP}, \text{maintenance}} \quad (4.15)$$

$$r_{\text{CO}_2} = y_{\text{CO}_2, \text{Rest}} \cdot r_{\text{Rest}} \quad (4.16)$$

$$r_{\text{O}_2} = -y_{\text{O}_2, \text{Rest}} \cdot r_{\text{Rest}} \quad (4.17)$$

Die beiden Ausbeutekoeffizienten ergeben sich aus dem stöchiometrischen Zusammenhang der Gleichung (4.11).

$$\text{Somit ist } y_{\text{CO}_2, \text{Rest}} = 6 \cdot \frac{\text{MG}_{\text{CO}_2}}{\text{MG}_{\text{Rest}}} \text{ und } y_{\text{O}_2, \text{Rest}} = 6 \frac{\text{MG}_{\text{O}_2}}{\text{MG}_{\text{Rest}}}$$

Die spezifische Wachstumsrate lässt sich dann folgendermaßen berechnen:

$$\mu = r_{\text{Rest}} \quad (4.18)$$

Der Umschaltvorgang zwischen Photosynthese und Atmung wird im mathematischen Modell durch die An- bzw. Abwesenheit des Lichts geregelt, dabei wird angenommen, dass sofort nach Ausschalten des Lichtes keine weitere Fixierung des Kohlendioxids mehr möglich ist. Diese Annahme ist in sofern gerechtfertigt, als dass nach Erkenntnissen aus der Literatur die maximale Funktionsdauer der Dunkelreaktion bei Lichtabwesenheit auf 30 ms geschätzt wird.

#### 4.4.6 Anabolismus

Die Fixierung des CO<sub>2</sub>, sowie die Verteilung der gewonnenen Glucose auf die verschiedenen Produkte wird mit Hilfe von mehreren linearen Bilanz-Gleichungen wie der Energie-Bilanz, sowie der Elemente-Bilanzen für Kohlenstoff und Stickstoff beschrieben.

Kohlenstoff-Bilanz:

$$r_{\text{CH}_2\text{O}} \cdot e_{\text{C,CH}_2\text{O}} - r_{\text{IPS}} \cdot e_{\text{C,iPS}} - r_{\text{PBP}} \cdot e_{\text{C,PBP}} - r_{\text{Chla}} \cdot e_{\text{C,Chla}} - r_{\text{Rest}} \cdot e_{\text{C,Rest}} - r_{\text{Car}} \cdot e_{\text{C,Car}} = 0 \quad (4.19)$$

Stickstoff-Bilanz:

$$r_{\text{NO}_3} \cdot e_{\text{N,NO}_3} - r_{\text{PBP}} \cdot e_{\text{N,PBP}} - r_{\text{Chla}} \cdot e_{\text{N,Chla}} - r_{\text{Rest}} \cdot e_{\text{N,Rest}} = 0 \quad (4.20)$$

Energie-Bilanz:

$$r_{\text{ATP,Produktbildung}} - r_{\text{ATP,PBP}} - r_{\text{ATP,Chla}} - r_{\text{ATP,Rest}} - r_{\text{ATP,maintenance}} = 0 \quad (4.21)$$

Die Gesamtenergiebilanzierung wird folgendermaßen beschrieben:

$$r_{\text{ATP,Photosynthese}} - r_{\text{ATP,Calvin-Zyklus}} - r_{\text{ATP,Produktbildung}} = 0 \quad (4.22)$$

Dabei wird die gebildete ATP-Menge der Photosynthese ( $r_{\text{ATP,Photosynthese}}$ ), die verbrauchte ATP-Menge im Verlauf des Calvin-Zyklus ( $r_{\text{ATP,Calvin-Zyklus}}$ ) sowie die Menge an ATP, die für die Bildung der unterschiedlichen Makromoleküle notwendig ist ( $r_{\text{ATP,Produktbildung}}$ ) berücksichtigt.

Ähnliche Bilanzierungen können für das zweite Photosyntheseprodukt NADPH<sub>2</sub> aufgestellt werden.

$$r_{\text{NADPH}_2,\text{Photosynthese}} - r_{\text{NADPH}_2,\text{Calvin-Zyklus}} - r_{\text{NADPH}_2,\text{Produktbildung}} = 0 \quad (4.23)$$

Nicht alle zu bestimmenden Größen lassen sich mit Hilfe dieser stöchiometrischen Bilanzierungen ermitteln. Insbesondere kann die Zelle auf wechselnde Umgebungsbedingungen durch Umsteuerung von Stoffflüssen reagieren und ihre molekulare Zusammensetzung verändern.

Deswegen ist es erforderlich, verschiedene Annahmen und Vereinfachungen zu treffen. Aufgrund der Analyse einer großen Anzahl an experimentellen Ergebnissen war es möglich, Annahmen für mehrere Makromoleküle zu treffen. Dies wird im folgenden Abschnitt vorgestellt.

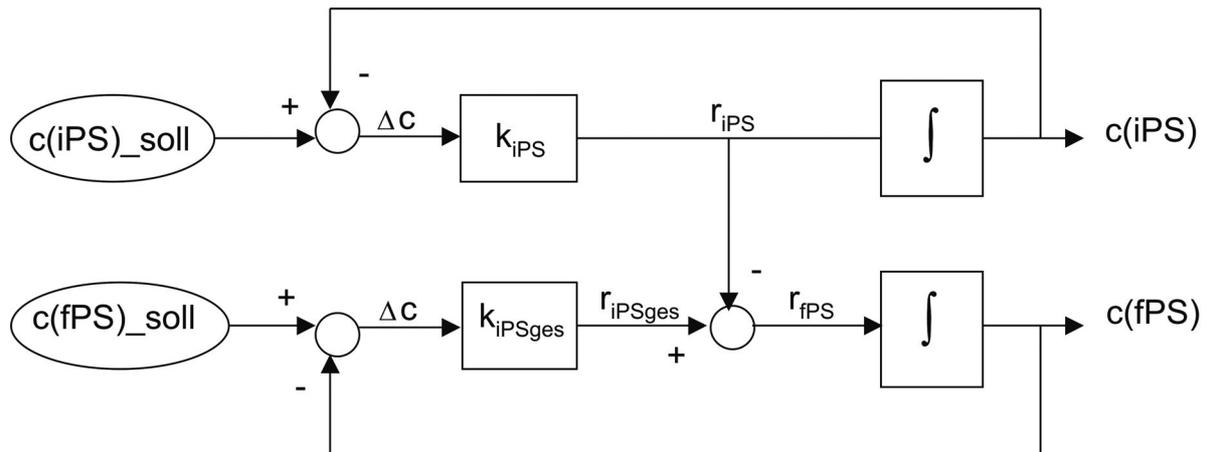
#### 4.4.7 Ebene der funktionalen Makromoleküle

Das System der linearen Bilanz-Gleichungen ist ein Grundgerüst für das Modell, beschreibt aber natürlich nicht alle zu modellierenden Stoffwechselraten, insbesondere nicht die mögliche Reaktion und Adaption auf Änderungen der Umgebungsbedingungen. Zusätzlich werden also Annahmen bezüglich intrazellulärer dynamischer Vorgänge, basierend auf gewonnenen experimentellen Daten getroffen.

##### 4.4.7.1 Polysaccharidbildung

Alle bisher durchgeführten Kultivierungen haben gezeigt, dass *Porphyridium purpureum* eine bestimmte Konzentration an freien Polysacchariden anstrebt. Die gebildete Polysaccharidkonzentration beeinflusst also die eigene Polysaccharid-Produktion. Die Mikroalgen produzieren Polysaccharide in dem Maß, dass sich eine konstante Konzentration im Medium einstellt. Des Weiteren wiesen die Kultivierungen, bei denen die Konzentration an intrazellulären Polysacchariden bestimmt wurde, relativ konstante Werte auf.

Im mathematischen Modell wurde diese Erkenntnis mit zwei kombinierten Regelkreisen berücksichtigt (Abbildung 4.16). Der obere Proportional (P)-Regler bestimmt die spezifische Bildungsrate der intrazellulären Polysaccharide (iPS), d.h. derjenigen Polysaccharide, die in der Zelle gespeichert werden. Der untere P-Regler bildet die spezifische Bildungsrate aller Polysaccharide (iPSges) ab und stellt damit nach Abzug des intrazellulären Anteils die Freisetzungsrates dar, die zur Akkumulation der freien Polysaccharide (fPS) im Medium führt. Angenommen wurde hierbei, dass die freigesetzten Polysaccharide direkt in das Nährmedium gehen, ohne zuvor die gebundenen Polysaccharide der Zelle darzustellen.



**Abbildung 4.16:** Regler für die Bildung von intrazellulären (iPS) und freien Polysacchariden (fPS)

Die folgenden Gleichungen beschreiben die beiden P-Regelkreise. Die Menge der gespeicherten intrazellulären Polysaccharide ergibt sich zu:

$$r_{iPS} = k_{iPS} \cdot (c_{iPS,soll} - c_{iPS}) \quad (4.24)$$

Die Menge an insgesamt vorhandenen intrazellulären Polysacchariden ist:

$$r_{iPSges} = k_{iPSges} \cdot (c_{fPS,soll} - c_{fPS}) \quad (4.25)$$

Daraus folgt:

$$r_{fPS} = r_{iPSges} - r_{iPS} \quad (4.26)$$

Weiterhin wird angenommen, dass die gesamten extrazellulären Polysaccharide in einem festen Verhältnis zu den freien Polysacchariden stehen. Diese Annahme unterstellt, dass der Anteil der gebundenen Polysaccharide ebenfalls konstant bleibt. Die gebundenen Polysaccharide stellen einen sehr geringen Anteil aller Polysaccharide dar. Dies konnte bei verschiedenen Kultivierungen bestätigt werden.

#### 4.4.7.2 Pigmentbildung

Weitere Erkenntnisse wurden für die Bildung der beiden Hauptpigmente Phycoerythrin und Chlorophyll a herangezogen, wobei zum einen die spezifische Bildungsrate von Phycoerythrin proportional zur spezifischen Glucose-Bildungsrate

$r_{PBP} = Y_{PBP,CH_2O} \cdot r_{CH_2O}$  angenommen wurde.

Zum anderen wurde für die Simulationen zunächst ein konstantes Verhältnis

zwischen den beiden spezifischen Pigmentbildungsraten  $\frac{r_{chla}}{r_{PBP}} = y_{chla\_PBP} = \text{konstant}$

angenommen, das experimentell bestimmt wurde. Gleiches wurde für die spezifische Carotinoidbildungsrate angenommen.

$$\frac{r_{car}}{r_{chla}} = y_{car\_chla} = \text{konstant} \quad (4.27)$$

Die spezifische Wachstumsrate ergibt sich aus der Summe aller gebildeten spezifischen Produktbildungsraten,

$$\mu = r_{PBP} + r_{Chla} + r_{car} + r_{Rest} + r_{iPS} \quad (4.28)$$

Alle genannten Gleichungen des Anabolismus und der Ebene der funktionalen Makromoleküle wurden zusammengefasst und durch eine 13x13 Matrix beschrieben:

$$R = y^{-1} * B \quad (4.29)$$

Durch die Auflösung dieser Matrix wurden alle spezifischen Bildungsraten der Produkte bestimmt.

#### 4.4.8 Reaktor-Ebene

#### 4.4.9 Lichtabsorption

Die Lichtverteilung im Reaktor wird durch die Reaktorgeometrie, sowie durch Streuung an den Algenpartikeln und Absorption an den Pigmenten beschrieben. Während die räumliche Verteilung der Lichtstärke im Reaktor vorab durch Monte-Carlo berechnet wurde (Csögör, 1999c), ergibt sich die Lichtabsorption nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz wellenlängenabhängig als Funktion der Konzentration der enthaltenen Pigmente:

$$PFD_{abs}(\lambda) = PFD_0(\lambda) \cdot (1 - \exp(-A(\lambda) \cdot L)) \quad (4.30)$$

$$A(\lambda) = (\epsilon_{\text{Chla}}(\lambda) \cdot c_{\text{Chla}} + \epsilon_{\text{PBP}}(\lambda) \cdot c_{\text{PBP}} + \epsilon_{\text{Car}}(\lambda) \cdot c_{\text{Car}}) \quad (4.31)$$

Das Lambert-Beer'sche Gesetz wird aufgrund einer kleinen Zelldichte und dem damit verbundenen geringen vorhandenen Lichtgradienten angewendet. Die Streuung wird durch Geometrie („gekrümmte dünne Schicht“) ausgemittelt bzw. durch experimentelle Ermittlung angenähert.

Da das Lambert-Beer'sche Gesetz ausschließlich für monochromatisches Licht gültig ist, muss es aufgrund der hier verwendeten Lampe für den Fall polychromatischen Lichts erweitert werden. Die angewendete Lösung basiert auf dem Literaturhinweis von Cassano et al. (1995), bei dem das Emissionsspektrum der verwendeten Lampe in Intervalle unterteilt wird, innerhalb deren das Lambert-Beer'sche Gesetz angewendet werden kann.

Somit wurde die gemessene relative Strahlungsdichte der Lampe über dem betrachteten Wellenlängenbereich (380 nm bis 700 nm) integriert.

In einer aufwendigeren Modellierungsstufe wurden auch intrazelluläre Abschattungseffekte (inner filter effects) sowie die Refraktärzeiten der einzelnen Photosysteme berücksichtigt.

Nachdem die gesamte absorbierte Photonenflussdichte errechnet ist, wird mittels der nächsten Funktion die Anzahl an Photonen, die von den Mikroalgen absorbiert werden kann, ermittelt (s. Abschnitt 4.4.2).

### Betriebsart

Die Matrixgleichung wird aufgelöst und die neu errechneten spezifischen Produktionsraten der verschiedenen Zell- und Flüssigphasen-Komponenten werden bestimmt. Aus den ermittelten spezifischen Raten werden die jeweiligen Konzentrationen  $c_K$  in Abhängigkeit von der Kultivierungsart (Batch, Fed-Batch oder kontinuierlich) nach folgender Gleichung ermittelt:

$$\frac{dc_i(t)}{dt} = \frac{q(t)}{V_R} \cdot (c_{i,\text{ein}}(t) - c_{i,\text{aus}}(t)) + r_i \cdot c_x(t) \quad (4.32)$$

Parallel zu diesem Block wird die Gas-Bilanzierung in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert durchgeführt.

### Gas-Bilanzierung

Dieser Block wird aus der vorangegangenen Arbeit (Csögör, 2000) unverändert übernommen. In dieser Funktion werden der Stoffübergang für Sauerstoff und Kohlendioxid sowie die Gleichgewichtsreaktionen in der Flüssigphase betrachtet. Das Wachstum der Mikroalgen wird durch die Bildungsraten von Sauerstoff und Kohlendioxid berücksichtigt.

Unterschiedliche Annahmen werden für die Realisierung dieses Blocks getroffen:

- Der durch das System strömende Gasvolumenstrom sei konstant. Diese Annahme ist dann erfüllt, wenn der photosynthetische Quotient gleich eins ist. Außerdem beträgt der CO<sub>2</sub>- Anteil im Gas maximal 2,5 Vol %.
- Angenommen wurde ebenso, dass der Kopfraum vollständig durchmischt ist, d.h. dass die Abgaszusammensetzung der im Kopfraum entspricht.
- Das Gleichgewicht an der Phasengrenze stelle sich unendlich schnell nach dem Henry- Dalton'schen Gesetz ein (Arrua et al., 1990),

$$c_{\text{CO}_2, \text{Gas}} = c_{\text{CO}_2}^* \cdot H_{\text{CO}_2} \text{ und} \quad (4.33)$$

$$c_{\text{O}_2, \text{Gas}} = c_{\text{O}_2}^* \cdot H_{\text{O}_2} \quad (4.34)$$

wobei die Henry-Koeffizienten aufgrund der Ionenstärke korrigiert werden müssen.

Der Stoffübergang von der Phasengrenze ins Innere der Flüssigkeit wird nach dem ersten Fick'schen Gesetz berechnet.

$$\text{CTR} = k_1 a_{\text{CO}_2} \cdot (c_{\text{CO}_2}^* - c_{\text{CO}_2}) \text{ und} \quad (4.35)$$

$$\text{OTR} = k_1 a_{\text{O}_2} \cdot (c_{\text{O}_2}^* - c_{\text{O}_2}) \quad (4.36)$$

$c_{\text{CO}_2}$  und  $c_{\text{O}_2}$  stellen die Konzentrationen in der Flüssigphase dar. Der Widerstand wird im flüssigkeitsseitigen Diffusionskoeffizient  $k_1$  berücksichtigt, der durch Multiplikation mit der volumenbezogenen Austauschfläche den experimentell bestimmbaren  $k_1 a$ -Wert ergibt. Er wurde experimentell ermittelt.

Für die Einstellung des Gleichgewichtes in der Flüssigphase sind verschiedene Differentialgleichungen maßgeblich, die die Hydratation von CO<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und

dessen Dissoziation zu  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{CO}_3^{2-}$  in der Gegenwart des Puffers Tris beschreiben. Bei pH-Werten zwischen 7 und 8 ist der letzte Dissoziationsprozess zu vernachlässigen, da kein Carbonat vorliegt (Bailey, Ollis, 1986). Außerdem ist die Konzentration von  $\text{H}_2\text{CO}_3$  unabhängig vom pH-Wert konstant und sehr niedrig, so dass zur Vereinfachung mehrere Reaktionsschritte



zusammengefasst wurden.

Die genaue Zusammenstellung der hier verwendeten Gleichungen befindet sich detailliert in der zitierten Arbeit beschrieben (Csögör, 2000).

Das hier vorgestellte mathematische Modell enthält insgesamt 80 Variablen. Die Größenordnung der Parameter wurde entweder aus der Literatur entnommen, experimentell ermittelt oder mittels eines Optimierungsprogramms geschätzt. Die Liste aller verwendeten Variablen sowie ihre Herkunft befindet sich in Anhang A7. Dagegen sind in Tabelle 4.11 die verschiedenen Parameter, die im Verlauf der durchgeführten Simulationen geschätzt wurden, aufgeführt. Durch die geringe Anzahl geschätzter Parameter verfügt das mathematische Modell über große Freiheitsgrade.

**Tabelle 4.11:** Auflistung der Anpassungsparameter, die mittels des verwendeten Optimierungsalgorithmus berechnet wurden, deren Funktion und Ort.

Parameter	Beschreibung	Ort
$y_{ATP,O_2}$	Ausbeutekoeffizient: Entstehung von Mol ATP pro Mol Sauerstoff	Lichtreaktion
$k_{iPS_{ges}}$	Verstärkungsfaktor für fPS	Dunkelreaktion
$k_{iPS}$	Verstärkungsfaktor für iPS	Dunkelreaktion
$y_{KonstPS}$	Verhältnis von fPS zu gesPS	Dunkelreaktion
$y_{Chla\_PBP}$	Verhältnis von Chl a zu PBP	Dunkelreaktion
$y_{PBP,CH_2O}$	Ausbeutekoeffizient: Bildung von Gramm PBP pro Gramm Zucker	Dunkelreaktion

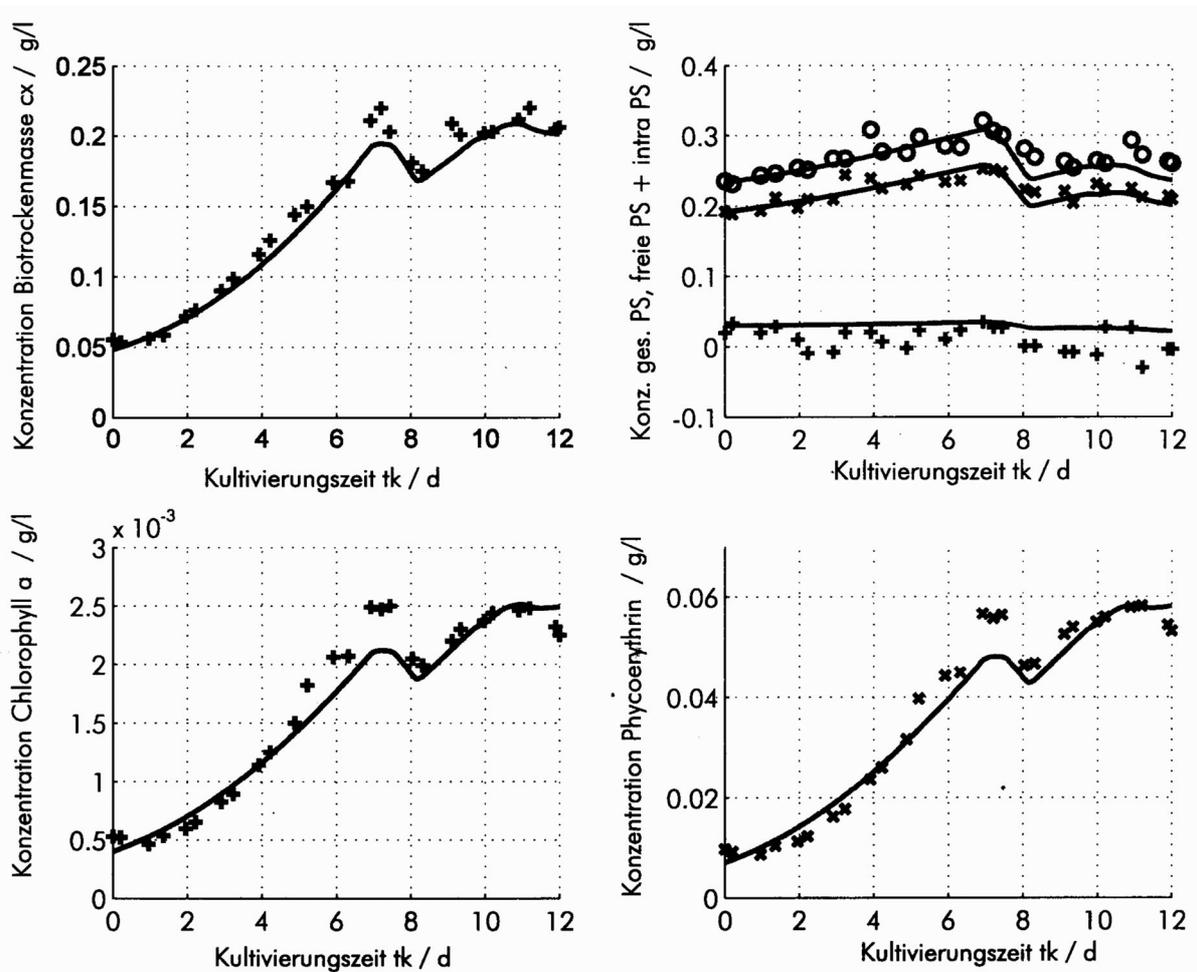
## 4.5 Simulationsergebnisse

Das entwickelte mathematische Modell wurde für alle Kultivierungen mit Dauerbeleuchtung angewendet, die simulierten und die experimentellen Ergebnisse wurden anschließend verglichen. Die erzielten Ergebnisse sind im nächsten Abschnitt dargestellt.

### 4.5.1 Simulationsergebnisse für Dauerbeleuchtung

Mittels des mathematischen Modells wurden unterschiedliche Kultivierungen nachsimuliert, die mit Dauerbeleuchtung durchgeführt wurden. Exemplarisch werden an dieser Stelle Simulationsergebnisse von zwei Kultivierungen mit unterschiedlichen Lichtintensitäten präsentiert.

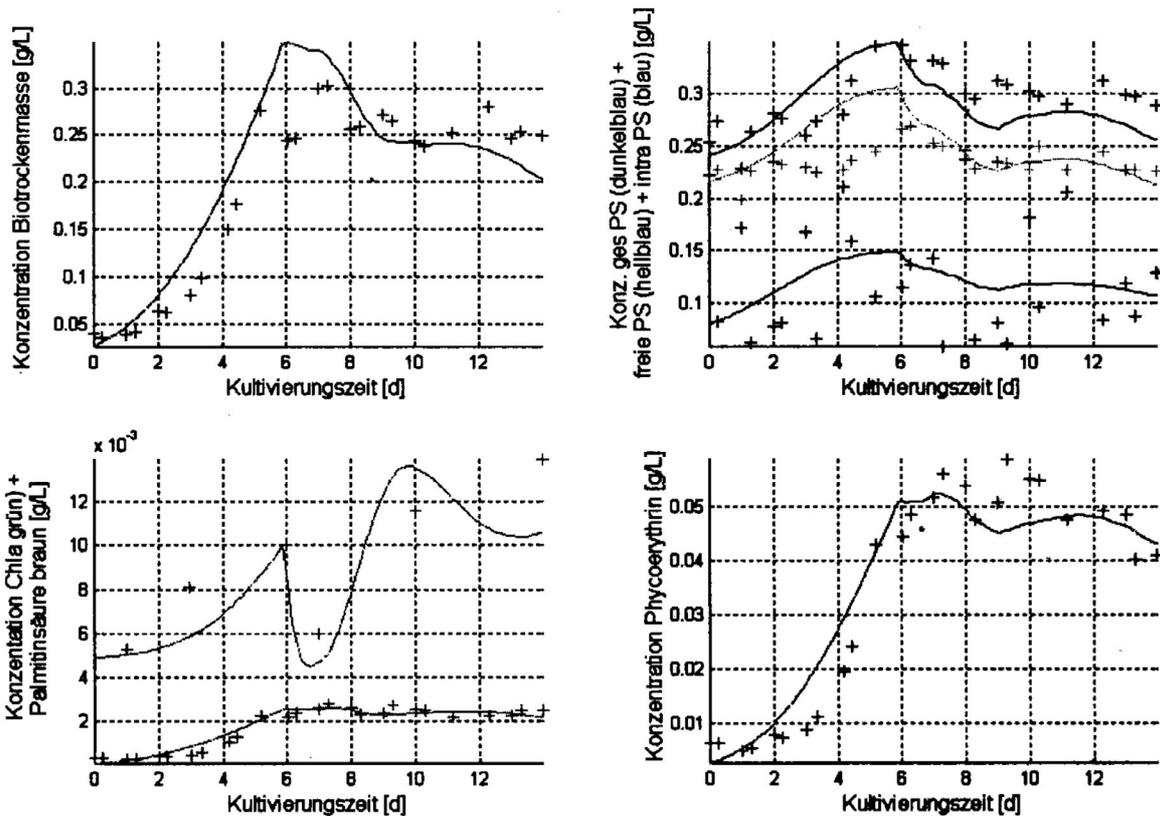
In Abbildung 4.17 graphisch dargestellt sind sowohl die simulierten (durchgezogene Linien) als auch die experimentellen Daten (Kreuze) für sechs der Makromoleküle während einer Kultivierung der Rotalge *Porphyridium purpureum* bei konstanter Beleuchtungsintensität von  $10 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ , sowohl in der Batch- als auch in der kontinuierlichen Phase.



**Abbildung 4.17:** Experimentelle und simulierte Ergebnisse einer Kultivierung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* bei konstanter Beleuchtungsintensität von  $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  im Verlauf von Batch- und kontinuierlicher Kultivierungsphase.

Mit dem entwickelten mathematischen Modell wurde demnach im Fall der kleinsten realisierten Photonenflussdichte eine gute Übereinstimmung zwischen den simulierten und den experimentellen Daten gefunden. Um den ganzen experimentell untersuchten Bereich abzudecken, wurden auch Kultivierungen mit höherer Photonenflussdichte nachsimuliert.

In Abbildung 4.18 befinden sich die Ergebnisse einer Kultivierung von *Porphyridium purpureum* mit einer Lichtintensität von  $72 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .



**Abbildung 4.18:** Experimentelle und simulierte Ergebnisse einer Kultivierung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* bei konstanter Beleuchtungsintensität von  $72 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  im Verlauf von Batch- und kontinuierlicher Kultivierungsphase.

Zusätzlich zu der vorherigen Simulation wurde in diesem Fall ebenfalls die Konzentration an Palmitinsäure, der prozentual in *Porphyridium purpureum* am meisten enthaltenen Fettsäure, nachsimuliert.

Im Vergleich zu der Simulation mit kleinerer Lichtintensität weichen hier im Verlauf der Batch-Phase die simulierten und die experimentellen Ergebnisse voneinander ab.

Dies lässt sich auf die in diesem Fall ausgeprägt lange Lag-Phase zurückführen, die im mathematischen Modell so nicht enthalten ist.

Alle geschätzten Parameter der mit Dauerbeleuchtung durchgeführten Kultivierungen wurden in Tabelle 4.12 tabellarisch zusammengefasst.

**Tabelle 4.12:** Geschätzte Parameter mittels des Simplexverfahrens nach Nelder und Mead (1965) für vier verschiedene Lichtintensitäten

<b>Lichtintensität</b> $I / \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	<b>Einheit</b>	<b>10</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>72</b>
$y_{\text{ATP},02}$	$\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	2,032	1,473	0,330	0,654
$k_{\text{iPSges}}$	$\text{l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	1,361	2,385	0,482	6,960
$k_{\text{iPS}}$	$\text{l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	0,121	0,363	0,785	5,560
$y_{\text{konstPS}}$	-	0,798	0,684	0,505	0,822
$y_{\text{Chla\_PBP}}$	-	0,042	0,045	0,046	0,052
$y_{\text{PBP,CH20}}$	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0,143	0,112	0,120	0,099
<b>Funktional</b>		7	434	8	211

Durch die Schätzung der Verstärkungsparameter der P-Regler der Polysaccharide werden sowohl Veränderungen im Verstärkungsfaktor als auch mögliche Abweichungen der experimentell ermittelten Polysaccharid-Sollwerte abgefangen.

Ein nichtlineares (überproportionales) Reglerverhalten der Polysaccharid-Regler in Abhängigkeit von der Lichtintensität wurde beobachtet, da mit zunehmender Lichtintensität eine Zunahme der Verstärkungsparameter festzustellen ist. Mit zunehmender Lichtintensität nimmt ebenso die Verdünnungsrate zu, wodurch sich der Polysaccharid-Gradient im Reaktor vergrößert. Die Mikroalgen scheinen in der Lage zu sein, dies kompensieren zu können, indem sie schneller reagieren.

Das geschätzte Pigmentverhältnis zwischen Chlorophyll a und Phycoerythrin bleibt für alle vier durchgeführten Kultivierungen fast identisch. Die ermittelten Parameter stimmen mit dem sonst ermittelten experimentellen Verhältnis zwischen den beiden vorhandenen Pigmenten überein. Tabellarisch sind die geschätzten und experimentellen Werte in Tabelle 4.13 dargestellt.

**Tabelle 4.13:** Simuliertes und geschätztes Pigmentverhältnis zwischen Chlorophyll a und Phycoerythrin

Lichtintensität I / $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	10	25	50	72
(Chla/Phy) geschätzt	0.0420	0.045	0.046	0.052
(Chla/Phy) experimentell	0.0432	0.042	0.046	0.052

Erkennbar anhand dieser Ergebnisse ist eine exakte Übereinstimmung zwischen den simulierten und den experimentellen Daten. Die Annahme im mathematischen Modell, die ein festes Verhältnis zwischen Chlorophyll a und Phycoerythrin voraussetzt, scheint zumindest für den Schwachlichtbereich gerechtfertigt zu sein.

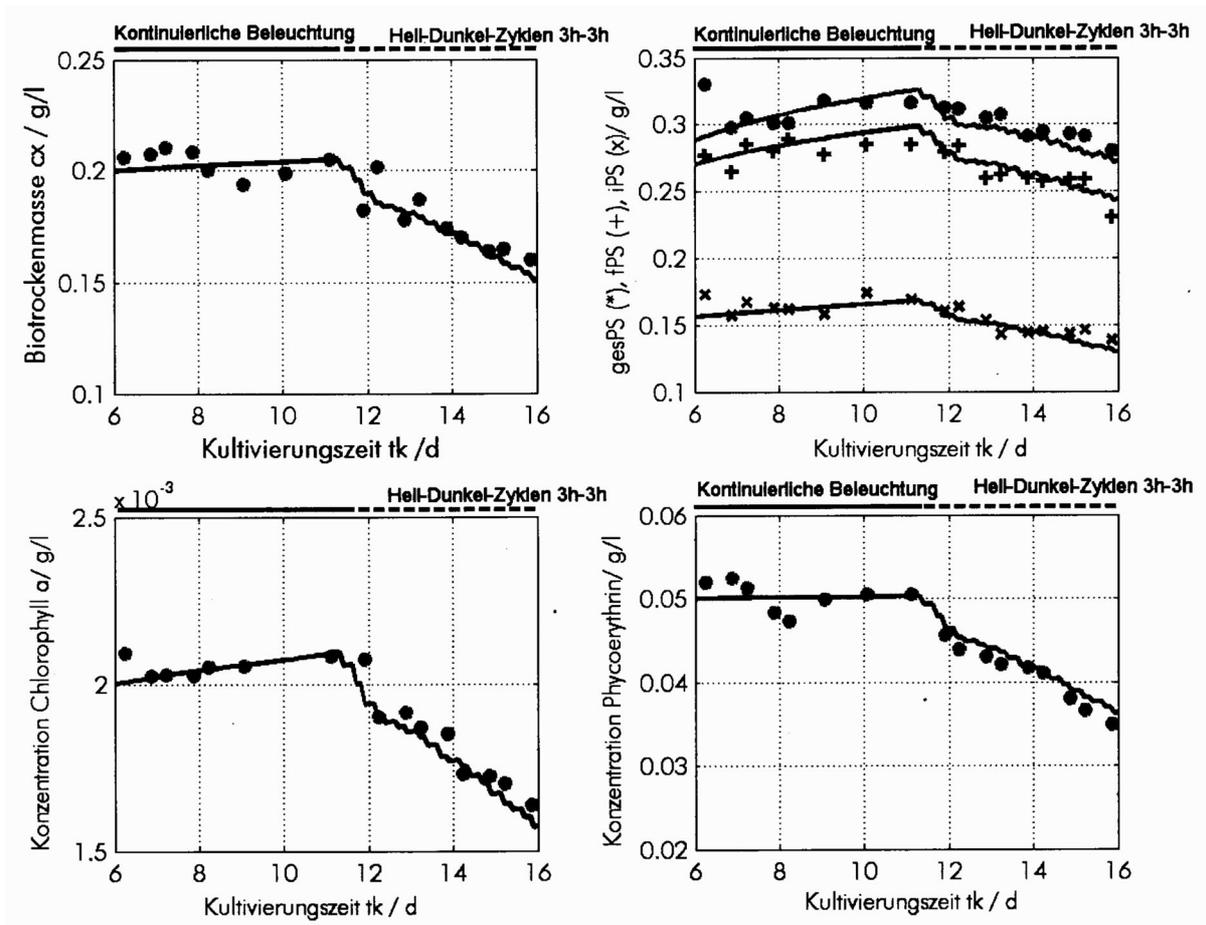
Parallel zur Simulation mit Dauerbeleuchtung wurde das Modell ebenso angewendet, um Kultivierungen mit längeren Hell-Dunkel-Zyklen nachzusimulieren. Die dabei erzielten Ergebnisse werden im nächsten Abschnitt vorgestellt.

#### 4.5.2 Simulationsergebnisse bei diskontinuierlicher Beleuchtung

Durch die Betrachtung der gesamten Stoffwechselaktivität der Mikroalgen können mit dem mathematischen Modell sowohl Dauerbeleuchtung als auch zyklische Beleuchtung simuliert werden.

Zur Veranschaulichung wird der Verlauf von zwei simulierten Kultivierungen mit Hell-Dunkel-Zyklen im Stunden-Bereich vorgestellt.

In Abbildung 4.19 sind sowohl die simulierten (durchgezogene Linien) als auch die experimentellen Daten (Kreuze) für sechs der Makromoleküle während einer Kultivierung der Rotalge *Porphyridium purpureum* im Turbidostat-Betrieb dargestellt. In der ersten Phase wurden die Mikroalgen einer konstanten Photonenflussdichte von  $25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ausgesetzt, anschließend wurde ein dreistündiger Hell-Dunkel-Zyklus realisiert.



**Abbildung 4.19:** Experimentelle und simulierte Ergebnisse einer Kultivierung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* im Turbidostat-Betrieb. Im Verlauf der ersten Phase konstante Photonenflussdichte von  $25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , anschließend Realisierung von dreistündigen Hell-Dunkel-Zyklen.

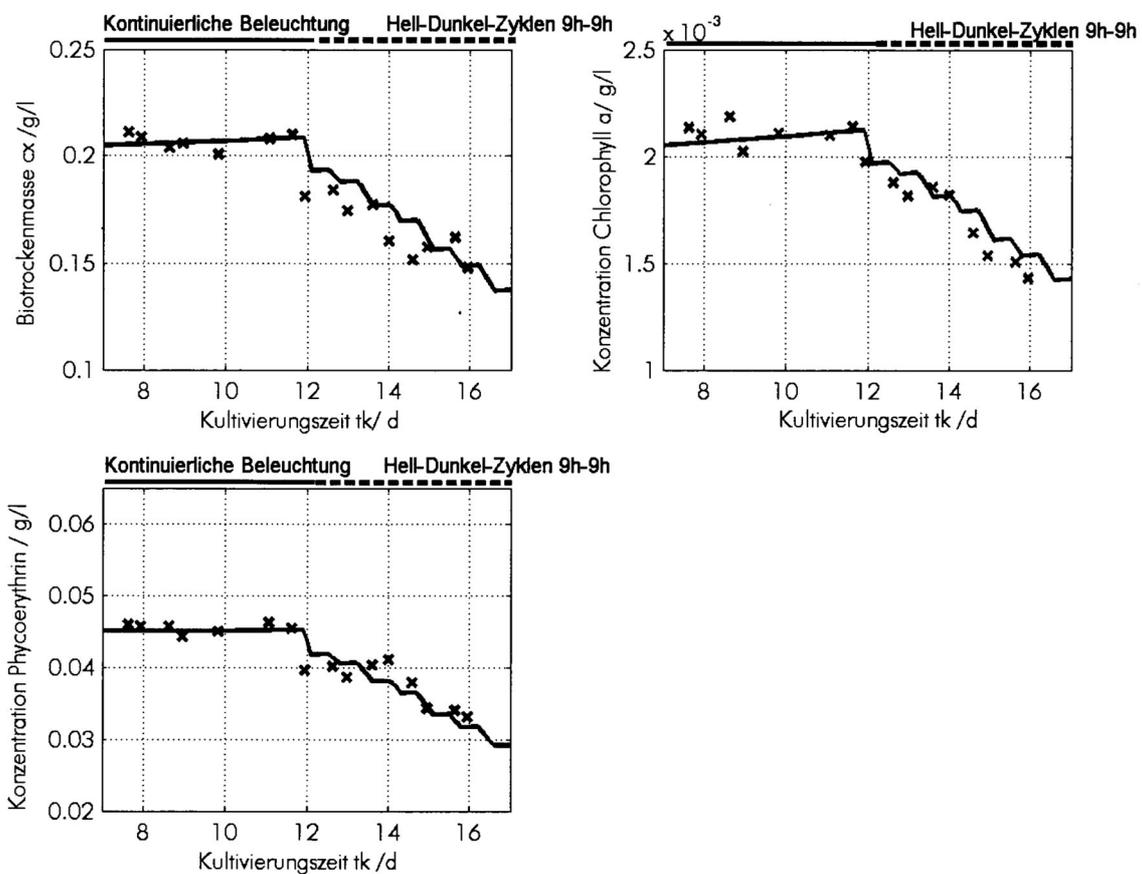
Anhand der gewonnenen Ergebnisse kann auch hier eine gute Übereinstimmung zwischen den simulierten und den experimentell ermittelten Werten festgestellt werden.

Die gemessene Abnahme der unterschiedlichen gebildeten Makromoleküle beim Einsatz der zyklischen Beleuchtung wird durch das mathematische Modell gut beschrieben. Der besondere Bildungsmechanismus der Polysaccharide, der im Modell mit einem P-Regler nachgebildet wurde, wurde in beiden betrachteten Phasen, d.h. bei Dauerbeleuchtung und bei zyklischer Beleuchtung, gut in Bezug auf die gemessenen Werte wiedergegeben.

Durch die Simulation wurde festgestellt, dass die Abnahme der Pigmente schneller stattfindet als die der Biotrockenmassenkonzentration.

Die experimentellen Untersuchungen zum Einfluss von längeren Zyklen auf das Wachstum und die Produktbildung der Mikroalgen haben unabhängig von der Dauer der realisierten Zyklen eine fast identische spezifische Produktbildungsrate ergeben. Dies wurde ebenso durch das mathematische Modell wiedergegeben.

Um dies zu belegen, sind in Abbildung 4.20 sowohl die simulierten (durchgezogene Linien) als auch die experimentellen Daten (Kreuze) für neunstündige Hell-Dunkel-Zyklen dargestellt. Identisch mit dem Kultivierungsverlauf der vorherigen Kultivierung (Abbildung 4.19) ist zu Beginn eine Turbidostat-Phase mit konstanter Photonenflussdichte von  $25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  vorgeschaltet, anschließend folgt die Phase mit den Hell-Dunkel-Zyklen.



**Abbildung 4.20:** Experimentelle und simulierte Ergebnisse einer Kultivierung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* im Turbidostat-Betrieb. Im Verlauf der ersten Phase konstante Photonenflussdichte  $25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , anschließend Realisierung von neunstündigen Hell-Dunkel-Zyklen.

Ein nahezu identisches Verhalten für die beiden Zyklen ist sowohl bei den experimentellen Daten untereinander als auch zwischen den Simulationsergebnissen feststellbar.

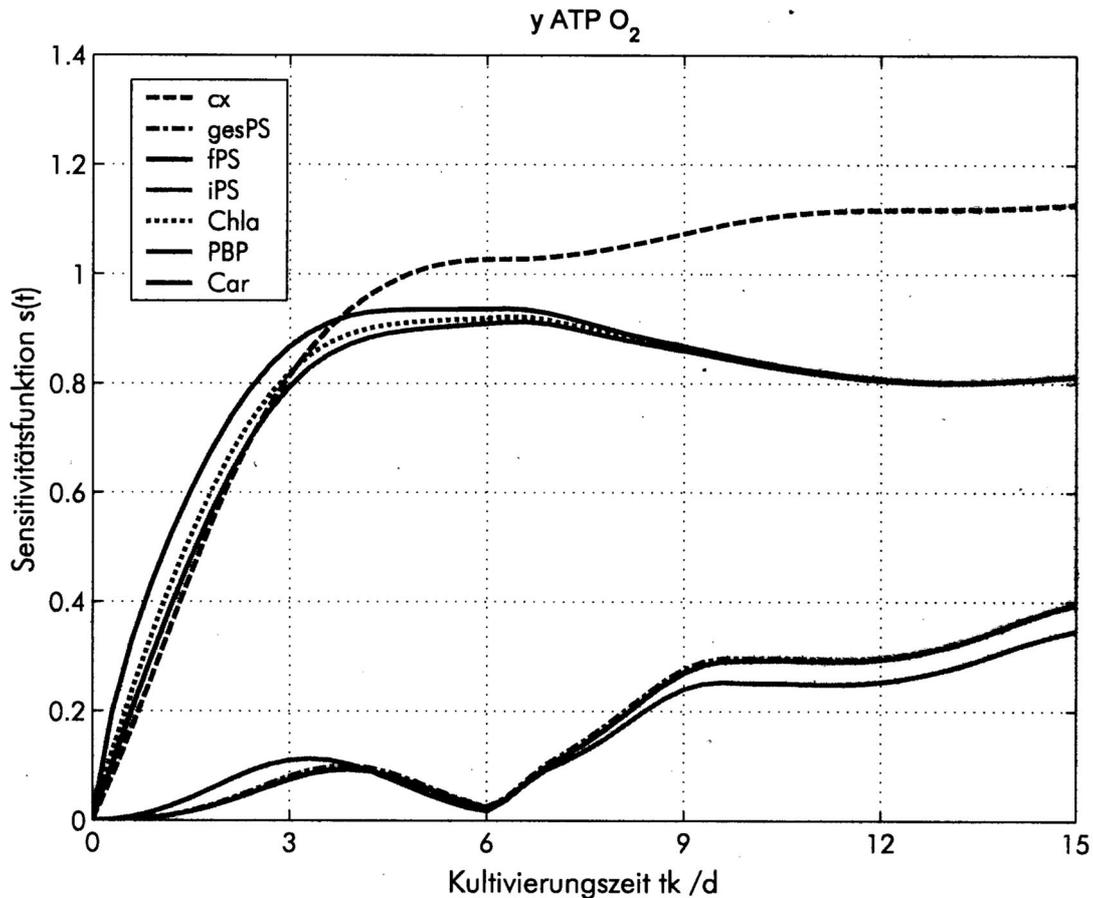
Ähnliche Ergebnisse wurden für die beiden anderen Zyklen im Stunden-Bereich erzielt. Die Simulationsergebnisse zeigen wie die experimentellen Daten keine Abhängigkeit von der Zyklendauer. Anmerkung: Bei diesen Kultivierungen wurde das Verhalten der Polysaccharide außer Acht gelassen, da die experimentellen Daten zu stark voneinander abwichen.

Wie diese Simulationsergebnisse gezeigt haben, können mittels des entwickelten mathematischen Modells die experimentell gewonnenen Daten nicht nur im Batch- und kontinuierlichen Betrieb, sondern auch bei Veränderung der Lichtquantität und Lichtqualität im Stunden-Bereich mit einer sehr guten Übereinstimmung nachgebildet werden.

### 4.5.3 Parameterschätzgenauigkeit

Bei der Bestimmung der unbekannt Parameter von umfangreichen Modellen treten nicht nur numerische Probleme wie unzureichende Konvergenzgeschwindigkeiten bei der Parameteridentifikation und nicht eindeutigen Parametersätzen auf. Schwerwiegender ist die Gefahr von schlecht lokalisierbaren oder verdeckten Modellfehlern. Bei gleichzeitiger Bestimmung aller Parameter können einzelne unkorrekte Annahmen noch zu scheinbar guten Anpassungen führen, da alle Parameter, und nicht nur die für diese Annahmen relevanten, zur Minimierung des Fehlers beitragen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, ein für ein bestimmtes Modell und ein bestimmtes Gütefunktional berechnetes Optimum auf seine Sensitivität bzgl. Veränderungen der Eingänge, der Gewichtungsfaktoren und der Modellparameter zu testen.

In Abbildung 4.21 sind die Sensitivitätsfunktionen der gebildeten Makromoleküle in Abhängigkeit vom Ausbeutekoeffizienten  $y_{ATP,02}$  dargestellt.



**Abbildung 4.21:** Darstellung der ermittelten Sensitivitätsfunktionen für alle sechs Makromoleküle des Modells in Abhängigkeit von der Veränderung des Ausbeutekoeffizienten  $y_{ATP,O_2}$

Die erhaltenen Kurvenverläufe deuten nicht auf eine Linearabhängigkeit zwischen den hier ermittelten Parametern hin.

Zusätzlich zur Berechnung der Sensitivitätsfunktion liefert die Berechnung der Fisher-Informationsmatrix  $F$  bzw. ihrer Eigenvektoren und Eigenwerte Informationen über die Schätzgenauigkeit der Parameter.

Die Fisher-Informationsmatrix ergibt sich zu:

$$\vec{F} = \sum_{i=1}^n \vec{Y}_P(t_i) \cdot \vec{C}^{-1} \cdot \vec{Y}_P(t_i)^T \quad (4.38)$$

Für die Kultivierung mit der höchsten realisierten Photonenflussdichte von  $72 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  wurde für zwei der sechs zu schätzenden Parameter die Fisher-Informationsmatrix berechnet. Die Eigenvektoren, die Eigenwerte und die dabei entstehenden Fehler wurden tabellarisch zusammengefasst.

**Tabelle 4.14:** Zusammenfassung der ermittelten Fisher-Informationsmatrix für zwei der sechs zu schätzenden Parameter

Parameter	$k_{iPS_{ges}}$	$k_{iPS}$
Eigenvektor	(-0,9993/-0,0386)	(0,0386/-0,9993)
Eigenwert	3,59 e+04	1,18 e+04
Fehler $\sigma$	0,53 %	0,92 %

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen für die beiden Reglerkonstanten, die die spezifische freie und intrazelluläre Polysaccharidbildung beschreiben, eine sehr geringe Standardabweichung. Die Ungenauigkeit der Schätzung dieser Parameter ist für die durchgeführten Kultivierungen somit sehr klein.

Die Ermittlung der Sensitivitätsfunktion sowie die Berechnung der Fisher-Informationsmatrix wurde für alle simulierten Ergebnisse durchgeführt. Alle ermittelten Sensitivitätsfunktionen zeigten für keine der durchgeführten Simulationen einen Hinweis auf lineare Abhängigkeiten zwischen den Parametern, zusätzlich lag der Fehler, der durch die Fisher-Informationsmatrix ermittelt wurde, immer unterhalb von 10 %, was für eine hohe Schätzgenauigkeit spricht.

## 5 Diskussion

Eine Vielzahl an Kultivierungen mit der einzelligen Rotalge *Porphyridium purpureum* wurde mittels eines homogen bestrahlten Photo-Bioreaktors durchgeführt. Dabei wurden das Wachstum und die Produktbildung dieser Mikroalge in Abhängigkeit von der Lichtqualität und der Lichtquantität untersucht. Begleitend zu diesen Kultivierungen wurden unterschiedliche Nachweismethoden eingeführt, um die Anzahl der charakterisierbaren Makromoleküle in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen zu erhöhen. Die gewonnenen experimentellen Ergebnisse dienten dazu, simulierte Ergebnisse unterstützen zu können, die mit einem mathematischen Modell generiert wurden. Des Weiteren wurden durch die Interpretation der experimentellen Ergebnisse Rückschlüsse auf das biologische Verhalten der Mikroalgen gewonnen.

### 5.1 Kultivierungen der einzelligen Alge *Porphyridium purpureum*

Die monoseptische Kultivierung der Mikroalgen erfolgte in einem gleichmäßig durchleuchteten Reaktor in Turbidostat-Betriebsweise. Die Kultivierungsbedingungen wurden ständig kontrolliert und geregelt. Dadurch bestand die Möglichkeit, unter genau definierten Bedingungen Informationen über die physiologischen Eigenschaften der Mikroalge zu gewinnen. Die gewählten Kultivierungsbedingungen wurden der Literatur (Csögör, 2000) entnommen. Die verwendeten Kultivierungsparameter basieren auf mehreren Literaturangaben. Somit fanden Iqbal und Zafar (1993), dass die höchsten Wachstumsraten für *P. purpureum* bei 2,5 % CO<sub>2</sub> in der Zuluft bei einer Begasungsrate von 500 l · min<sup>-1</sup> und einer Lichtintensität von 75 μE · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> erreicht wurden. Bei der Betrachtung dieser Literaturbefunde wurde berücksichtigt, dass die angegebene Photonenflussdichte an der Oberfläche des Reaktors ermittelt wurde und somit aufgrund der großen Zelldichte nur einen kleinen Anteil des Reaktors charakterisiert.

Bedingt durch das kleine Arbeitsvolumen des verwendeten Photo-Bioreaktors und die hohe Empfindlichkeit der Mikroalgen wurde die Begasungsrate so gewählt, dass sich einerseits ein genügend großer Gaseintrag ergab, jedoch andererseits die Kohlendioxid-Abweichung für eine genauere Messung herangezogen werden konnte.

Sie betrug  $80 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  und wurde für alle durchgeführten Kultivierungen konstant gehalten. Alle Versuche wurden bei einer konstanten Temperatur von  $20^\circ \text{C}$  durchgeführt. Die ausgewählte Temperatur liegt unterhalb des Optimums für die Wachstumsrate (Rezanka et al., 1987; Lee et al., 1988) und die spezifische Polysaccharidbildungsrate (Iqbal et al., 1993), das bei  $25^\circ \text{C}$  liegt, ist aber geeignet für die Bildung der Fettsäuren (Rezanka et al., 1987).

## 5.2 Dauerbeleuchtung

### 5.2.1 Einfluss der Lichtintensität auf das Wachstum

Die spezifischen Wachstumsraten der einzelligen Rotalge *Porphyridium purpureum* unter lichtlimitierten Bedingungen wurden sowohl im Batch-Betrieb als auch im kontinuierlichen Betrieb in den verwendeten Photo-Bioreaktoren charakterisiert. Für die beiden Betriebsarten wurde eine lineare Abhängigkeit zwischen den spezifischen Wachstumsraten und der eingestellten Photonenflussdichte gefunden. Für die derzeit höchste realisierbare Photonenflussdichte von  $72 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  lag die spezifische Wachstumsrate im Batch-Betrieb bei  $0,46 \text{ d}^{-1}$ . Die bestimmten spezifischen Wachstumsraten stimmen mit vergleichbaren Angaben in der Literatur (Rezanka et al., 1987, Merchuk et al., 1998) und mit den Ergebnissen, die im selben Photo-Bioreaktor in einer vorangegangenen Arbeit gewonnen worden waren, überein (Csöggör, 2000).

Die spezifischen Wachstumsraten, die im kontinuierlichen Betrieb ermittelt wurden, lagen bei identischer Lichtintensität unterhalb der spezifischen Wachstumsraten des Batch-Betriebs. Für die höchste Photonenflussdichte von  $72 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  lag die Wachstumsrate zum Beispiel bei  $0,44 \text{ d}^{-1}$ . Die Daten des kontinuierlichen Betriebs konnten nicht mit Literaturangaben verglichen werden, da zu wenige Angaben zum Verhalten der Mikroalge *Porphyridium purpureum* im Turbidostat-Betrieb vorliegen.

Die beobachtete Abweichung zwischen den ermittelten spezifischen Wachstumsraten im Batch- und im kontinuierlichen Betrieb bei identischer Photonenflussdichte könnte ihre Ursache in der unterschiedlichen ermittelten Polysaccharidproduktivität während der beiden Betriebsarten haben. Die spezifische Polysaccharidbildungsrate im kontinuierlichen Betrieb entsprach mindestens dem Dreifachen der Rate im Batch-Betrieb bei identischer Photonenflussdichte. Um diese

Erhöhung an Polysacchariden bei gleicher Zuckerbildung ausgleichen zu können, scheinen die Mikroalgen die Produktbildung der anderen Makromoleküle und insbesondere die spezifische Wachstumsrate zu reduzieren. Der Grund für den Anstieg der Polysaccharidproduktivität im kontinuierlichen Betrieb wird in den nächsten Abschnitten erläutert werden.

### 5.2.2 Einfluss auf die Polysaccharidproduktivität

Eine große Anzahl von Untersuchungen zur Kultivierungsabhängigkeit der Polysaccharidbildungsrate wird in der Literatur angegeben. Die Bildung der Polysaccharide von *Porphyridium purpureum* wird beeinflusst vom Salzgehalt des verwendeten Kultivierungsmediums, vom pH-Wert, von der Kultivierungstemperatur (Jones et al., 1963; Golueke und Oswald, 1962; Sommerfeld und Nichols, 1970; Minkova et al., 1987; Gudin et Chaumont, 1991) sowie vom Stickstoffgehalt (Arad et al., 1988; Iqbal et al., 1992).

In Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich der Einfluss der Lichtqualität und Lichtquantität untersucht.

Eine Zunahme der spezifischen Polysaccharidbildungsrate mit zunehmender Lichtintensität wurde sowohl im Batch- als auch im kontinuierlichen Betrieb beobachtet. Diese Lichtabhängigkeit der Produktivität wurde auch in mehreren Literaturstellen erwähnt (Arad et al., 1985; Minkova et al., 1987).

Anhand der ermittelten Ergebnisse war ein deutlicher Unterschied zwischen der spezifischen Polysaccharidbildungsrate im Batch- und im kontinuierlichen Betrieb feststellbar. Bei gleicher Photonenflussdichte wurde im kontinuierlichen Betrieb eine gegenüber dem Batch-Betrieb bis zu dreifach erhöhte spezifische Polysaccharidbildungsrate ermittelt.

Die vielen durchgeführten Kultivierungen haben einen identischen Wert der Polysaccharidkonzentration unabhängig von der eingestellten Lichtqualität oder Lichtquantität gezeigt. Die Mikroalgen streben offenbar eine konstante Polysaccharidkonzentration im Nährmedium an. Im Verlauf der Kultivierung versuchen die Mikroalgen, ihre Konzentration an Polysacchariden im Nährmedium aufrecht zu erhalten. Im Fall des kontinuierlichen Betriebs werden die neu gebildeten Polysaccharide ständig aus dem Reaktor ausgetragen. Um diesen Austrag ausgleichen zu können, erhöht die Alge die Polysaccharidproduktion zu Ungunsten

der spezifischen Wachstumsrate. Dies führte bei konstanter Biomassenkonzentration - wie hier gegeben - zu einer scheinbaren Abhängigkeit zwischen der spezifischen Wachstumsrate und der spezifischen Polysaccharidbildungsrate wie bereits in der Literatur qualitativ beobachtet wurde. Literaturhinweise berichten über ähnliche Beobachtungen. Arad (1983) stellte fest, dass bei nicht vorhandener Lichtlimitierung aber existenter Stickstofflimitierung die überschüssige Energie in Polysaccharide investiert wird. Gleiches trifft im Fall des Batch-Betriebs jedoch nicht zu.

Die unterschiedliche Polysaccharidproduktivität, die durch die Betriebsart hervorgerufen wird, könnte demnach auch eine Erklärung für die Differenz der spezifischen Wachstumsraten zwischen den beiden Betriebsarten sein. Die ausgetragene Polysaccharidmenge hängt von der Zuflussrate ab, die wiederum von der Lichtintensität abhängt. Ähnliche Beobachtungen sind in der Literatur zu finden, so fand Fábregas, dass die Polysaccharidproduktivität mit steigender Verdünnungsrate zunimmt (Fábregas et al., 1998).

Über die Funktion der Polysaccharide, die auch von anderen Algen und weiteren Mikroorganismen gebildet werden, gibt es keine gesicherten Erkenntnisse. Mögliche Funktionen werden gesehen in der aktiven Bewegung oder für die Anhaftung an Oberflächen; daneben werden die Möglichkeit der mechanischen Stabilisierung des Habitus sowie der Schutz vor Austrocknung oder auch vor Virenbefall diskutiert.

Alle hier zitierten Funktionen der Polysaccharide treten jedoch bei der Kultivierung im Photo-Bioreaktor nicht auf. Aus diesem Grund wurden spezifische Kultivierungen durchgeführt, die nähere Informationen zum Verhalten der Polysaccharidproduktivität liefern sollten. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Abschnitt 5.4 beschrieben.

### **5.2.3 Einfluss der Dauerbeleuchtung auf den Pigmentgehalt**

Während der Batch-Kultivierung sanken die Pigmentgehalte der Zelle zunächst und stiegen später wieder an. Die spezifischen Pigmentbildungsraten lagen anfangs der Batch-Phase unter der spezifischen Wachstumsrate der Mikroalge. Dies hielt umso länger an, je größer die Photonenflussdichte war. In Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Anzahl an Photonen wurde die Pigmentbildungsrate zu Gunsten der Biotrockenmassenkonzentration mit Verzögerung nachgebildet.

In Fall des Batch-Betriebs lag die Pigmentbildungsrate unabhängig von der Photonenflussdichte stets in der gleichen Größenordnung von  $0,058 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Bei der

kontinuierlichen Kultivierung wurde eine leichte Zunahme der Pigmentproduktivität mit zunehmender Photonenflussdichte beobachtet, das Niveau lag jedoch unter demjenigen des Batch-Betriebs. Die vorhandene Abweichung zwischen den beiden Betriebsarten könnte wiederum aufgrund der hohen Polysaccharidbildungsrate im kontinuierlichen Betrieb hervorgerufen werden. Durch die Erhöhung der Polysaccharidproduktivität im kontinuierlichen Betrieb (im Vergleich zum Batch-Betrieb) wird die physiologische Aktivität der Mikroalge allgemein zu Gunsten der Bildung der Polysaccharide verschoben. Dies kann dazu geführt haben, dass im Fall des kontinuierlichen Betriebs bei gleichbleibender Photonenflussdichte im Vergleich zum Batch-Betrieb eine kleinere spezifische Pigmentbildungsrate sowie eine kleinere spezifische Wachstumsrate erreicht wurde.

Mehrere Literaturstellen (Ley und Butler 1980, Cunningham et al., 1992) berichten dagegen über eine umgekehrte Proportionalität der spezifischen Pigmentbildungsrate mit der Photonenflussdichte. Eine Zunahme des Lichtangebots war von einer Abnahme der Pigmentbildungsrate begleitet.

Ein direkter Vergleich zwischen den Ergebnissen aus der Literatur und den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen konnte nicht durchgeführt werden, da sich die Lichtintensitätsangabe auf einen von außen beleuchteten Reaktor ohne eindeutiges Lichtprofil bezog, während in dieser Arbeit ein von innen beleuchteter Reaktor mit homogener Lichtverteilung verwendet wurde.

Es ist aber nicht auszuschließen, dass im Fall der Kultivierung im Schwachlichtbereich keine Umkehrproportionalität der Pigmentbildungsrate in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte zu finden ist, da die Mikroalgen sich in diesem Lichtbereich möglicherweise noch im Aufbau ihrer Pigmentausrüstung befinden. Es ist denkbar, dass die Mikroalgen zuerst eine maximale spezifische Pigmentbildungsrate erreichen müssen, bis sie - wie in der Literatur erwähnt ist - ihre Pigmentproduktivität dem Lichtangebot anpassen.

## **5.2.4 Einfluss der Dauerbeleuchtung auf die Fettsäurebildung**

Bei den drei am meisten gebildeten Fettsäuren Palmitinsäure (C16:0), Linolsäure (C18:2) und Arachidonsäure (C20:4) wurde eine Abnahme der spezifischen Bildungsrate mit zunehmender Photonenflussdichte beobachtet. Dagegen fand mit zunehmender Lichtintensität eine Abnahme der spezifischen Bildungsrate von Eicosapentaensäure (C20:5) statt.

Mehrere Befunde aus der Literatur bestätigen die Zunahme der Fettsäurebildungsrate mit zunehmender Lichtintensität, nicht aber ihre Abnahme (Ahern et al., 1983, Kohzin et al., 1997, Rezanka et al., 1987).

## **5.3 Diskontinuierliche Beleuchtung**

### **5.3.1 Zyklen im Sekunden-Bereich**

#### **5.3.1.1 Einfluss auf die spezifische Wachstumsrate**

Die Untersuchung des Einflusses von zyklischer Beleuchtung im Bereich von Sekunden hat in den letzten 10 Jahren stark zugenommen. Immer mehr Literaturberichte sind zu finden, die die Auswirkungen solcher Hell-Dunkel-Zyklen auf das Wachstum der Mikroalgen untersuchen. Ein möglicher Vorteil solcher Zyklen wird in der besseren Ausbeute der photosynthetischen Systeme vermutet, da die maximale Kapazität der nachgeschalteten Schritte der Photosynthese nicht wie im Fall einer Dauerbeleuchtung überschritten wird. Damit wird vermieden, dass die photosynthetische Einheit zu ineffizienter Fluoreszenz gezwungen wird (Camacho et al., 2003).

Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, zeigen eine Abnahme der spezifischen Wachstumsrate mit zunehmender Zyklendauer. Eine lineare Abnahme der spezifischen Wachstumsrate in Abhängigkeit von der Zyklendauer konnte nicht festgestellt werden. Für die beiden realisierten Zyklen mit einer Dauer von 1s und 3s wurde eine leichte Abnahme der ermittelten spezifischen Wachstumsrate gefunden. Dagegen bewirkte die Realisierung von längeren Hell-Dunkel-Zyklen eine bis zu fünfzigprozentige Reduzierung der spezifischen Wachstumsrate. Merchuk (Merchuk et al., 1998) untersuchte ebenfalls den Einfluss

von Zyklen im Sekunden-Bereich. Er fand dabei heraus, dass unter lichtlimitierten Kultivierungsbedingungen die spezifische Wachstumsrate der Mikroalge *Porphyridium purpureum* mit der Zunahme der Dauer der realisierten Dunkelphase abnimmt. Diese Befunde konnten bei den realisierten Hell-Dunkel-Zyklen bestätigt werden.

Die in dieser Arbeit ermittelte spezifische Wachstumsrate bei den unterschiedlichen Hell-Dunkel-Zyklen lag wesentlich tiefer als bei Dauerbeleuchtung für die gleiche gemittelte Photonenflussdichte. Diese Beobachtung wird ebenfalls in mehreren Literaturstellen gemacht, dabei wurden die jeweils durchgeführten Versuche ausschließlich im Lichtsättigungsbereich realisiert. So fand Janssen (Janssen et al., 1999), dass die Mikroalgen *C. reinhardtii* und *C. sorokiniana* während Hell-Dunkel-Zyklen zwischen 13 und 87 Sekunden selbst bei Lichtsättigung nicht in der Lage sind, ausreichende Energie in der Hell-Phase zu speichern, um dieselbe spezifische Wachstumsrate wie bei Dauerbeleuchtung aufrecht zu halten.

Ähnliche Befunde werden von Janssen et al. (2000 b), Grobbelaar (1989), Nedbal et al. (1996) und Sager et al. (1980) berichtet.

Viele der hier erwähnten Literaturstellen stützen sich auf die Beobachtungen von Rabinowitch (1956), der zu dem Schluss kam, dass die photosynthetische Effizienz bei Hell-Dunkel-Zyklen höchstens gleich groß sein kann wie bei Dauerbeleuchtung, nicht jedoch größer.

Bei den durchgeführten Experimenten sind unterschiedliche Stoffwechselaktivitäten der Mikroalgen zwischen Zyklen von drei Sekunden und von sechs Sekunden Dauer erkennbar. Die Dauer der Dunkelphase von sechs Sekunden beeinflusst die spezifische Wachstumsrate der Mikroalgen wesentlich stärker als bei drei Sekunden. Eine mögliche Erklärung des Verhaltens der Mikroalgen könnte mit Erkenntnissen aus Literaturangaben gefunden werden. Merchuk (Merchuk et al., 1998) zeigte, dass bei Lichtsättigung die Mikroalge *Porphyridium sp.* ihre maximale spezifische Wachstumsrate sogar bei einem Hell-Dunkel-Zyklus mit einer Dunkelphase von maximal sechs Sekunden aufrecht halten kann.

Die Erklärung für dieses Verhalten kann nicht mehr wie im Fall der Blitzlichtversuche in der Elektronentransportkette der Photosynthese gefunden werden, sondern in langsameren Vorgängen aufgrund größerer Zeitkonstanten. Merchuk et al. begründet dieses Verhalten mit der Fähigkeit der Mikroalgen, ihre absorbierte Lichtmenge regulieren zu können, indem sie kontinuierlich den Auf- oder Abbau der Proteine D1

der photosynthetischen Einheit PSII steuern. Die Funktion der Proteine D1 (Aro et al., 1993) wird oft in Verbindung mit der Photoinhibition gesetzt. Bei zu starker Beleuchtung werden die Proteine D1 vollständig abgebaut, dies verursacht so lange bis eine Unterbrechung der Photosyntheseaktivität der betreffenden photosynthetischen Einheit, bis die Proteine regeneriert werden. Somit wird die photosynthetische Kettenreaktion geschützt.

Aber nicht nur im Fall einer starken Beleuchtung sondern ebenso bei normaler Beleuchtung findet ein Abbau der Proteine D1 statt. Nach Merchuk (1998) erfolgte in der Dunkelphase eine Bildung der Proteine D1, die die Lichtabsorptionsfähigkeit der Mikroalge in der nächsten Hellphase verstärken sollte. Somit gelingt es den Mikroalgen, längere Dunkelphasen im Bereich von Sekunden überbrücken zu können. Mit einem ähnlichen Gedanken untersuchte Janssen et al. (1999b) die Möglichkeit, den Abstand der Mikroalgen zur Lichtquelle zu variieren und somit den Aufbau der Proteine D1 zu beeinflussen. Die Ergebnisse für zwei unterschiedliche Mikroalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella sorokiniana* zeigen keinen signifikanten positiven Einfluss von zyklischer Beleuchtung im Vergleich zu einer Dauerbeleuchtung. Lee und Pirt (1981) untersuchten das Verhalten der Mikroalge *Chlorella*. Sie fanden dabei heraus, dass die spezifische Wachstumsrate der Mikroalge bis zu einer Dunkelphase von neun Sekunden nicht beeinflusst wurde. Lee und Pirt stellten die Hypothese auf, dass die Mikroalgen die gewonnene Energie aus der Lichtreaktion speichern und somit die Dunkelphase überbrücken können. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass bei den beiden zitierten Literaturstellen die Länge von Hell- und Dunkelphase ungleichmäßig war. Die Hell-Phase war jeweils wesentlich länger als die Dunkelphase.

Ähnliche Untersuchungen für den Schwachlichtbereich sind in der Literatur nicht zu finden. Denkbar wäre zum einen, dass die gebildeten primären Energiespeicher  $H^+$  und ATP im Fall des Schwachlichtbereichs schneller verbraucht werden als bei Starklicht, was zu einer Verkürzung der maximal überbrückbaren Dunkelphase führen kann. Dies könnte ein möglicher Grund dafür sein, dass die Mikroalgen in der Lage sind, im Starklichtbereich eine Dunkelphase von bis zu neun Sekunden, im Schwachlichtbereich jedoch nur bis zu drei Sekunden überbrücken können, bevor es zu einer bemerkbaren Veränderung kommt.

Zum anderen könnten auch andere Ursachen die unterschiedliche Wirkung der Zyklendauer erklären. Weis (Weis, 1981) berichtet über lichtgesteuerte Enzyme, die

für den Photosynthese-Prozess verantwortlich sind. Ihre Aktivität nimmt mit abnehmender Dauer der Dunkelphase zu und verursacht somit eine Verbesserung der Photosyntheseaktivität mit schnelleren Zyklen. Dies könnte ein Grund sein, weshalb die Mikroalgen bei einer Zyklendauer von einer Sekunde höhere Wachstumsraten aufweisen als bei Zyklen mit einer Dauer von neun Sekunden. Eine Extrapolation der Ergebnisse ist nur bedingt möglich, da die Versuche im Starklichtbereich stattgefunden haben. Ähnliches berichtet Merchuk (1998) über die Regulation der absorbierten Lichtmenge durch den ständigen Abbau oder Aufbau der Proteine der photosynthetischen Einheit. Da die Anzahl der vorhandenen Proteine mit der Anzahl vorhandener Pigmente korreliert, kann im Starklichtbereich wahrscheinlich eine längere Dunkelphase als im Schwachlichtbereich überbrückt werden.

Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden, liefern nicht ausreichende Informationen, um eine genauere Aussage zur Ursache der unterschiedlichen Stoffwechselaktivität der Mikroalgen in Abhängigkeit von der Zyklendauer treffen zu können.

#### ***5.3.1.2 Einfluss der Zyklen im Sekunden-Bereich auf die Polysaccharidbildung***

Die spezifischen Polysaccharidbildungsraten während der vier realisierten Hell-Dunkel-Zyklen weichen kaum voneinander ab und sind somit unabhängig von der jeweils errechneten spezifischen Wachstumsrate. Die unterschiedliche Auswirkung der Dauer der Hell-Dunkel-Zyklen machte sich nicht in der errechneten spezifischen Bildungsrate bemerkbar. Der Hauptgrund für die fast identische spezifische Polysaccharidbildungsrate ist eventuell in der sehr geringen Abweichung der eingestellten Verdünnungsrate bei allen vier durchgeführten Versuchen zu suchen.

### **5.3.1.3 Einfluss der Zyklen im Sekunden-Bereich auf die Pigmentbildung**

Die spezifische Phycoerythrinbildungsrate lag bei den Zyklen mit einer Dauer von einer Sekunde und drei Sekunden in derselben Größenordnung. Dagegen nahm die spezifische Phycoerythrinbildungsrate - identisch zum Verhalten der spezifischen Wachstumsrate - oberhalb einer Zyklendauer von sechs Sekunden ab.

Insgesamt lag die spezifische Phycoerythrinbildungsrate niedriger als bei Dauerbeleuchtung mit gleicher Photonenflussdichte. Die errechneten Ergebnisse widersprachen damit Literaturangaben.

Janssen (Janssen, 2000b) stellte bei *C. reinhardtii* eine Zunahme der Chlorophyllproduktivität bei Einsatz von Hell-Dunkel-Zyklen im Vergleich zu Dauerbeleuchtung fest. Diese Versuche fanden jedoch im Starklichtbereich statt.

## **5.3.2 Zyklen im Stunden-Bereich**

Der Einfluss von Zyklen im Stunden-Bereich auf Wachstum und Produktbildung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* wurde während der gesamten Kultivierungsphase betrachtet.

### **5.3.2.1 Einfluss auf die spezifische Wachstumsrate**

Die spezifische Wachstumsrate bei den realisierten Zyklen wurde für die durchgeführten Kultivierungen ermittelt. Sie lag in allen vier Fällen unterhalb der ermittelten spezifischen Wachstumsrate bei kontinuierlicher Beleuchtung und identischer gemittelter Photonenflussdichte.

Ähnliche Ergebnisse fand Hosono (Hosono, 1997) bei der Untersuchung des Einflusses von Zyklen im Stunden-Bereich auf das Wachstum der Mikroalge *Chlorella pyrenoidosa*. Er stellte keinen Einfluss der Zyklendauer (12h-12h, 3h-3h, 1h-1h) auf die errechnete spezifische Wachstumsrate fest.

### **5.3.2.2 Einfluss der Stunden-Zyklen auf die Polysaccharidbildung**

Die spezifische Polysaccharidbildungsrate war für die vier durchgeführten Zyklen fast identisch. Genauso wie bei den zuvor beschriebenen Zyklen im Sekunden-Bereich war die spezifische Polysaccharidbildungsrate ausschließlich von der Verdünnungsrate der Versuche abhängig. Die Verdünnungsrate in den Versuchen variierte von  $11,8 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$  bei einer Zyklendauer von drei Stunden bis zu  $15 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$  im Fall der zwölfstündigen Zyklen. In derselben Größenordnung veränderte sich die spezifische Polysaccharidbildungsrate.

Durch die Konstanzhaltung der Verdünnungsrate wurde eine Proportionalität zur ermittelten spezifischen Wachstumsrate beobachtet.

### **5.3.2.3 Einfluss der Stunden-Zyklen auf die Pigmentbildung**

Insgesamt lag die spezifische Phycoerythrinbildungsrate tiefer als bei gleicher Photonenflussdichte und Dauerbeleuchtung. Eine mögliche Interferenz der Pigmentbildung mit der Umschaltdynamik der Transkription oder der Translation der Zelle könnte die Abnahme der Pigmentbildungsrate erklären.

Es konnte aber keine Abhängigkeit der Pigmentbildungsrate von der realisierten Zyklendauer beobachtet werden.

Die Analyse der Auswirkung des Einschalt- bzw. des Ausschaltvorgangs des Lichtes auf die Bildung der Pigmente hat gezeigt, dass die Lichtabwesenheit im Durchschnitt mit einer Abnahme der Pigmentbildungsrate verbunden war. Dagegen wurde die Lichtphase von einer Zunahme der Pigmentbildungsrate begleitet, die dabei jedoch tendenziell kleiner war als in der Dunkelphase.

### 5.3.3 Zyklen im Millisekunden-Bereich

#### 5.3.3.1 Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung

Die beiden realisierten schnelleren Zyklen bewirkten sowohl eine sehr starke Reduzierung der ermittelten spezifischen Wachstumsrate als auch eine Abnahme der ermittelten Produktbildung. Die Auswirkungen der eingesetzten rotierenden Scheibe waren in beiden Fällen innerhalb von zwei Kultivierungstagen bemerkbar. Die online eingestellte Verdünnungsrate sank in beiden Fällen fast auf null, ohne damit einen Anstieg der Biotrockenmassenkonzentration zu erreichen. Das schlechte Wachstum machte sich zusätzlich optisch bemerkbar. Die Rotfärbung der Mikroalgen verschwand, die Zellen blichen aus.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei hohen Strahlungsdichten festgestellt. Hohe Strahlungsdichten können zu kurz- oder langfristigen Schäden der Pigmente, der Strukturproteine, der Enzyme und der Lipide (in Membranen etc.) führen. Wenn die absorbierte Lichtenergie die Kapazität des photosynthetischen Apparates weit übersteigt, kommt es zu photochemischen Reaktionen (Bildung freier Radikale, Photooxidation) oder photophysikalischen Destruktionen (Bleichung). Überoptimale Strahlung liegt nicht nur dann vor, wenn die Lichtintensität den Sättigungspunkt überschreitet, sondern auch schon bei niedrigen Bestrahlungsstärken, wenn das Wachstum durch andere Faktoren (Nährstoffmangel, Temperatur) begrenzt ist.

Die Wirkung von Blitzlicht im Starklichtbereich auf phototrophe Mikroorganismen wurde von Gerbsch (1997) untersucht. Dabei wurde die integrierte Lichtintensität  $I_a$  in Form der mittleren Lampenleistung konstant gehalten und unter Variation der Blitzfrequenzen und Blitzenergien die Sauerstoffbildungsrate als Antwort des photosynthetischen Systems gemessen. Die erzielten Ergebnisse zeigen für die Mikroalge *Porphyridium purpureum* bei konstanter mittlerer Lampenleistung einen linearen Anstieg der Sauerstoffbildungsrate mit der Frequenz. Der Übergang zu positiven Sauerstoffbildungsraten liegt im Fall von Starklichtuntersuchungen bei 10Hz. Diese Befunde unterstützen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, bei denen weder bei 10Hz noch bei 20Hz im Schwachlichtbereich eine spezifische Wachstumsrate der Mikroalgen beobachtet wurde. Eine mögliche Erklärung dieses physiologischen Verhaltens der Mikroalgen könnte mit der Dauer

der Zyklen zusammenhängen. Die Dauer der realisierten Zyklen hat möglicherweise Wechselwirkungen mit physiologischen Vorgängen in der Zelle wie zum Beispiel dem Aufbau des Protonengradienten. Denkbar ist auch, dass - wie Camacho et al. (2003) berichtete - die enzymatisch nachgeschaltete Reaktion der Photosynthese den limitierenden Schritt darstellt. Eine Verschiebung des Übergangs zu positiven Sauerstoffbildungsraten zu 10Hz bei Starklicht und 20 Hz bei Schwachlicht scheint vorhanden zu sein. Weitere experimentelle Untersuchungen bei höheren Frequenzen sollten durchgeführt werden, um die hier gewonnenen Ergebnisse bestätigen zu können. Ein Vergleich mit der Literatur war für den Schwachlichtbereich nicht möglich, da diesbezüglich keine Literaturstellen gefunden wurden.

Zusammengefasst wurde tabellarisch (Tabelle 5.1) der Einfluss aller realisierten Hell-Dunkel-Zyklen auf Wachstum und Produktbildung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* dargestellt.

**Tabelle 5.1:** Tabellarische Darstellung der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$ , der spezifischen Phycoerythrinbildungsrate  $r_{\text{Phy}}$  und der Gesamtpolysaccharidbildungsrate der Mikroalge *Porphyridium purpureum* in Abhängigkeit von der Zyklendauer.

Dauer der Hell-Dunkel-Zyklen	$\mu$ /d <sup>-1</sup>	$r_{\text{Phycoerythrin}}$ /g.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	$r_{\text{gps}}$ /g.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>
12h - 12h	0,1160	0,0240	-
9h - 9h	0,0845	0,0188	0,1521
6h - 6h	0,0953	0,0226	0,2378
3h - 3h	0,0921	0,0194	0,1440
9s - 9s	0,1024	0,0286	0,1599
6s - 6s	0,1055	0,0258	0,1238
3s - 3s	0,1798	0,0441	0,1397
1s - 1s	0,2055	0,0388	0,1534
0,05s - 0,05s	0,0171	0,0037	0,0253
0,025s - 0,025s	0,0614	0,0157	0,3050

Die durchgeführten Kultivierungen mit einer Zyklendauer von 12h bis 6s verursachten demnach eine identische Stoffwechselaktivität der Mikroalgen. Somit lagen die spezifische Wachstumsrate, die Phycoerythrinbildungsrate sowie die

Gesamtpolysaccharidbildungsrate für alle diese Versuche in der gleichen Größenordnung.

Eine Abweichung von diesem Verhalten fand sich zum einen bei der Realisierung der kürzesten Zyklen, zum anderen bei den beiden schnelleren Zyklen im Sekunden-Bereich. Die Auswirkung der Millisekunden-Zyklen fand im Rahmen dieser Arbeit keine Erklärung. Sie äußern sich jeweils mit einer rapiden Absenkung der Gesamtstoffwechselaktivität bis zur gesamten Bleichung der Zellen.

Die beiden schnelleren Zyklen im Sekunden-Bereich stellten die Zyklen mit der maximal erreichbaren spezifischen Wachstumsrate im Schwachlichtbereich dar.

Die biologische Ursache für dieses Verhalten könnte zum einen in der Möglichkeit der Speicherung der gewonnenen Energie (ATP) von Mikroalgen im Verlauf der Lichtphase begründet sein, zum anderen könnten lichtgesteuerte Enzyme oder Proteine für eine unterschiedliche Wirkung der Zyklendauer zuständig sein.

#### **5.4 Biologische Funktion der Polysaccharide**

Das unterschiedliche Produktivitätsverhalten zwischen den beiden untersuchten Betriebsarten sowie das bezüglich der eingestellten Lichtqualität und -quantität unabhängige Produktionsverhalten deuten auf einen speziellen Produktionsmechanismus der Polysaccharide hin. Wie bereits in der Literatur erwähnt, treten die zitierten möglichen biologischen Funktionen der Polysaccharide - wie zum Beispiel Schutz vor Austrocknung oder Anhaftung an den Oberflächen - nicht in einem Reaktor auf.

Wieso und durch welche Regelungsmechanismen die Mikroalgen ihre Polysaccharide bilden, ist bislang nur sehr wenig erforscht worden. Um der Antwort etwas näher zu kommen, wurde in mehreren Kultivierungen das Bildungsverhalten der Makromoleküle Polysaccharide detailliert untersucht. Durchgeführt wurde hierzu u.a. eine Reihe von Kultivierungen im Batch-Betrieb, die dabei gewonnenen Ergebnisse wurden durch Kultivierungen im kontinuierlichen Betrieb unterstützt.

Drei durchgeführte Batch-Kultivierungen, bei denen zum einen eigene Polysaccharide aus den Mikroalgen, Dextran oder vollentsalztes Wasser zugegeben wurden, zeigen eine Abnahme der spezifischen Polysaccharidbildungsrate zu Gunsten der spezifischen Wachstumsrate. Am stärksten ausgeprägt war dieses

Verhalten bei den Versuchen, bei denen die eigenen Polysaccharide der Mikroalgen zugegeben wurden. Die Zugabe von Polysacchariden scheint die Verteilung der Glucose zu Gunsten der Bildung der anderen Makromoleküle zu verschieben. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mikroalgen eine gewisse Wahrnehmung ihrer Umgebung besitzen. Sie scheinen in der Lage zu sein, die Konzentration an freien Polysacchariden im Nährmedium schätzen zu können. Diese hier neu eingeführte Wahrnehmung der Produktion eines ihrer Produkte durch die Mikroalgen könnte unter dem Begriff *Product Sensing* neu definiert werden.

Dieses Verhalten wurde durch die kontinuierliche Abtrennung der gebildeten Polysaccharide aus dem Reaktor mittels Querstrom-Filtration bestätigt. Begleitend zu diesen Versuchen wurde der Einfluss des ständigen Umpumpens sowie der Einfluss der Scherkräfte, die innerhalb der Querstrom-Filtration herrschen, auf das Wachstum und die Produktbildung der Mikroalgen untersucht. Dabei wurde das entgegengesetzte Verhalten zum Fall der Zugabe der Polysaccharide erzielt. Die spezifischen Bildungsraten aller Makromoleküle nahmen hier zu Gunsten der spezifischen Polysaccharidbildungsrate ab. Der Stress, den die Mikroalgen durch den Versuchsaufbau ohne Abtrennung erfahren, beeinflusst die Polysaccharidproduktivität ebenfalls positiv, diese ist aber im Wesentlichen eine Größenordnung kleiner als bei Abtrennung der Polysaccharide. Die Vermutung, dass die Mikroalgen eine konstante Konzentration an freien Polysacchariden im Nährmedium halten wollen, konnte mit diesem Kultivierungsergebnis bestätigt werden.

Ob die Polysaccharide oder andere Signalmoleküle für diese Regelung zuständig sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden.

Literaturstellen berichten über die Eigenschaft einiger Mikroorganismen, ihre eigene Zellkonzentration in ihrer Umgebung erfassen zu können. Die Erkennung der Zellkonzentration - auch Quorum-Sensing genannt - wurde schon von einigen anderen Mikroorganismen wie der Mikroalge *C. reinhardtii* oder Enterobakterien berichtet. Daneben wurde auch herausgefunden, dass einige phytopathogene Bakterien die Produktion extrazellulärer Polysaccharide über Pheromone regulieren, die sie produzieren und deren Konzentrationen sie detektieren (Denny, 1999). Keine Literaturhinweise wurden bislang jedoch gefunden, die solche Mechanismen für die zu untersuchende Mikroalge *Porphyridium purpureum* erwähnen.

## 5.5 Mathematisches Modell

Die beschriebenen Beobachtungen aus der Literatur auf Basis bekannter Stöchiometrie werden in einem mathematischen Modell quantitativ in Form eines Systems von Differentialgleichungen zusammengefasst.

Das entwickelte mathematische Modell beschreibt das Wachstum und die Produktbildung der untersuchten Mikroalge *Porphyridium purpureum*.

Die errechnete Lichtabsorption wird mit einer exponentiellen Abnahme der Anfangslichtintensität in Abhängigkeit von der enthaltenen Pigmentausstattung der Mikroalgen beschrieben. Dieser Ansatz lässt sich mit der geringen Zelldichte, d.h. mit dem geringen Lichtgradienten im Reaktor begründen.

Die Umsetzung in der Lichtreaktion erfolgt mit einem quasi-stationären Modell, in dem photosynthetisch aktive Einheiten angeregt werden und die Dauer der Reaktion durch nachgeschaltete Vorgänge vorgegeben ist (Relaxationszeit). Für den Verlauf der Photosynthese wird die Gültigkeit des Z-Schemas betrachtet. Im Fall der Lichtreaktion wird im Modell momentan die nicht zyklische und die zyklische Photophosphorylierung nicht getrennt berücksichtigt. Aus dem Zucker, der im Calvin-Zyklus gebildet wird, wurde die Bildung der unterschiedlichen Makromoleküle beschrieben. Die Bildung der Makromoleküle wurde mittels Massen- und Energiebilanzierungen sowie durch zusätzliche Annahmen beschrieben.

Die spezifische freie Polysaccharidbildungsrate und die spezifische intrazelluläre Polysaccharidbildungsrate wurden jeweils mittels eines P-Reglers beschrieben. Diese Annahmen basierten auf mehreren Kultivierungsergebnissen, die zeigten, dass die Mikroalgen ihre freie und auch ihre intrazelluläre Polysaccharidkonzentration auf einem konstanten Niveau aufrecht erhalten wollen, unabhängig von den vorhandenen Kultivierungsparametern. Die damit erzielten Simulationsergebnisse stimmen sehr gut mit den experimentellen Daten überein und rechtfertigen somit diese Annahme.

Angenommen wurde darüber hinaus, dass die spezifische Phycoerythrinbildungsrate vom gebildeten Zucker und nicht von der Photonenflussdichte abhängt. Diese Annahme beschreibt im Fall von Kultivierungen im Schwachlichtbereich sehr gut das Verhalten von Phycoerythrin. Eine Erweiterung der Annahme auf die vorhandene Photonenflussdichte im Starklichtbereich könnte empfehlenswert sein, da

Untersuchungen in diesem Lichtbereich eine dahingehende Abhängigkeit gezeigt haben.

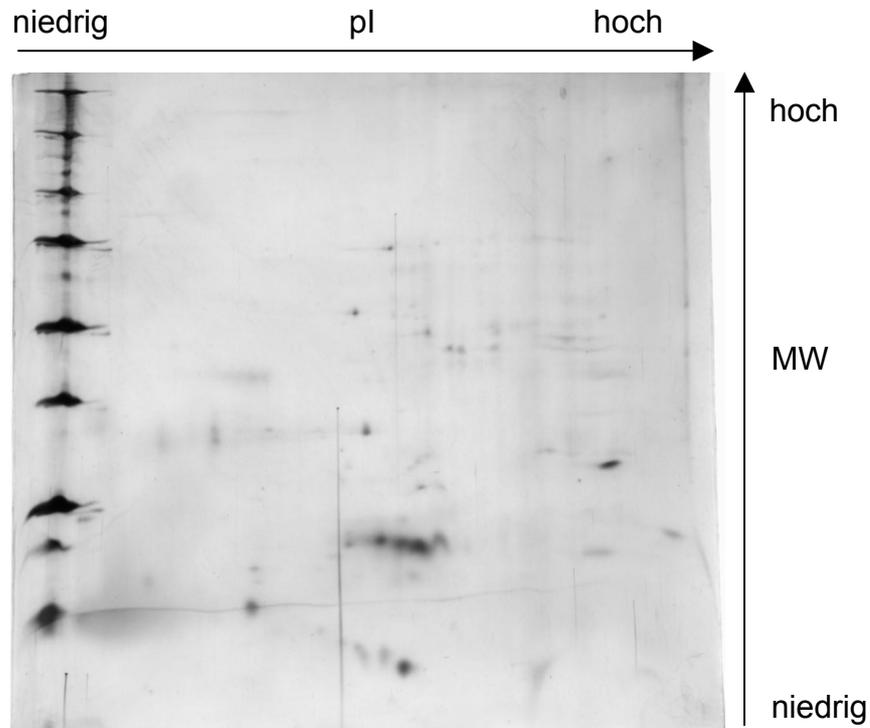
Ungenauigkeiten im Modell betreffen im Wesentlichen die dynamischen Übergänge zwischen verschiedenen Wachstumsbedingungen wie Batch- und kontinuierliche Prozessführung oder Übergänge zwischen verschiedenen Lichtstärken. Diese bisher nicht berücksichtigten Zeitkonstanten repräsentieren die Zelladaptation und haben ihre Ursache im Wesentlichen in der Transkription und der Translation zur Bildung neuer Proteine bzw. in der nach der Neubildung erst anlaufenden Produktion.

Dies könnte das Ziel der Weiterentwicklung des vorgestellten Modells darstellen. Dabei sollten nicht nur die Auswirkungen der Kulturparameter Lichtintensität und Lichtqualität auf die gebildeten Produkte – Pigmente, Polysaccharide, ungesättigte Fettsäuren – und auf die Wachstumsrate untersucht werden, sondern es sollten auch weitere intrazelluläre Makromoleküle in das Modell einbezogen werden.

Insbesondere sind Proteine zu identifizieren, die an der Regulation der Bildungsraten der Produkte beteiligt sind. Aus Sicht der Systemtheorie werden damit zum einen zusätzliche Zeitkonstanten im Modell berücksichtigt, die die dynamischen Reaktionen der Zellen bei Änderungen der Umgebungsbedingungen besser beschreiben. Zum anderen repräsentieren diese Regulationsmoleküle eine Mittelung der durch die Lichtfluktuationen auf der Stoffflussebene induzierten Schwankungen.

Diese Schwankungen der Umsatzraten und der Metabolitkonzentrationen sind sehr gering und daher messtechnisch kaum ohne größeren Aufwand zu erfassen. Ihre Auswirkung auf die Ebene der funktionellen Makromoleküle könnte jedoch mittels neuer Techniken wie der 2D-Elektrophorese sichtbar gemacht und identifiziert werden. Dazu könnten spezifische Proteine, welche phosphoryliert oder ubiquitiniert vorliegen, mittels massenspektroskopischer Methoden genauer identifiziert werden.

In Abbildung 5.1 befindet sich die Darstellung der Proteinmuster der Mikroalge *Porphyridium purpureum* nach einer zweidimensionalen Auftrennung der aufgereinigten Proteine. Die Auftrennung der Proteine erfolgte innerhalb der ersten Dimension aufgrund ihrer Ladung, innerhalb der zweiten Dimension wurden sie aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt.



**Abbildung 5.1:** Proteinmuster von *Porphyridium purpureum* nach zweidimensionaler Elektrophorese. Links ist ein Proteinmarker dargestellt

Perspektiven für die Erweiterung des strukturierten mathematischen Modells finden sich in der gesamtheitlichen Betrachtung von Stark- und Schwachlichtbereich aufgrund noch zu identifizierender Speicher, deren maximale Kapazität und Interferenz mit intrazellulären dynamischen Regelkreisen beschrieben werden sollen. Um dies erzielen zu können, müssen moderne Messmethoden, wie die Anwendung der 2D-Elektrophorese oder die Analyse der RNA der Mikroalgen eingeführt werden.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Versuche mit zyklischer Beleuchtung in Turbidostat-Betriebsweise unter definierten und geregelten Zuständen durchgeführt und dabei die Zellzusammensetzung bzw. die Zusammensetzung der Makromoleküle der Mikroalge *Porphyridium purpureum* genau erfasst.

Die Untersuchung der Auswirkung sowohl von Dauerbeleuchtung als auch von Hell-Dunkel-Zyklen unterschiedlicher Frequenzen auf Wachstum und Produktbildung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* stellte eine der Hauptzielsetzungen dieser Arbeit dar. Spezielle experimentelle Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Dynamik der Bildungsmechanismen der Polysaccharide näher verstehen zu können.

Alle im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen experimentellen Daten dienen dazu, das vorhandene mathematische Modell durch geeignete Annahmen zu erweitern und/oder zu verifizieren.

Die experimentellen Untersuchungen mit Dauerbeleuchtung zeigten eine lineare Abhängigkeit der Bildungsraten der unterschiedlichen Makromoleküle (spezifische Wachstumsrate, spezifische Pigmentbildungsrate oder spezifische Polysaccharidbildungsrate) von der Photonenflussdichte. Ähnliche Befunde wurden in der Literatur sowie in einer vorangegangenen Arbeit (Csögör, 2000) berichtet.

Begleitend zu den experimentellen Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Nachweismethoden neu etabliert, um möglichst viel Information über die Stoffwechselaktivität der zu untersuchenden Mikroalge in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen gewinnen zu können.

Die Ergebnisse der Hell-Dunkel-Zyklen zeigen unabhängig von der Dauer der Zyklen eine insgesamt kleinere Stoffwechselaktivität der Mikroalgen als bei einer gleich großen mittleren Photonenflussdichte unter Dauerbeleuchtung. Die Lichtausnutzungseffizienz der Mikroalgen scheint bei kontinuierlicher Beleuchtung besser zu sein als bei diskontinuierlicher Beleuchtung. Ähnliche Befunde werden in zahlreichen Literaturstellen berichtet. Nach der Hypothese von Rabinowitch (1956) kann bei der Anwendung von zyklischer Beleuchtung höchstens die gleiche aber nie eine höhere spezifische Wachstumsrate als bei Dauerbeleuchtung erzielt werden.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Verhaltensmuster der Mikroalgen in Abhängigkeit von der Zyklendauer beobachtet.

So verursachten die Zyklen im Stunden-Bereich (3h-6h-9h-12h) ein nahezu konstantes Verhalten der spezifischen Wachstumsrate. Auch bei den anderen Makromolekülen wurden nur geringe Änderungen festgestellt.

Dagegen verursachte die Realisierung der Hell-Dunkel-Zyklen im Millisekunden-Bereich eine rapide Abnahme der gesamten Stoffwechselaktivität der Mikroalgen bis hin zu ihrer vollständigen Bleichung. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Erklärung für dieses biologische Verhalten gefunden werden. So gut wie keine Literaturangabe deutet auf ein ähnliches Verhalten der Mikroalgen bei Einsatz von zyklischer Beleuchtung hin.

Die Zyklen im Sekunden-Bereich können nach den Ergebnissen in zwei Bereiche aufgeteilt werden. Die Hell-Dunkel-Zyklen mit einer Dauer von sechs und neun Sekunden riefen das gleiche Verhalten wie die Zyklen im Stunden-Bereich hervor. Die dabei ermittelte spezifische Wachstumsrate lag dementsprechend in derselben Größenordnung. Dagegen zeigten die Zyklen mit einer Dauer von einer und drei Sekunden die höchste spezifische Wachstumsrate von allen durchgeführten Hell-Dunkel-Zyklen.

Unterschiedliche Ursachen können herangezogen werden, um diese Ergebnisse zu erklären. Die biologische Ursache für dieses Verhalten könnte zum einen auf die Möglichkeit der Speicherung der gewonnenen Energie (ATP) durch die Mikroalgen im Verlauf der Lichtphase zurückgeführt werden, zum anderen könnten lichtgesteuerte Enzyme oder Proteine wie D1 für eine unterschiedliche Wirkung der Zyklendauer zuständig sein.

Diese Ergebnisse können eine große Hilfe für die Auslegung von realen Produktionsanlagen sein, da die hier realisierten Zyklen typischerweise auftretende Frequenzen von Produktionsanlagen darstellen. Gemäß den gemachten Beobachtungen sollten daher Zyklen mit einer Dauer von mehr als drei Sekunden vermieden werden.

Die Unabhängigkeit der Polysaccharidkonzentration von der Betriebsart, der Lichtqualität und der Lichtquantität hat zu der Hypothese geführt, dass die Mikroalgen versuchen, ihre freie Polysaccharidkonzentration auf einem konstanten Niveau aufrecht zu erhalten. Um dies nachweisen zu können, wurden Batch-Kultivierungen mit Zugabe von eigenen Polysacchariden, sowie kontinuierliche Kultivierungen mit kontinuierlicher Abtrennung der gebildeten Polysaccharide mittels Querstromfiltration durchgeführt. Die dabei erzielten Ergebnisse bestätigten die

aufgestellte Vermutung. Eine Absenkung der spezifischen Polysaccharidbildungsrate wurde bei der Zugabe eigener Polysaccharide beobachtet, dagegen eine Zunahme bei kontinuierlicher Abtrennung der Polysaccharide. Die hier gewonnenen Ergebnisse bieten die Möglichkeit, die Polysaccharidproduktivität je nach Wunsch gezielt zu beeinflussen und könnten daher für die Produktion von Polysacchariden in Produktionsanlagen sehr hilfreich sein. Der biologische Regulationsmechanismus, der für die Produktion der Polysaccharide zuständig ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit noch nicht entschlüsselt werden.

Schließlich wurde auf der Basis aller experimentellen Ergebnisse eine Erweiterung des mathematischen Modells für die Beschreibung des Wachstums und der Produktbildung der Mikroalge *Porphyridium purpureum* entwickelt. Das Modell berücksichtigt die Lichtabsorption durch das Lambert-Beer'sche Gesetz. Die Photosynthese wird auf der Grundlage des Z-Schemas beschrieben. Die Bildung der zu simulierenden Makromoleküle wurde mit Annahmen modelliert, die aus den experimentellen Daten, wie z.B. zur Regulation der Polysaccharidbildung, und aus Literaturangaben entnommen wurden.

Die Simulationsergebnisse zeigen bei Dauerbeleuchtung für verschiedene Photonenflussdichten sowohl im Batch- als auch im kontinuierlichen Betrieb eine gute Korrelation mit den Kultivierungsergebnissen. Ähnlich gute Ergebnisse wurden bei den Simulationen der diskontinuierlichen Beleuchtung gefunden. Die Robustheit des entwickelten Modells wurde mit Hilfe von Sensitivitätsfunktionen überprüft.

Ungenauigkeiten im Modell bestehen derzeit noch im Wesentlichen bezüglich der dynamischen Übergänge zwischen verschiedenen Wachstumsbedingungen wie Batch/Turbidostat-Prozessführung oder zwischen verschiedenen Lichtstärken. Die bisher nicht berücksichtigten Zeitkonstanten repräsentieren die Zelladaptation und haben ihre Ursache in erster Linie in der Transkription und der Translation zur Bildung neuer Proteine bzw. in der nach der Neubildung erst anlaufenden Produktion. Dies könnte ein Ziel der Weiterentwicklung des vorgestellten Modells darstellen.

## 7 Literaturverzeichnis

**Adda M., Merchuk J.C., Arad S.**, Effect of nitrate uptake on growth and production of cell-wall polysaccharide by the unicellular red alga *Porphyridium*, *Biomass*, 1986, 10, 131-140.

**Ahern T.J., Katoh S., Sada E.**, Arachidonic acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*. *Biotech Bioeng*, 1983, 25, 1057-1070.

**Alle M.B.**, List of cultures maintained by the laboratory of comparative biology, Ed Richmond C.A., Kaiser Foundation Research Institute, 1960.

**Arad S., Adda M., Cohen E.**, The potential of production of sulphated polysaccharides from *Porphyridium*, *Plant and Soil*, 1985, 89, 117-125.

**Arad S., Friedman O., Rotem A.**, Effect of nitrogen on polysaccharide production in a *Porphyrdium sp.*, *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54, 2411-2414.

**Aro E.M., Virgin I., Andersson B.**, Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover, *Biochimica et Biophysika Acta*, 1993, 1143, 113-134.

**Arrua L.A., McCoy B.J., Smith J.M.**, Gas-liquid mass transfer in stirred tanks. *AIChE Journal*, 1990, 36, 1768-1772.

**Bailey J.E., Ollis D.F.**, *Biochemical engineering fundamentals*. McGraw-Hill Book Company, 1986.

**Baquerisse D., Nouals S., Isambert I., Ferrereira Dos Santos P., Durand G.**, Modelling of a continuous pilot photobioreactor for microalgae production, *journal of Biotechnology*, 1999b, 70, 335-342.

**Baudimant G.**, Contribution à l'extraction-purification de fractions lipidiques de microalgues par chromatographie de partage centrifuge- Application aux phospholipides riches en acide arachidonique de *Porphyridium purpureum*, Thèse de Doctorat de L'E.C.P., 1996, 200 pages.

**Bernasconi C.F.**, Investigation of rates and mechanisms of reactions: Techniques of chemistry, Band 4. New York: Wiley, 1986.

**Borowitzka M.A., Borowitzka L.J.**, Chlorella, In : *Micro-algal Biotechnology*- Eds. Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J.- Cambridge University Press- Cambridge, England-1988c, 27-58.

**Borowitzka M.A., Borowitzka L.J.**, Micro-algal biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.

**Borowitzka M.A.**, Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 1999,70, 313-321.

**Borowitzka L.J.**, Microalgae as sources of fine chemicals, *Microbiological Sciences*, 1986, 3, 372-375`.

**Borowitzka M.A.**, Vitamins and fine chemicals from micro-algae, In: *Micro-algal Biotechnology*- Eds. Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J.- Cambridge University Press-Cambridge, England-1988b, 153-196.

**Callegri J.P.**, L'immobilisation des microalgues: applications potentielles, *Biofutur*, 1989b, 33-38.

**Camacho Rubio F., Camacho Gracia F., Sevilla Fernandez J.M., Christi Y., Grima Molina E.**, A mechanistic model of photosynthesis in microalgae, *Biotechnology and Bioeng*, 31, 2003, 459-473.

**Cassano A., Martin C., Brandi R., Alfona O.**, Photoreactor analysis and design: fundamentals and applications. *Ing. Eng. Chem. Res.*, 1995, 34, 2155-2201.

**Cornet J.F., Dussap C.G., Cluzel P., Dubertret G.**, A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: II Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992b, 40, 826-834.

**Csőgör Z., Herrenbauer M., Perner I., Schmidt K., Posten C.**, Design of a photobioreactor for modelling purposes. *Chemical Engineering and Processing*, 1999c, 38, 517-523.

**Csőgör Z.**, Untersuchungen zur Modellierung des Wachstums und der Produktbildung bei Mikroalgen, Dissertation, 2000, Universität Karlsruhe.

**Cunningham F.X., Vonshak A., Gantt, E.**, Photoacclimation in the red alga *Porphyridium cruentum*. *Plant Physiol.*, 1992,100, 1142-1149.

**De la Noüe J., De Pauw N.**, The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae, *Biotechnology advances*, 1988, 6, 723-770.

**Degen J.**, Entwicklung eines Photo-Bioreaktors mit verbesserter Lichtnutzung für Mikroalgen, Dissertation, Stuttgart, 2002.

**Denny T.P.**, Autoregulator-dependent control of extracellular polysaccharide production in phytopathogenic bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 1999, 105, 417-430.

**Dermoun D., Chaumont D., Thebault J.M., Dauta A.**, Modelling of growth of *Porphyridium cruentum* in connection with two independent factors: light and temperature. *Bioresource Technology*, 1992, 42, 113-117.

**Dermoun D.**, Ecophysiologie de *Porphyridium purpureum* : Validation expérimentale d'un modèle de croissance- Etude de la production de polysaccharides, Thèse de Doctorat de L'U.T.C. (Compiègne), 1987, 211 pages.

**El-Banoby, F. und Rudolph, K.** - Structure of the extracellular polysaccharide of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in sucrose containing media. In: K. Rudolph, T.J. Burr, J.W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian und J. von Kietzell (Hrsg.): *Developments in plant pathology: Pseudomonas syringae and related pathogens*, Band 9, S. 271-276. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 1997.

**Emerson R., Arnold W.**, A separation of the reactions in photosynthesis by means of intermittent light, *Journal of General Physiol.*, 1932, 15, 391-420.

**Emerson R., Arnold W.**, The photochemical reaction in photosynthesis, *Journal of General Physiol.*, 1932, 16, 191-205.

**Fábregas J., García D., Morales E., Domínguez A., Otero, A.**, Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity. *Journal of Fermentation and Biotechnology*, 1998, 86, 477-481.

**Fernández Ación F.G., Camacho García F., Pérez Sánchez J.A., Sevilla Fernández J.M., Grima Molina E.**, Modelling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: Effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance, *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 58, 605-616.

**Fox R.D.**, Algoculture, un espoir pour le monde de la faim, Ed Edisud, 1986.

**Frohlich B.T., Webster I.A., Atai M.M., Shuler M.L.**, Photobioreactors: models for interaction of light intensity, reactor design and algal physiology. *Biotechnology and Bioengineering Symp.*, 1983,13, 331-350.

**Gaidukov**, 1899, Referenz unbekannt

**Gantt E.**, *Porphyridium* as a red algal model for photosynthesis studies. In Coleman A.W., Goff L.J., Stein-Taylor J.R. (editors): *Algae as experimental systems*, 1989, Volume 7 of *Plant Biology*, 249-268, Alan R. Liss, New York.

**Gense M.T, Guérin-Dumartrait E., Leclerge J.C., Mihara S.**, Synchronisation de *Porphyridium*: évolution des quantités de pigments et de la capacité photosynthétique au cours du cycle biologique. *Phycologia*, 1969, 8, 135-141.

**Gerbsch N.**, Grundlegende Untersuchungen zur Entwicklung eines Photo-Bioreaktors auf Basis seitabstrahlender Lichtwellenleiter. Dissertation, Berlin 1997.

**Geresh S., Arad S.**, The extracellular polysaccharides of the red microalgae: Chemistry and rheology, *Bioresource Technology*, 1991, 38, 195-201.

**Goldman J.C.**, Outdoor Algal mass cultures- II. Photosynthetic yield limitations, *Water Research*, 1979, 13, 119-136.

**Golueke C.G., Oswald W.J.**, the mass culture of *porphyridium purpureum*, *Applied microbiology*, 1962, 10, 102-109.

**Grobbelaar J. U.**, Do light/dark cycles of medium frequency enhance phytoplankton productivity?, *J. Applied Phycology*, 1989, 1, 333-340.

**Grobbelaar J. U., Kroon B.M.A., Burger-Wiersma T., Mur L.R.**, Influence of medium frequency light/dark cycles equal duration on the photosynthesis and respiration of *Chlorella pyrenoidosa*, *Hydrobiologia*, 1992, 238, 53-62.

**Grobbelaar J. U.**, The influence of light/dark cycles in mixed algal cultures on their productivity, *Bioresource Technol.*, 1991, 38, 189-194.

**Grobbelaar J.U., Nedgal L., Tichý V.**, Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photoacclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. *Journal of Applied Phycology* ,1996, 8, 335-343.

**Gudin C. Chaumont D.**, les microalgues, de nouvelles sources de métabolites, Biofutur, 1991, 106, 27-30.

**Hoeck C., Van Den h., Jahns M., Mann D.G.**, Algen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, Auflage 1993.

**Hosono H., Uemura I., Takumi T., Nagamune T.**, Effects of culture temperature shift and light-dark time cycle on the cellular sugar accumulation of *Chlorella pyrenoidosa*, Bioprocess Engineering, 1997, 16, 193-197.

**Iqbal M., Grey D., Stepan-Sarkissian G.**, Effect of nitrogen on growth, extracellular polysaccharides and intracellular phycoerythrin production by the *Porphyridium purpureum*, Acta Microbiologica Polonica, 1992, 41, 65-73.

**Iqbal M., Zafar S.I.**, Effects of photon flux density, CO<sub>2</sub>, aeration rate and inoculum density on growth and extracellular polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*, Folia Microbiologica, 1993, 38, 509-514.

**Janssen M., Kuijpers T.C., Veldhoen B., Ternbach M.B., Tramper J., Mur L.R., Wijffels R.H.**, Specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* under medium duration light/dark cycles: 13-87 s. J. Biotechnol., 1999, 70, 323-334.

**Janssen, M., de Winter M., Tramper, J., Mur, L.R., Snel J.F.H., Wijffels, R.H.**, Efficiency of light utilization of *Chlamydomonas reinhardtii* under medium-duration light/dark cycles, J. Biotechnol, 2000b, 78, 123-137.

**Jaouen P., Vandanjon L., Quemeneur F.**, The shear stress of microalgal cell suspensions (*Tetraselmis suecica*) in tangential flow filtration systems: the role of pumps, Bioresource Technology, 1999, 68, 149-154.

**Jones R.E., Speer L., Kury W.**, Studies on the growth of the red alga *Porphyridium cruentum*, Physiologia Plantarum, 1963, 16, 636-643.

**Kathleen M. Cole, Robert G. Sheath**, Biology of the red algae, Cambridge University Press, 1990.

**Kendlbacher T., Kremling A., Gilles E.D.**, Modellgestützte Optimierung bei der Prozeßführung bioverfahrenstechnischer Prozesse. Automatisierungstechnik, 1998, 46, 375-380.

**Kieras, H-K., Chapman, J. D.:** Structural studies on the extracellular polysaccharide of the red alga, *Porphyridium cruentum*. Carbohydrate Research, 1976, 52, 169-177.

**Kirk J.T.O.,** Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

**Klyachko-Gurvich G.L., Doucha J., Kopezkii J., Ryabykh I.E., Semenenko V.E.,** Comparative investigation of fatty acid composition in lipids of various strains of *Porphyridium cruentum* and *Porphyridium aerugineum*. Russian Journal of Plant Physiology, 1994, 41, 248-255.

**Kohl J.G., Nicklisch A.,** Ökophysiologie der Algen, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1988.

**Kohzin I.D., Adlerstein C., Bigondo Y.M., Heimer, Cohen Z.,** Elucidation of the biosynthesis of eicopentaenoic acid in the microalga *porphyridium cruentum*, plant Physiology, 1997, 114, 223-230.

**Kok B.,** Photosynthesis in flashing light, Biochemica et Biophysica Acta, 1956, 21, 245-259.

**Kopecký J.,** Kinetic model of extracellular polysaccharide production by the unicellular red alga *Porphyridium purpureum*. Algological Studies , 1997, 87 ,137-144.

**Kriedmann P.E., Törökflavy E., Smart R.E.,** Natural Occurence and photosynthetic utilization of sunflecks by grapevine leaves, Photosynthetica, 1973, 18-27.

**Kufferath H.,** Notes sur la physiologie et la morphologie de *Porphyridium cruentum Naegeli*, Bulletin de la Societé Royale de Botanique de Belgique, 1913, 52, 286-290.

**Kylin H.,** Über eine marine *porphyridium cruentum*-Art, Kungl. Fysiografiska sällskapets handlingar, 1937, 7, 119-123.

**Lawlor D.W.,** Photosynthese. Stuttgart: Thieme-Verlag 1990.

**Laws E.A., Terry K.L., Wickman J., Chalup M.S.,** A simple algal production system designed to utilize the flashing light effect. Biotechnology and Bioengineering 1983, 25, 2319-2335.

**Laws E.A.**, Use of flashing light effect to stimulate in algal mass cultures, *Nova Hedwigia Suppl.*, 1984, 230-233.

**Leclerc J.C.**, Sur la croissance et la photosynthèse de *Porphyridium* en fonction de la salinité du milieu de culture, *Photosynthetica*, 1967, 1, 179-191.

**Lee R.E.**, Basic characteristics of the algae, In: *Phycology/ Second edition*- Ed Lee R.E.- Cambridge University Press-Cambridge, England, 1989, 45-46.

**Lee Y.K., Pirt J.**, Energetics of photosynthetic alga growth: influence of intermittent illumination in short (40 s) cycles, *J. of General Microbiology*, 1981, 124, 43-52.

**Lee Y.K., Tan H.M.**, Effect of temperature, light intensity and dilution rate on the cellular composition of red alga *Porphyridium cruentum* in light-limited chemostats, *Mircen Journal of Applied Mircobiology and Biotechnology*, 1988, 4, 231-237.

**Lengeler J.W., Drews G., Schlegel H.G.**, *Biology of the procaryotes*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1999.

**Lewis I.F., Zirkle C.**, Cytology and systematic position of *Porphyridium cruentum* Naeg, *Americ. Journal of Bot.*, 1920, 7, 333-340.

**Ley A.C., Butler W.L.**, Effects of chromatic adaptation on the photochemical apparatus of photosynthesis in *Porphyridium cruentum*. *Plant Physiol.*, 1980, 65, 714-722.

**Livansky K.**, Effect of nonilluminated part of suspension on biomass production in an algal reactor, *Folia Microbiologica*, 1979, 24, 339-345.

**Matthijs H.C.P., Balke h., Van Hes U.M., Kroon B.M.A., Mur L.R., Binot R.A.**, Application of light-emitting diodes in bioreactors: flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*), *Biotechnology and Bioeng.*, 1996, 50, 98-107.

**Mc Candless E.L., Craigie J.S.**, Sulphated polysaccharides in red and brown algae, *Annual Review of Plant physiology*, 1979, 30, 41-53.

**McCree K.J., Loomis R.S.**, Photosynthesis in fluctuating light, *Ecology*, 1969, 50, 422-428.

**Merchuk J.C., Ronen M., Giris s., Arad S.**, Light/dark cycles in the growth of the red microalga *Porphyridium sp.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, 59, 705-713.

**Minkova K., Michailov Y., Toncheva-Panova T., Houbavenska N.,** Antiviral activity of *Porphyridium cruentum* polysaccharide. Pharmazie 1996,51, 3.

**Minkova K.M., Georgiev D.I., Houbavenska N.B.,** Light and temperature dependence of algal biomass and extracellular polysaccharide production from *Porphyridium cruentum*. Biol. Physiol.,1987,40, 87-89.

**Minorescu M.,** laufende Arbeit, Universität Karlsruhe.

**Molina Grima E., Camacho F.G., Peres J.A.S., Sevilla J.M.F., Fernandez, F.G.A Gomez A.C.,** A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. J. Chem. Tech. Biotechnol. 1994, 61, 167-173.

**Molina Grima E., Pérez S.J.A., Camacho G.F., Garcia Sanchez J.L., Lopez Alonso D.,** *n*-3 PUFA productivity in chemostat cultures of microalgae, Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 38, 599-605.

**Monod J.,** The growth of bacterial cultures, Annual Review of Microbiology, 1949, 3, 371-394.

**Moser H.,** The dynamics of bacterial populations in the chemostat, Carnegie intitution of Washington, WASHINGTON D.C., 1958.

**Muller-Feuga A., Le Guédes R., Pruvost J.,** Benefits and limitations of modelling for optimization of *Porphyridium cruentum* in an annular photobioreactor, J. of Biotechnology, 2003, 103, 153-163.

**Muller-Feuga A.,** Microalgues marines. Les enjeux de la recherche, Plouzane, Editions IFREMER, 1996, 35 pages.

**Mulyadi A.,** Etudes in-vitro de la croissance et de la composition biochimique de *Porphyridium cruentum* et de *Porphyridium aerugineum* (Rhodophycées)- Implications sur la toxicité cutanée, Thèse de Doctorat de l'université de Montpellier II, 1995, 288 pages.

**Naegali C.,** Gattungen einzelliger Algen physiologisch und systematisch bearbeitet. Neue Denkschr. Allg. Schweizerischen Ges. Gesamt. Naturwiss. 1849, 10, 1-139.

**Näser K.H., Lempe D., Regen O.,** Physikalische Chemie für Techniker und Ingenieure. Leipzig: Dt. Verlag für Grundstoffindustrie 1990.

**Nedbal L., Tichy v., Xiong F., Grobbelaar J.U.**, Microscopic green algae and cyanobacteria in high-frequency intermittent light, *J. Appl. Phycol.*, 1996, 8, 325-333.

**Nelder J.A., Mead R.**, A simplex method for function minimisation, *The Computer Journal*, 1964, 7, 308-313.

**Nouals S.**, Modélisation d'un photobioreacteur pour le pilote de microalgues, Thèse, Ecole centrale de Paris, 2000, 277 pages.

**Onda K., Sada E., Kobayashi T., Kito S., Ito K.**, Solubility of gases in aqueous solutions of mixed salts, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 1970, 3, 137-142.

**Percival E., Foyle R.A.J.**, The extracellular polysaccharides of *Porphyridium cruentum* and *Porphyridium aeruginum*. *Carbohydrate Research* 1979, 72, 165-176.

**Perner I.**, Scale-Down von Photo-Bioreaktoren, Dissertation, Universität Karlsruhe, 2003

**Peterson D. H., Perry M. J., Bencala K. E., Talbot M. C.**, Phytoplankton productivity in relation to light intensity: a simple equation. *Estuarine, coastal and shelf science*, 1987, 24, 813-832.

**Peto R., Doll R., Buckley J.D., Sporn M.B.**, can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates ?, *Nature*, 1981, 290, 207-208.

**Phillips J.N., Myers J.N.**, Growth rate of *Chlorella* in flashing light, *Plant Physiol.*, 1954, 29, 152-161.

**Pirt S.J.**, The thermodynamic efficiency (quantum demand) and dynamics of photosynthetic growth. *New Phytologist* 1986, 102, 3-37.

**Posten C.**, Basic concepts of computer modelling and optimization in bioprocess application. In: Ghose, T.K. (Hrsg.): *Process Computations in Biotechnology*, S. 1-49. New Delhi: Tata 1994.

**Pringsheim E.G., Pringsheim O.**, The growth requirements of *Porphyridium cruentum*: with remarks on the ecology of brackish water algae, *J. Ecol.*, 1949, 37, 57-64.

**Pulz O.**, Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms, Springer-Verlag, 2001.

**Pulz O., Scheibenbogen K.**, Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* , 1998, 59, 124-152.

**Quéguiner B., Legendre L.**, Phytoplankton photosynthetic adaptation to high frequency light fluctuations simulating those induced by sea surface waves, *Mar. Biol.*, 1986, 90, 483-491.

**Rabinowitch E.I.**, Photosynthesis and related processes, Interscience New York, 1956, Vol. 2, part II.

**Ramus J.**, Alcian blue: a quantitative aqueous assay for algal acid and sulfated polysaccharides. *J. Phycol.* 1977, 13, 345-348.

**Ramus J., Robins D.M.**, The correlation of golgi activity and polysaccharide secretion in *Porphyridium*. *J. Phycol.* 1975, 11, 70-74.

**Ramus J.**, The production of extracellular polysaccharide by the unicellular red alga *Porphyridium aerugineum*. *J. Phycol.* 1972, 8, 97-111.

**Raven J.A., Johnston A.M., MacFarlane J.J.**, Carbon metabolism. In: K.M. Cole und R.G. Sheath (Hrsg.): *Biology of the red algae*, S. 171-202. Cambridge: Cambridge University Press 1990.

**Rezanka T., Doucha J., Mares P., Podojil M.**, Effect of cultivation temperature and light intensity on fatty acid production in the red alga *Porphyridium cruentum*. *J. Basic Microbiol.* 1987, 27, 275-278.

**Richmond A., Boussiba S., Vonshak A., Kopel R.**, A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors, *J. Appl. Phycol.*, 1993, 5, 327-332.

**Richmond A.**, Handbook of microalgal mass culture. Florida: CRC Press Boca Raton 1986.

**Richter G.**, Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1998.

- Rieth A.**, Ein marines *Porphyridium* von der Mittelmeerküste bei Neapel und die Berechtigung der Art *Porphyridium marinum* Kylin, Biologisches Zentralblatt, 1961, 80, 429-438.
- Sada E., Katho S., Kheirulomoon A., Yokoi H.**, Effects of light intensity on growth rate of red alga *Porphyridium cruentum*. Journal of Fermentation and Bioengineering 1989, 67, 135-137.
- Sager J.C., Giger W. J.R.**, Re-evaluation of published data on the relative photosynthetic efficiency of intermittent and continuous light, Agricultural Meteorology, 1980, 22, 289-302.
- Sasson A.**, L'exploitation industrielle des microalgues, Biofutur, 1998, 179, 64-65.
- Schlösser U.G.**, SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen. Catalogue of Strains 1994. Botanica Acta 1994, 107, 113-186.
- Schmitz F.**, Die Chromatophoren der Algen, Verh.d.Nat.hist.Vereins.d.preuss. Rheinlanden und Westphalens, 1882, 40,1.
- Shimizu Y.**, Microalgal metabolites: a new perspective. Annu. Rev. Microbiol., 1996 50, 431-465.
- Shuter B.**, A model of physiological adaptation in unicellular algae, 1979, J. Theor. Biol., 78, 519-552.
- Sommerfeld M.R., Nichols H.W.**, Comparative studies in the genus *porphyridium naeg*, J. phycol., 1970, 6, 67-78.
- Springer M., Franke H., Pulz O.**, Increase of the content of polyunsaturated fatty acids in *Porphyridium cruentum* by low-temperature stress and acetate supply. J. Plant Physiol. 1994, 143, 534-537.
- Starr R.C.**, The culture collection of algae at Indiana University, American journal of botany, 1960, 47, 67-80.
- Tamiya H., Hase E., Shibata K., Iwamura A., Morimura Y.**, Kinetics of growth of *Chlorella*, with special reference to its dependence on quantity of available light and temperature, In "algal culture: From laboratory to pilot plant", WASHINGTON, Burlew Carnegie Institute, 1953, 76-84.

**Thépenier C., Dermoun D., Gudin.,** Valorisation industrielle des microalgues, Annales du colloque, Brest, Ed Apria, Paris, 1990, 87-96.

**Thépenier C.,** Ecophysiologie de *Porphyridium purpureum* immobilisé dans les mousses de polyuréthane- Etude de la production de polysaccharides, Thèse de Docteur- Ingénieur de L'U.T.C. (Compiègne), 1984, 73 pages.

**Thépenier C., Gudin C.,** Studies on optimal conditions for polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*. MIRCEN Journal 1985, 1, 257-268.

**Vandanjon L., Rossignol N., Jaouen P., Robert J.M., Quéméneur F.,** Effects of shear on two microalgae species. Contribution of pumps and valves in tangential flow filtration systems, Biotechnology and Bioengineering, 1999, 63,1-9.

**Vischer W.,** Zur Morphologie, Physiologie und Systematik der Blutalge *Porphyridium cruentum* Naegali, Verhandlungen der Naturforschungsgesellschaft, 1935, 46, 469-481

**Vonshak A., Cohen Z., Richmond A.,** The feasibility of mass cultivation of *Porphyridium*, Biomass, 1985, 8, 13-25.

**Vonshak A.,** *Porphyridium*, In Micro-Algal Biotechnology, Ed Borowitzka, M.J., Borowitzka L.J., Cambridge University Press, Cambridge, England, 1988, 122-134.

**Weller S., Franck J.,** Photosynthesis in flashing light, J. physiol. Chem., 1941, 45, 1359-1373.

**Yamaguchi K.,** Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. Journal of Applied Phycology , 1997,8, 487-502.

**Weis E.,** Temperaturregulation der Photosynthese: Eine wärmeinduzierte Hemmung der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase bei Spinat, Ber. Deutsch. Bot. Ges, 1981, 94, 135-142.

---

## 8 Anhang

### Anhangsverzeichnis

Anhang 1: Künstliches Meerwassermedium (ASW)	164
Anhang 2: Zusammensetzung der Steriltestböden	165
Anhang 3: Aufbau der Lichtquelle mit der rotierenden Scheibe	166
Anhang 4: Kalibrierungskurven	167
Anhang 5: RP-HPLC Vorbereitung und Analyse	170
Anhang 6: Fettsäure Vorbereitung und Analyse	172
Anhang 7: Liste der Parameter für das mathematische Modell	174

## A1 Künstliches Meerwassermedium (ASW)

Das ASW-Medium enthält die in Tab. A1.1 genannten Salze. Es wird mit 20 ml einer 1 M Tris-HCl-Lösung ( $=3,3 \text{ g}_{\text{Tris-HCl}}/\text{g}_{\text{Lösung}}$ ) gepuffert. Nach Zugabe von 1 ml Spurenelemente-Lösung (siehe Tab. A1.2) und 1ml chelatisierter Eisen-Lösung (s. Tab. A1.3) wird der pH-Wert mit NaOH oder HCl auf pH=7,6 eingestellt.

Tabelle A1.1: Im ASW-Medium enthaltene Salze

NaCl	27,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6,6 g/l
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5,6 g/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,5 g/l
KNO <sub>3</sub>	1,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,07 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	0,04 g/l

Tabelle A1.2: Spurenelemente-Lösung für das ASW-Medium

ZnCl <sub>2</sub>	40 mg/l
H <sub>3</sub> B <sub>3</sub>	600 mg/l
CoCl <sub>2</sub>	15 mg/l
CuCl <sub>2</sub>	40 mg/l
MnCl <sub>2</sub>	400 mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	370 mg/l

Tabelle A1.3: Chelatisierte Eisen-Lösung für das ASW-Medium

FeCl <sub>3</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2400 mg/l
Titriplex® III	1861 mg/l = 0,05 M

**A2 Zusammensetzung der Steriltestböden**

Tabelle A2.1: Zusammensetzung des Standard 1-Agars für Bakterien

---

Pepton	15 g/l
Hefeextrakt	3 g/l
Glucose	1 g/l
NaCl	6 g/l
Agar-Agar	12 g/l

---

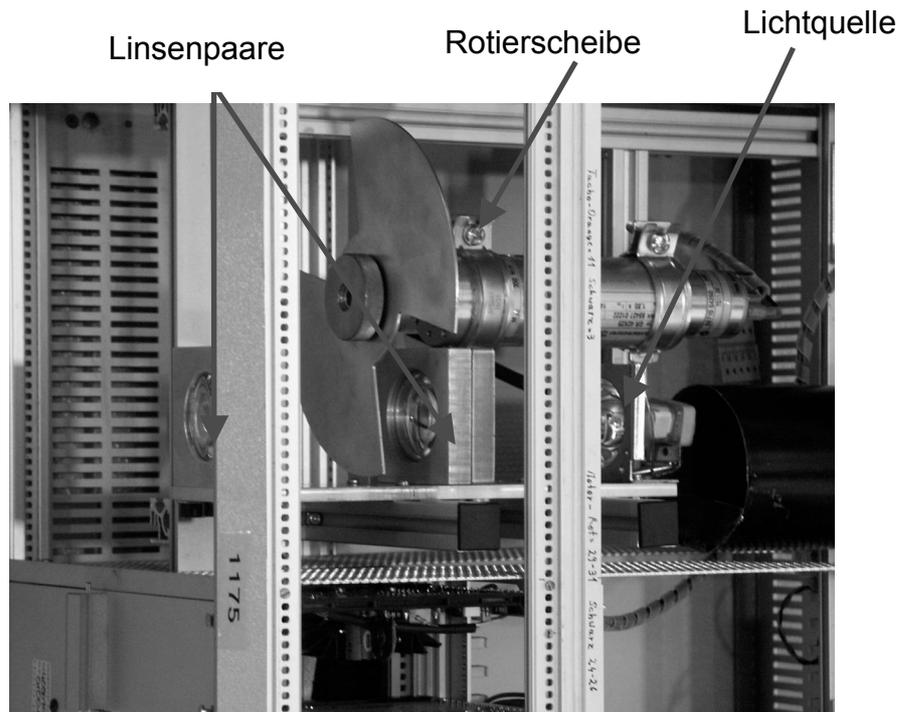
Tabelle A2.2 Zusammensetzung des Malzextraktagsars für Pilze

---

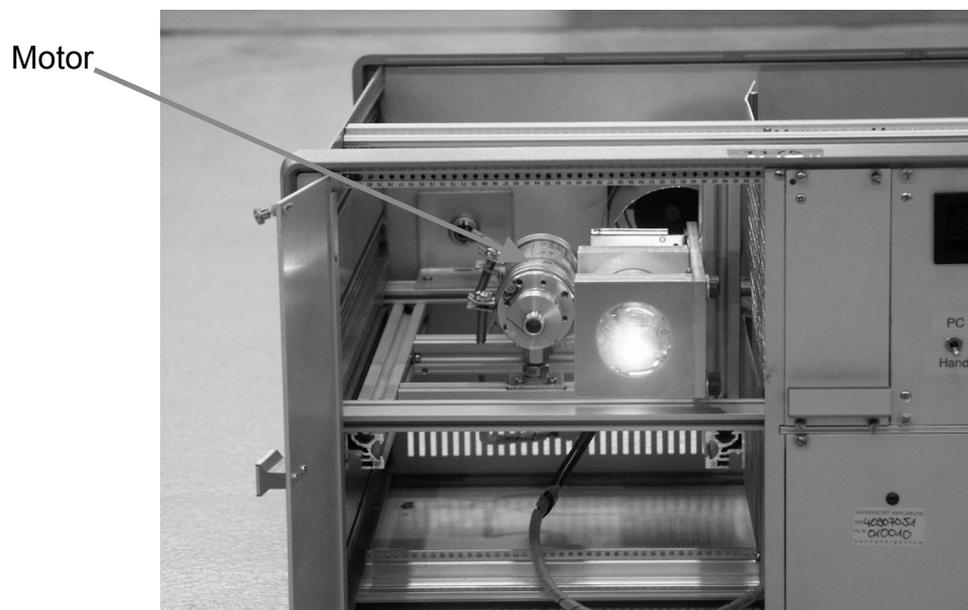
Malzextrakt	20 g/l
Glucose	20 g/l
Pepton	1 g/l
Agar-Agar	15 g/l

---

### A3 Aufbau der Lichtquelle mit der rotierenden Scheibe

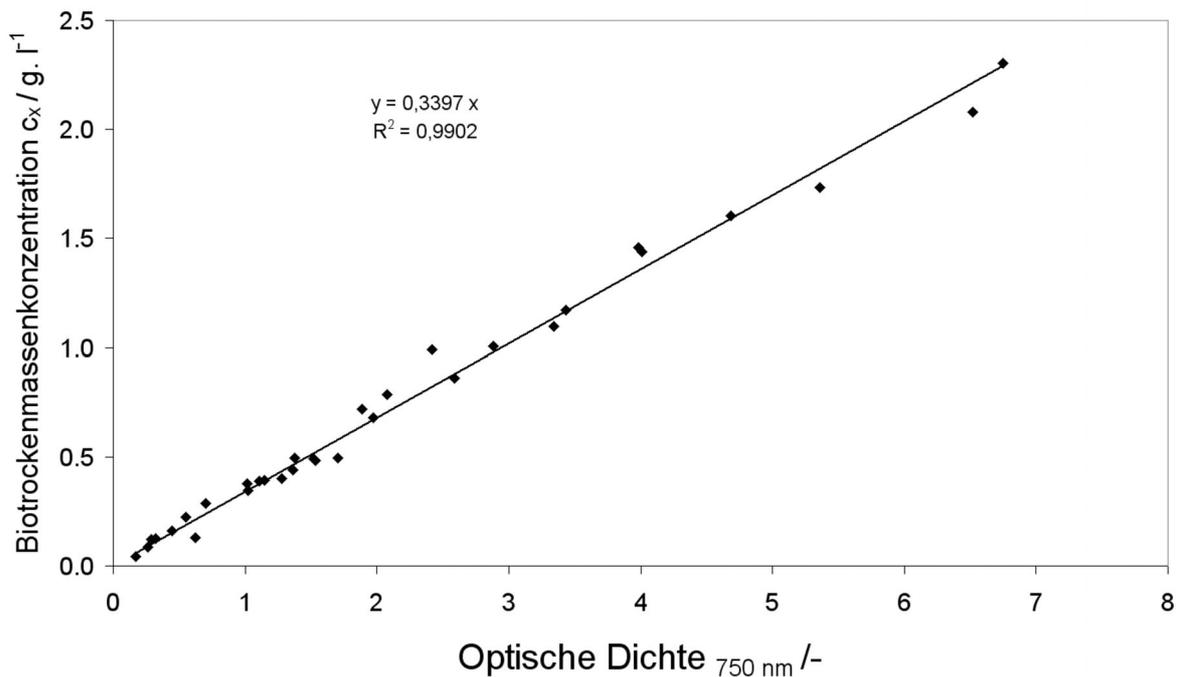


**Abbildung A3.1:** Auf dem Photo zu sehen ist die Fokussierungseinrichtung zur Realisierung der Hell-Dunkel-Zyklen. Das Photo zeigt den Blick von oben auf die Apparatur. Die Lichtquelle ist wegen dem Querbalken nur zur Hälfte zu sehen.

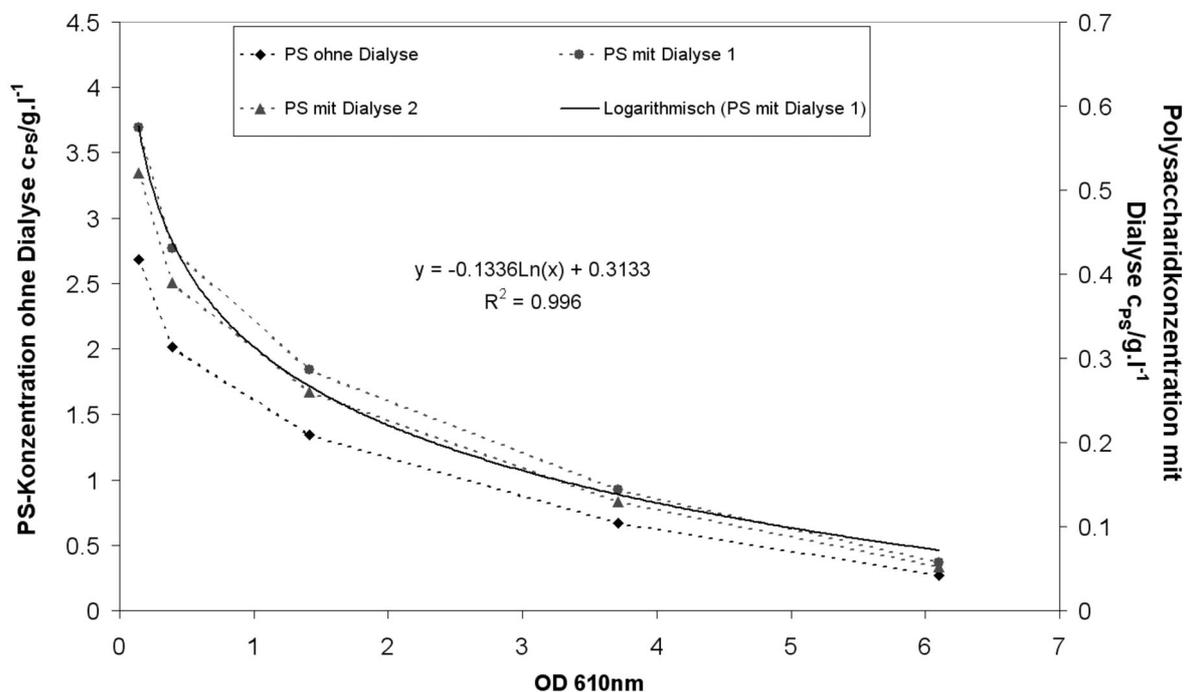


**Abbildung A3.2:** Abgebildet ist die Fokussierungseinrichtung, aufgenommen von vorne. Die Rotierscheibe ist nicht montiert, wird aber senkrecht zum Motor angebracht, und bewegt sich zwischen den beiden Linsen.

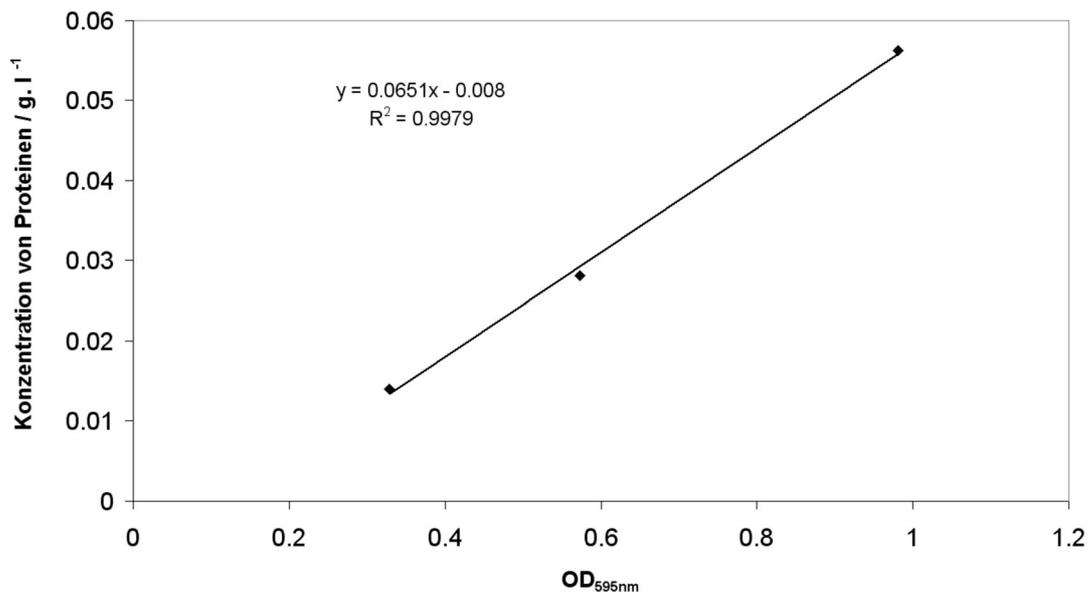
#### A4 Kalibrierungskurven



**Abbildung A4.1:** Zusammenhang zwischen der optischen Dichte, die bei  $750 \text{ nm}$  gemessen wird, und der gravimetrischen Bestimmung der Biotrockenmassenkonzentration der Mikroalge *Porphyridium purpureum*. Die verwendeten Kulturen stammen sowohl aus Schüttelkolben als auch von Kultivierungen im Photobioreaktor.

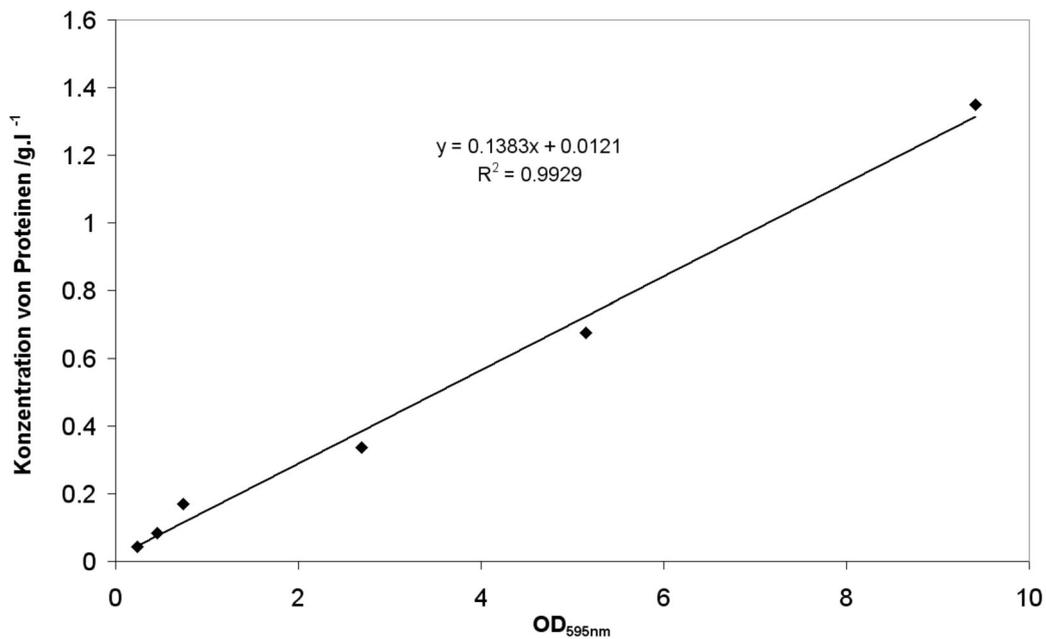


**Abbildung A4.2:** Zusammenhang zwischen der Absorption bei  $610 \text{ nm}$  und der Konzentration an dialysierten Polysacchariden, die mittels TOC bestimmt wurde. Zwei Kalibrierungskurven wurden verwendet, um den ganzen Bereich der Proteinkonzentration abdecken zu können.



**Abbildung A4.3:** Zusammenhang zwischen der Absorption bei 595 nm und der Proteinkonzentration der Probe. Diese Kalibrierungskurve ist gültig für eine Gesamteproteinkonzentration, die sich unterhalb von  $0,06 g \cdot l^{-1}$  befindet.

Für eine höhere Gesamteproteinkonzentration ist eine zweite Kalibrierungskurve gültig. Die Zusammenhänge zwischen dem ermittelten Absorptionskoeffizienten bei 595 nm und der Konzentration an Proteinen befindet sich in Abbildung A4.4 dargestellt. Die Ermittlung der Kalibrierungskurve erfolgt mit Hilfe von gekauften Albuminen (Sigma).

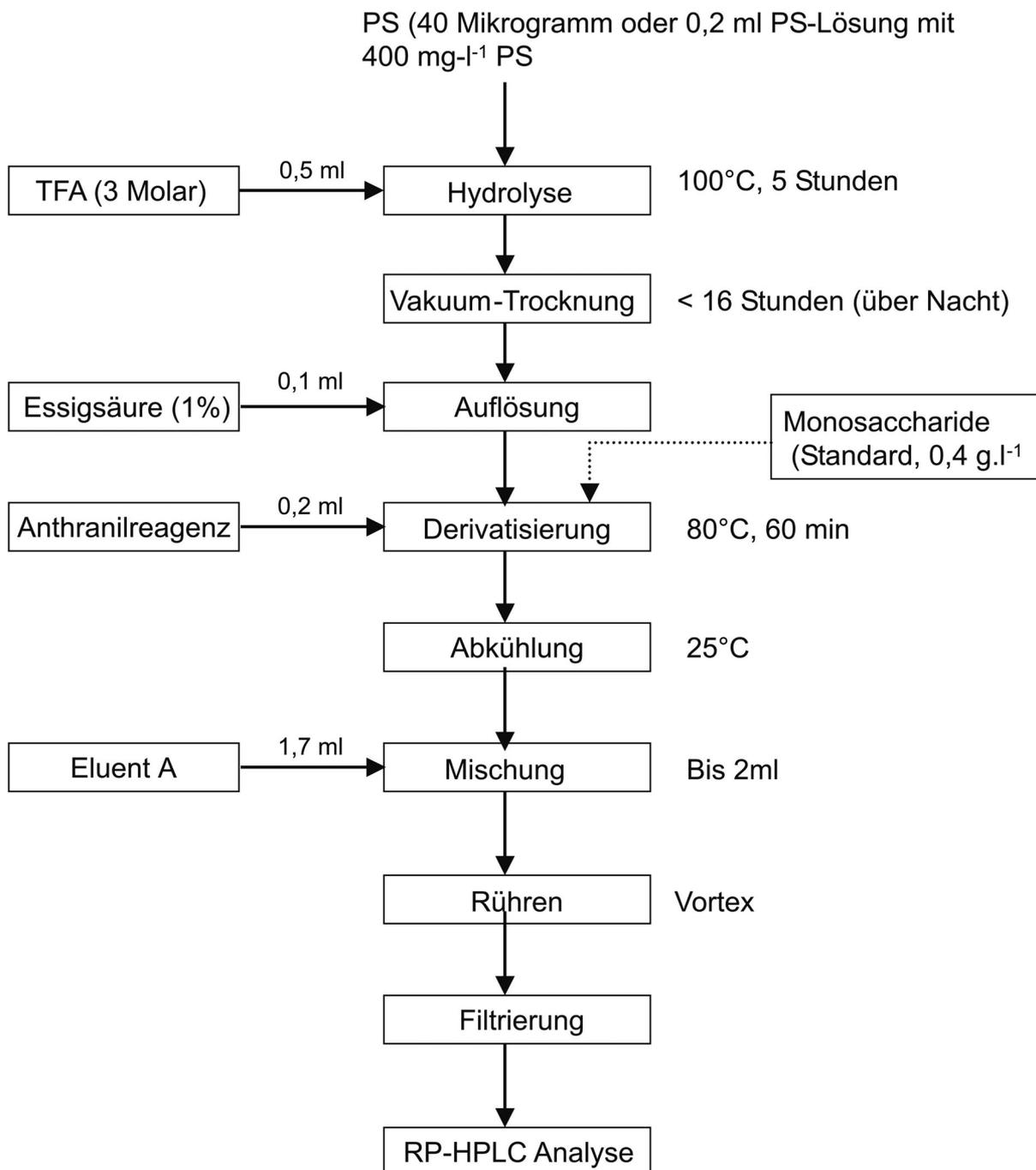


**Abbildung A4.4:** Zusammenhang zwischen der Absorption bei 595 nm und der Proteinkonzentration der Probe. Diese Kalibrierungskurve ist gültig für eine Gesamteproteinkonzentration, die sich oberhalb von 0,06 g.l<sup>-1</sup> befindet.

## A5 RP-HPLC Vorbereitung und Analyse

### A5.1 RP-HPLC Vorbereitung

Die Vorbereitung der Proben für die RP-HPLC Messungen wird in dem folgenden Schema dargestellt:



### A5.2 RP-HPLC Analyse

Die verwendete Methode und Eluentenzusammensetzung zur Bestimmung der Monosaccharide mit RP-HPLC Messungen wird unten gezeigt. Die Messungen wurden ebenfalls im Forschungszentrum Umwelt in Zusammenarbeit mit Patrik Pionnau durchgeführt. D. HPLC-Analysen mit der kurzen Säule.

Säule	LiChrospher 100 RP-18 (Octadecylsiloxan) Länge 125 mm, id 4 mm, Granulometrie 5 µm, Porosität 100 A
PH	2-7,5
Eluent A	4 ml 1-Butylamin C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N 99 % Merck 8.01539 10 ml ortho-Phosphosäure H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85 % Merck 1.00573 20 ml THF stabilisiert Auf 2 L mit Wasser auffüllen und filtrieren
Eluent D	500 ml Puffer A + 500 ml Acetonitril

Time	A %	D %
0	95	5
7	95	5
25	82	18
26 (wash)	0	100
31	0	100
32 (equilibrate)	95	5
40	95	5

Eluentenfluß	1 ml.min <sup>-1</sup>	
Analysendauer	25 min	
Säulentemperatur	17°C	
Injektion	50 µl	
Diodenarray (DAAD)	250, 30	Ref. 440, 80 nm
Fluoreszenz (FLD)	Excitation	360 nm
	Emission	425nm
	Photomultiplier-Gain	100
	Slow Response	
	Response Time	1000 ms

## A6 Fettsäurevorbereitung und Analyse

### A6.1 Analyse nach MIDI

Tab. A6.1 : Reagenzien zum Umestern der Fettsäuren nach MIDI

Reagenz 1	45 g	NaOH
	150 ml	Methanol
	150 ml	Destilliertes Wasser
Reagenz 2	325 ml	6 M Salzsäure
	275 ml	Methanol
Reagenz 3	200 ml	Hexan
	200 ml	Methyl-tert-butyl-ether
Reagenz 4	10,8 g	NaOH
	900 ml	Destilliertes Wasser

## A6.2 GC-MS-Gerät und Programm für die Fettsäuremethylester-Analyse

Die Analyse wurden mit einer HP GC-MSD 6890 im Forschungszentrum Umwelt durchgeführt. Folgende Parameter wurden eingestellt:

Tab. A6.2 : GC-MS Programm zur Analyse der Fettsäuremethylester

Methode	MVM-FAME.M
Kapillarsäule	HP 5 MS 30m*0,25 mm*0,25µm
Phase	5% Diphenyl-/ 95 % Polydimethylsiloxan
Polarität	Nichtpolar; Trennung nach Siedepunkt
Temperaturbereich	-60 °C bis 325 °C
Detektortemperatur	280 °C
Carrierflow	Helium 5.0; 1,2 ml.min <sup>-1</sup> mit constant Flow
Injektionsvolumen	1 µl
Injektor	Split 300 °C
Split Ratio	10:1
Ofentemperatur	170 °C (0 min) bis 210 °C mit 5 °C.min <sup>-1</sup> 210 °C bis 230 °C (0min) mit 1°C.min <sup>-1</sup> 230 °C bis 300 °C (0,33 min) mit 10 °C.min <sup>-1</sup>
Solvent Delay	Scan 25-380 amu
Thresbold	300
Sample	2 <sup>N</sup>
Solvent	n-Hexan und MTBE 1:1

**A7 Liste der Parameter zur Erzeugung des mathematischen Modells**

lateinische Buchstaben

Parameter	Bezeichnung	Wert / Einheit	Quelle
$A_R$	bestrahlte Oberfläche	0,001 - 0,1 m <sup>2</sup>	exp. ermittelt
$c$	Konzentration	g l <sup>-1</sup>	berechnet
$C_X$ ; $C_{PBP}$ ; $C_{Chla}$ ; $C_{Car}$ ; $C_{Gps}$ ; $C_{fPS}$ ; $C_{iPS}$ ; $C_{Rest}$ ; $C_{16:0}$	Konzentration der jeweiligen Produkte	g.l <sup>-1</sup>	berechnet
$C_{X,0}$ ; $C_{PBP,0}$ ; $C_{Chla,0}$ ; $C_{Car,0}$ ; $C_{Gps,0}$ ; $C_{fPS,0}$ ; $C_{iPS,0}$ ; $C_{Rest,0}$ ; $C_{16:0,0}$	Anfangskonzentration jeweiligen Produkte	der g.l <sup>-1</sup>	exp. ermittelt
$C_{fPS,soll}$	Sollkonzentration der freien Polysaccharide	g.l <sup>-1</sup>	exp. ermittelt
$C_{iPS,soll}$	Sollkonzentration intrazellulären Polysaccharide	der g.l <sup>-1</sup>	exp. ermittelt
$CO_2, CO_2, HCO_3^-, CO_3^{2-}$	Konzentration in Flüssigphase	der mol l <sup>-1</sup>	berechnet
$c^*$	Gleichgewichts-Konzentration an Phasengrenze(flüssig)	mol l <sup>-1</sup>	berechnet
$C_{ein}$	Konzentration im Zugas	mol l <sup>-1</sup>	exp. ermittelt
$C_{Gas}$	Konzentration in Gasphase (Abgas)	der mol l <sup>-1</sup>	berechnet
$CTR$	CO <sub>2</sub> -Transferrate	mol l <sup>-1</sup>	berechnet
$e$	Anteil eines Elementes an einem Produkt	an g g <sup>-1</sup>	berechnet
$e_{c,CH_2O}$ ; $e_{c,iPS}$ ; $e_{c,PBP}$ ; $e_{c,Chla}$ ; $e_{c,Rest}$ ; $e_{c,Car}$	Anteil von Kohlenstoff in den jeweiligen Produkten	g.g <sup>-1</sup>	berechnet

$e_{N,NO_3}$ ; $e_{N,Chla}$ ; $e_{N,Rest}$	$e_{N,PBP}$ ; Anteil von Stickstoff in den jeweiligen Produkten	$g \cdot g^{-1}$	berechnet
$H_{CO_2}$	auf bezogene für $CO_2$	Konzentrationen 0,7 HENRY-Konstante	nach Onda et al., 1970 und Arrua et al., 1990
$H_{O_2}$	auf bezogene für $O_2$	Konzentrationen 0,029 HENRY-Konstante	nach Näser et al., 1990 und Arrua et al., 1990
K	Scheinbare Dissoziationskonstante	$2,8 \cdot 10^{-6}$	nach Arrua et al., 1990
$k_{iaCO_2}$	$k_{ia}$ –Wert für $CO_2$	$2,54 \cdot 10^{-2} s^{-1}$	berechnet nach ROYCE, 1992
$k_{iaO_2}$	$k_{ia}$ -Wert für $O_2$	$2,85 \cdot 10^{-2} s^{-1}$	exp. ermittelt
$K_{iPS}$	Verstärkungsfaktor	$l \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	geschätzt
$K_{iPSges}$	Verstärkungsfaktor	$l \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$	geschätzt
L	mittlere Weglänge des Lichts durch den Reaktor	0,03 – 0,11 m	exp. ermittelt
MG	Molekulargewicht	$g \cdot mol^{-1}$	Periodensystem
$MG_X$	Molekulargewicht Biomasse, bezogen auf ein C-Atom	der 27,1 $g \cdot mol^{-1}$	Reboloso Fuentes et al., 1999
$MG_{ATP}$ ; $MG_{O_2}$ ; $MG_{CO_2}$ ; $MG_{CH_2O}$ ; $MG_{Rest}$	Molekulargewichte von unterschiedlichen Produkten		
$N_A$	Avogadro-Konstante	$6,023 \cdot 10^{23} mol^{-1}$	

OTR	Sauerstofftransferrate	mol l <sup>-1</sup>	berechnet
PFD	Photonenflussdichte	0 - 500 μE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	exp. ermittelt
PSE	Anzahl photosynthetisch aktiver Einheiten	g <sup>-1</sup>	aus Phycoerythrin-gehalt berechnet
r	Spezifische Bildungsrate	g g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> oder g d <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	berechnet
r <sub>car</sub> ; r <sub>Chla</sub> ; r <sub>PBP</sub> ; r <sub>GPS</sub> ; r <sub>iPS</sub> ; r <sub>iPSges</sub> ; r <sub>fPS</sub> ; r <sub>Rest</sub> ; r <sub>C16:0</sub> ; r <sub>CH2O</sub>	Spezifische Bildungsrate der Produkte	g g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	berechnet
r <sub>CO2</sub> ; r <sub>O2</sub>	Spezifische Bildungsrate der Abgase	g g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	berechnet
r <sub>ATP,Produktbildung</sub> ; r <sub>ATP,PBP</sub> ; r <sub>ATP,Chla</sub> ; r <sub>ATP,Rest</sub> ; r <sub>ATP,maintenance</sub> ; r <sub>ATP,Photosynthese</sub> ; r <sub>ATP,calvin_zyklus</sub> ; r <sub>NADPH2,Photosynthese</sub> ; r <sub>NADPH2,calvin_zyklus</sub>	Spezifische Bildungsrate der Energie	g g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	berechnet
r <sub>NO3,krit.</sub>	Anpassungsparameter	g g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	angepasst
t <sub>R</sub>	Relaxationszeit	0,025 s	Peterson et al., 1987
V <sub>R</sub>	Reaktorvolumen	3.1 l	exp. ermittelt
$\dot{V}$	Gasvolumenstrom	l min <sup>-1</sup>	exp. ermittelt
y	Ausbeutekoeffizient	g g <sup>-1</sup>	

$Y_{X,ATP}$	Energie-Ausbeutekoeffizient für Biomasse	10,7/MGATP mol. mol <sup>-1</sup>	Durchschnittswert nach Bailey, Ollis, 1986; Dellweg, 1987; Lawford, Rousseau, 1995
$Y_{PBP-ATP}; Y_{Chla\_ATP}; Y_{Car\_ATP}; Y_{Rest\_ATP}; Y_{CH20\_ATP}$	Energie-Ausbeutekoeffizient der Produkte	g.g <sup>-1</sup>	berechnet
$Y_{Car\_Chla}$	Verhältnis von Carotinoide zu Chlorophyll a	-	berechnet
$Y_{Chla\_PBP}$	Verhältnis von Chlorophyll a zu Phycoerythrin	-	berechnet
$Y_{gesPS\_fPS}$	Verhältnis von gesamten freien Polysacchariden zu	-	geschätzt
n	Molare Bildungsrate	spezifische mol g <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	berechnet
$Z_{hv}$	Spezifischer Photonenfluss	mol g <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	berechnet

griechische Buchstaben

Parameter	Bezeichnung	Wert / Einheit	Quelle
$\epsilon_{chla}(\lambda)$	Wellenlängen-abhängiger Extinktionskoeffizient von Chlorophyll a	m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	exp ermittelt

$\varepsilon_{\text{PBP}}(\lambda)$	Wellenlängen- abhängiger  Extinktionskoeffizient von Phycoerythrin	$\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	exp ermittelt
$\varepsilon_{\text{Car}}(\lambda)$	Wellenlängen- abhängiger  Extinktionskoeffizient der Carotinoide	$\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	exp. ermittelt
$\mu$	Spezifische Wachstumsrate	$\text{d}^{-1}$	berechnet
Parameter	Bezeichnung		
ATP	Adenosintriphosphat		
Car	Carotinoide		
Chla	Chlorophylle a		
CH <sub>2</sub> O	Zuckerbaustein		
ein	Eingangskonzentration		
fPS	Freie Polysaccharide		
GPS	Gesamte Polysaccharide		
IPS	Intrazelluläre Polysaccharide		
PBP	Phycoerythrin		
P <sub>i</sub>	Phosphate		
PS	Polysaccharide		
Rest	Biomasse abzüglich Pigmente und Polysaccharide		