

**Die Effizienz der Kultivierung von Mikroalgen zur Biodieselgewinnung –
Prozessentwicklung auf der Grundlage von Energiebilanzierung, Simulation und
Integration modellprädiktiver Regelungskonzepte**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

von der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte Dissertation

von

M. Sc. Robert Dillschneider
aus Saarbrücken

Referent: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syldatk

Tag der mündlichen Prüfung: 18.7.2014

„Die Pflanzen nehmen eine Kraft, das Licht, auf, und bringen eine Kraft hervor: die chemische Differenz.“

Julius Robert Mayer (1845)

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich III: Bioverfahrenstechnik des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT).

Zunächst möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat die Arbeit in seiner Gruppe durchzuführen. Durch das mir entgegengebrachte Vertrauen wurden Freiräume eröffnet, die es mir ermöglichten eigene Ideen zu verfolgen und weiterzuentwickeln. Zugleich hat die wissenschaftliche Diskussion die notwendige Orientierung gegeben um einen produktiven Weg zu verfolgen. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Christoph Syldatk möchte ich mich sowohl für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken als auch für die produktive Zusammenarbeit im Rahmen des Bi-Cycle Projekts.

Frau Prof. Dr. Ursula Obst, Herrn Dr. Gerald Brenner-Weiß und Herrn Dipl.-Ing. Frank Kirschhöfer danke ich für die Möglichkeit am Institut für Funktionelle Grenzflächen des KIT Messungen durchführen, für die tatkräftige Unterstützung und für die wissenschaftlichen Diskussionen.

Cand. Dr.-Ing. Ines Schulze danke ich herzlichst für die freundschaftliche Zusammenarbeit im Bi-Cycle Projekt, die nicht nur produktiv, sondern auch immer eine angenehme Abwechslung war und dazu einen Blick über den Tellerrand des Bereichs III ermöglichte.

Großen Dank schulde ich Herrn Dipl.-Ing. (FH) Christian Steinweg und Herrn Dipl.-Ing (FH) Thomasz Duczmal für den unermüdlichen Einsatz bei der ständigen Expansion des Technikums und den erstklassigen Entwicklungsarbeiten, die sie geleistet haben. Aber auch für die Unterstützung bei technischen Problemen während der täglichen Arbeit danke ich ihnen herzlich. Bei Frau Dr. Meike Dössel bedanke ich mich für die Unterstützung und Diskussion hinsichtlich der Entwicklung chemischer Methoden und für das Korrekturlesen. Darüber hinaus möchte ich allen Kollegen danken, die mir ein angenehmes Arbeitsumfeld

geschaffen haben. Besonders freue ich mich über die Freundschaften, die sich entwickelt haben und hoffentlich nicht unter der räumlichen Trennung der Lebenswege leiden werden.

Ein ganz herzlicher Dank gilt auch meinen Studenten, ohne deren fleißige Mitarbeit nicht alle aufwändigen Versuche hätten durchgeführt werden können, welche die Grundlage dieser Arbeit bilden. Im Rahmen ihrer Praktika oder Bachelor-, Master-, Studien- und Diplomarbeiten haben sie wesentlich zum Gelingen dieses Vorhabens beigetragen. Ich bedanke mich bei Manuel Mayer, Jan-Ulrich Schad, Johannes Schmidt, Sarah Otte, Vanessa Hug, Maria Julia Martinez, Ezequiel Veneciano, Sebastian Zanone, Alejandro Garcia, Lewis Martin und Pedro Domingues.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die Förderung der Forschungsprojekte.

Zuletzt und in höchstem Maße bedanke ich mich bei meiner gesamten Familie und Fiona für die Unterstützung, insbesondere bei meinen Eltern, die den Erwerb von Bildung stets gefördert und mich bei allen Entscheidungen mit viel Geduld unterstützt haben.

Robert Dillschneider

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	vi
Nomenklatur	ix
1 Einleitung	1
1.1 Ausgangssituation	1
1.2 Zielsetzung der Arbeit	2
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 Die phototrophe Kultivierung von Mikroalgen.....	4
2.1.1 Klassifikation von Algen	4
2.1.2 Photosynthese und die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen.....	5
2.1.3 Die Effizienz des photosynthetischen Wachstums	8
2.1.4 Die Photokonversionseffizienz als Kennzahl des Wirkungsgrades von Prozessen.....	11
2.1.5 Optimierung der Prozesseffizienz auf Basis der Reaktorentwicklung.....	13
2.2 Das Potential der Biodieselproduktion mit Mikroalgen.....	17
2.2.1 Die Gewinnung erneuerbarer Energieträger aus Mikroalgen	17
2.2.2 Die Induktion der Lipidsynthese.....	19
2.2.3 Prozessstufen der Biodieselproduktion.....	21
2.2.4 Prozesseffizienz und Wirtschaftlichkeit der Biodieselgewinnung mit Mikroalgen.....	24
2.3 Die Versorgung phototropher Prozesse mit CO ₂ und Regelungskonzepte.....	29
2.3.1 CO ₂ als Substrat in der phototrophen Kultivierung	29
2.3.2 Die Regelung der CO ₂ -Versorgung in der phototrophen Kultivierung	32
3 Material und Methoden	34
3.1 Algenstämme.....	34
3.1.1 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	34
3.1.2 <i>Nannochloropsis salina</i>	34
3.1.3 <i>Chlorella vulgaris</i>	35
3.2 Kultivierungsbedingungen	35
3.2.1 Nährmedium.....	35
3.2.2 Stammhaltung und Vorkulturen.....	36
3.2.3 Satzkultivierung in Mini-Plattenreaktoren.....	37
3.2.4 Satzkultivierung in Midi-Plattenreaktoren.....	38
3.2.5 Diskontinuierliche Kultivierung in Midi-Plattenreaktoren mit wiederholten Ernteschritten	41
3.2.6 Kontinuierliche Kultivierung in Midi-Plattenreaktoren.....	41
3.2.7 Kultivierung im Rührkesselreaktor	43
3.2.8 Kultivierung im Wellenreaktor zum Scale-up von Photobioprocessen	45
3.2.9 Kopplung heterotropher Hefekultivierung und phototropher Kultivierung von Algen	48
3.3 Analytische Methoden	49
3.3.1 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration.....	49
3.3.2 Berechnung der Wachstumsrate und der volumetrischen Produktivität.....	50
3.3.3 Bestimmung der Pigmentkonzentrationen	51

3.3.4	Bestimmung der Kohlenhydratkonzentrationen	53
3.3.5	Messung der Anionenkonzentrationen.....	53
3.3.6	Gaschromatographie	54
3.3.7	Bestimmung der Gesamtlipidkonzentration.....	54
3.3.8	Bombenkalorimetrie.....	56
3.4	Bestimmung des CO ₂ -Transportkoeffizienten	56
3.5	Berechnung der Photokonversionseffizienz (PCE).....	58
3.6	Simulation mit Matlab.....	60
4	Ergebnisse	61
4.1	Untersuchungen zur Effizienz der Lipidsynthese durch Mikroalgen	61
4.1.1	Lipidakkumulation von <i>P. tricornutum</i> unter Nährstoffmangel	61
4.1.2	Einfluss der Lipidakkumulation auf die Verbrennungsenthalpie von Biomasse	65
4.1.3	Entwicklung einer Methodik zur Bestimmung der PCE auf Basis der Energiebilanzierung	66
4.1.4	Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf die Effizienz der Lipidbildung.....	68
4.1.5	Untersuchung der Ursachen steigender Produktivität und Effizienz bei höherer Verfügbarkeit von Stickstoff im Kulturmedium.....	70
4.1.6	Produktivität und Effizienz des Wachstums von <i>P. tricornutum</i> unter Lichtlimitierung	75
4.1.7	Speicherlipidakkumulation bei zyklischer Tag-Nacht Beleuchtung.....	77
4.2	Prozessführungsvarianten zur effizienten Biomassebildung und Lipidsynthese	79
4.2.1	Diskontinuierliches Verfahren mit wiederholten Erntezyklen.....	79
4.2.2	Zweistufige kontinuierliche Prozessführung	82
4.3	Simulation des Wachstums von <i>P. tricornutum</i> und der Lipidakkumulation durch lineare Programmierung.....	85
4.3.1	Zielsetzung	85
4.3.2	Struktur des Modells	85
4.3.3	Lichtabsorption	87
4.3.4	Photosynthese und Effizienz der Lichtnutzung	88
4.3.5	Biomassezusammensetzung und metabolische Kosten	92
4.3.6	Stöchiometrie	95
4.3.7	Kinetik / Lineare Programmierung	96
4.3.8	Massenbilanzen / Berechnung der Zustandsvariablen	99
4.3.9	Modellvalidierung	100
4.4	Scale-up des Prozesses und Integration von phototropher und heterotropher Kultivierung	102
4.4.1	Maßstabsübertragung in den Semi-Pilotmaßstab.....	102
4.4.2	Einzeller-Ölproduktion im Semi-Pilotmaßstab durch Prozessintegration von heterotropher und phototropher Kultivierung	108
4.5	Monochromatisches Licht als alternative Energiequelle für Kultivierungen von Mikroalgen	111
4.6	Der Einfluss gelösten Kohlenstoffdioxids auf das Wachstum von Mikroalgen und die Etablierung einer modellprädiktiven dCO ₂ -Regelung.....	115
4.6.1	Einfluss der PFD auf das Wachstum von <i>C. vulgaris</i>	115
4.6.2	Beeinflussung der Wachstumsrate durch die Verfügbarkeit von gelöstem CO ₂ in der Flüssigphase	117
4.6.3	Modellprädiktive Regelung des gelösten CO ₂ über das pH-Signal	120
4.6.4	Experimentelle Ermittlung des k_{a} im Rührkesselreaktor.....	125

4.6.5	Experimentelle Untersuchung der modellprädiktiven Regelung des dCO ₂ über das Signal des pH-Sensors	126
5	Diskussion	133
5.1	Die Effizienz der Lipidsynthese mit Mikroalgen	133
5.1.1	Die Eignung von <i>P. tricornutum</i> als Produzent von Lipiden zur Biodiesel-Gewinnung.....	133
5.1.2	Physiologische Effekte der Stickstoff- und Phosphorlimitierung.....	135
5.1.3	Bestimmung der Effizienz der Lipidakkumulation von <i>P. tricornutum</i>	137
5.1.4	Prozesstechnische und physiologische Beschränkungen der Effizienz der Speicherlipidakkumulation	139
5.1.5	PCE bei lichtlimitiertem und nährstofflimitiertem Wachstum	142
5.1.6	Einfluss der zyklischen Tag-Nacht Beleuchtung auf die Prozesseffizienz	146
5.2	Weiterentwicklung der Prozessführung zur effizienten Lipidsynthese	148
5.3	Simulation der Speicherlipidakkumulation von <i>P. tricornutum</i>	150
5.4	Scale-up des Photobioprozesses.....	157
5.4.1	Maßstabsübertragung in den Semi-Pilotmaßstab.....	157
5.4.2	Prozessintegration durch Kopplung heterotropher und autotropher Kultivierung von SCO-akkumulierenden Mikroorganismen.....	158
5.5	Die Nutzung mono- bzw. dichromatischer Lichtquellen zur Kultivierung von Mikroalgen	161
5.6	Einfluss der Konzentration von gelöstem CO ₂ auf das Wachstum von <i>C. vulgaris</i> und modellprädiktive Regelung	164
5.6.1	Beeinflussung der Wachstumskinetik von <i>C. vulgaris</i> durch die PFD und die Konzentration des gelösten CO ₂	164
5.6.2	Etablierung und Test einer modellprädiktiven CO ₂ -Regelung	167
6	Zusammenfassung und Ausblick	170
	Abstract.....	174
7	Literaturverzeichnis.....	178
	Anhang.....	192
A 1	Nährmedien	192
A 2	Kalibrierungen.....	193
A 3	Experimentelle Ergebnisse	195
A 4	Matlab Programm.....	203
	Modellierung des Wachstums und der Speicherlipidakkumulation.....	203
	Modellprädiktive Regelung.....	207

Nomenklatur

α'	Parameter des PSU Modells [$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]
A	Winkel [$^\circ$]
δ	Parameter des PSU Modells [-]
$\Delta H_{c,\text{TAG}}$	Verbrennungsenthalpie der Speicherlipide [kJ/g]
$\Delta H_{c,\text{CH}}$	Verbrennungsenthalpie der Speicherkohlenhydrate [kJ/g]
$\Delta H_{c,x}$	Verbrennungsenthalpie der Biomasse [kJ/g]
ε_{app}	beobachteter Extinktionskoeffizient [m^2/g]
η, η'	Wirkungsgrad [%] (Kapitel 4.3.4)
η	Viskosität [$\text{kg}/(\text{m} \cdot \text{s})$] (Kapitel 4.4.1)
κ	Parameter des PSU Modells [-]
Λ	Wellenlänge [nm], Gewichtungsfaktor [-]
μ	Wachstumsrate [d^{-1}]
μ_{max}	maximale Wachstumsrate [d^{-1}]
R	Dichte [kg/m^3]
$\omega_{X,Y}$	Massenanteil des Elements X in der Komponente Y [-]
φ_{CO_2}	CO ₂ -Volumenanteil [-]
A	beleuchtete Oberfläche der Kultur [m^2]
A	Parameter zur Berechnung von ε_{app} [m]
ATP	Adenosinriphosphat
b	Parameter zur Berechnung von ε_{app} [m^2/g]
B	stöchiometrische Matrix
C	Lichtgeschwindigkeit [m/s]
c_{Car}	Karotinoidkonzentration [mg/l]
c_{CH}	Konzentration der Speicherkohlenhydrate [g/l]
$c_{\text{CH,max}}$	maximale Konzentration der Speicherkohlenhydrate [g/l]
$c_{\text{Chl a}}$	Chlorophyll a-Konzentration [mg/l]
$c_{\text{Chl c}}$	Chlorophyll c-Konzentration [mg/l]
c_{L}	Lipidkonzentration [g/l]
$c_{\text{NO}_3^-}$	Nitratkonzentration [g/l]
$c_{\text{PO}_4^{3-}}$	Phosphatkonzentration [g/l]
$c_{\text{SO}_4^{2-}}$	Sulfatkonzentration [g/l]
c_{TAG}	Speicherlipidkonzentration [g/l]
$c_{\text{TAG,max}}$	maximale Konzentration der Speicherkohlenhydrate [g/l]
c_{X}	Biomassekonzentration [g/l]
$c_{\text{X,a}}$	Konzentration aktiver Biomasse [g/l]
CCM	CO ₂ -konzentrierender Mechanismus (carbon concentrating mechanism)
$d'_{(M,1)}$	Störgrößenvektor
EPA	Eicosapentaensäure
H	Plancksches Wirkungsquantum [$\text{J} \cdot \text{s}$]
$H_{(N,M)}$	systembeschreibende Matrix
f^*	Gewichtungsfaktor [-]
$f_{(N,1)}$	freie Antwort des Systems
I	Photonenflussdichte [$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]

I_0	eingestrahelte Photonenflussdichte [$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]
I_{abs}	absorbierte Photonenflussdichte [$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]
I_{trans}	transmittierte Photonenflussdichte [$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]
K	Michaelis-Menten-Konstante [g/l]
K_H	Henry-Koeffizient [$\text{mol}/(\text{l} \cdot \text{Pa})$]
K_{Inh}	Inhibierungskonstante [-]
k_{ja}	volumetrischer Transportkoeffizient [s^{-1}]
L	Länge [m]
N	Glättungsparameter [-]
M	molare Masse [g/mol]
N	Prädiktionshorizont
N_A	Avogadro-Konstante [mol^{-1}]
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
$\text{OD}_{750\text{nm}}$	optische Dichte, gemessen bei der Wellenlänge 750 nm
P_m	Parameter des PSU Modells [d^{-1}]
PCE	Photokonversionseffizienz
PFD	Photonenflussdichte
PSU	photosynthetische Einheit (photosynthetic unit)
Q	Volumenstrom [l/s]
\mathbf{r}^*	Spaltenvektor (von Synthese- und Substrataufnahmeraten)
$r_{\text{ATP}}, r_{\text{NADPH}}$	spezifische ATP (/NADPH)-Syntheserate [$\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{d})$]
$r_{\text{ATP}}^*, r_{\text{NADPH}}^*$	photosynthetische ATP (/NADPH)-Syntheserate [$\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{d})$]
r_{CH}	Speicherkohlenstoff-Syntheserate [$\text{g}/(\text{g} \cdot \text{d})$]
r_L	spezifische Lipidbildungsrate [$\text{g}/(\text{g} \cdot \text{d})$]
$r_{\text{m,ATP}}, r_{\text{m,NADPH}}$	ATP (/NADPH)-Verbrauchsrate des Erhaltungsstoffwechsels [$\text{mmol}/(\text{g} \cdot \text{d})$]
$r_{\text{m,ATP}}^*, r_{\text{m,NADPH}}^*$	minimale ATP (/NADPH)-Verbrauchsrate des Erhaltungsstoffwechsels [$\text{mmol}/(\text{g} \cdot \text{d})$]
$r_{\text{NO}_3^-}, r_{\text{PO}_4^{3-}}, r_{\text{SO}_4^{2-}}$	Nährstoffaufnahme von Nitrat, Phosphat und Sulfat [$\text{g}/(\text{g} \cdot \text{d})$]
$r_{\text{NO}_3}^*, r_{\text{PO}_4}^*, r_{\text{SO}_4}^*$	maximale Raten der Nährstoffaufnahme [$\text{g}/(\text{g} \cdot \text{d})$]
r_{TAG}	spezifische Speicherlipid-Syntheserate [$\text{g}/(\text{g} \cdot \text{d})$]
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
r_X	spezifische Biomassebildungsrate [$\text{g}/(\text{g} \cdot \text{d})$]
$r_{X,a}$	spezifische Syntheserate der aktiven Biomasse [$\text{g}/(\text{g} \cdot \text{d})$]
SCO	Einzelleröle ("single cell oils")
T	Zeit [s]
TAG	Triglyceride
$u_{(M,1)}$	Vektor der Stellgrößenänderungen
V	Volumen [m^3]
$Y_{V/W}$	Ausbeutekoeffizient der Synthese von V unter Verbrauch von W [g/g]

1 Einleitung

1.1 Ausgangssituation

Mit den Beschlüssen von 2010 und 2011 hat die Bundesregierung eindeutige Zeichen bezüglich der Energiewende in Deutschland gesetzt und ambitionierte Ziele gesteckt. So soll beispielsweise der Stromverbrauch bis zum Jahr 2050 zu 80 % aus erneuerbaren Energiequellen gedeckt werden. Die Strategie zum Erreichen der Ziele basiert auf Konzepten zur Effizienzsteigerung bzw. zur Energieeinsparung, dem Ausbau der nachhaltigen Nutzung erneuerbarer Energiequellen und der Modernisierung von Kraftwerken sowie Versorgungsnetzen.

Große Fortschritte sind bereits zu verzeichnen, da der Beitrag erneuerbarer Energiequellen zur Deckung des Bruttostromverbrauchs zwischen 2010 und 2012 von 17 % auf 23 % stieg. Im Jahr 2012 wurde die Emission von Treibhausgasen im Vergleich zum Vorjahr um 12.000.000 t reduziert, der Anteil der Rohölimporte um 3 % reduziert und der Import von Ölprodukten sogar um 8 % gesenkt. Dagegen konnte der Anteil nachhaltiger Energiequellen zur Deckung des Kraftstoffverbrauchs im betrachteten Zeitraum nicht weiter gesteigert werden und betrug lediglich 5,5 % [1]. Hier kann insbesondere ein weiterer Ausbau der energetischen Nutzung von Biomasse zukünftig einen großen Beitrag leisten, da Biomasse der bislang einzige Energieträger ist, der nicht nur zur Gewinnung von Wärme und Strom genutzt werden kann, sondern auch zur direkten Erzeugung von Kraftstoffen [2].

Die Forschungsförderung durch verschiedene Ministerien bezieht die Entwicklung von Biokraftstoffen ein, etwa im Rahmen des Förderprogramms "Bioenergie" des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Auch in der Nationalen Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030 des Bundesministeriums für Bildung und Forschung ist die stoffliche und energetische Nutzung von Biomasse ein Kernthema. Hier wird auch explizit die Erforschung des Potentials von Algen aufgeführt [3].

Die Nutzung von Biomasse zur Energieerzeugung birgt grundsätzlich die Gefahr, dass eine Konkurrenz zwischen Nahrungsmittelversorgung und der Bereitstellung von Energieträgern entsteht [4]. Die Produktion von Mikroalgen ist dagegen unabhängig von der Nutzung fruchtbaren Landes. Daher wird Algenbiomasse als Rohstoff zur Erzeugung von Biotreibstoffen der zweiten Generation gezählt. Die Organismen eignen sich besonders für die

Gewinnung von Biokraftstoffen wie Biodiesel, da sie einen hohen Lipid-Massenanteil erreichen und Sonnenlicht mit hohem Wirkungsgrad nutzen können. Die Effizienz der Nutzung des Sonnenlichts während der Synthese lipidreicher Biomasse war Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit. Sie wird höher eingeschätzt als bei der Kultivierung von konventionellen Kulturpflanzen. Ein weiterer Vorteil der Nutzung von Mikroalgen resultiert aus dem geringen Wasserbedarf für ihre Kultivierung, sofern geschlossene Reaktoren genutzt werden. Dieses Potential kann insbesondere durch Wiederverwendung des Wassers voll ausgeschöpft werden, wodurch die Technologie auch in ariden Klimazonen Einsatz finden kann.

Neben der energetischen Nutzung von Mikroalgen ist jedoch auch die stoffliche Nutzung von steigender Bedeutung, da höherwertige Produkte, wie beispielsweise Farbstoffe, ungesättigte Fettsäuren oder Antioxidantien aus den Organismen extrahiert werden können. Die Biomasse oder einzelne Komponenten davon können zudem Verwendung als Nahrungsmittel oder Tierfutter finden.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ölhaltige Mikroalgen können Lipide als Speicherstoffe akkumulieren, was sie als potentielle Rohstoffe für die Produktion von Biodiesel interessant macht. Dabei stellt absorbiertes Sonnenlicht die Energiequelle für die Organismen dar. Der Wirkungsgrad der Umwandlung der absorbierten Energie und Speicherung der Energie in Form von Biomasse wird als Photokonversionseffizienz (photoconversion efficiency, PCE) bezeichnet. Die PCE stellt eine bedeutende Kennzahl für die Beurteilung der ökonomischen und energetischen Nutzbarkeit der Technologie dar. Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit war die Quantifizierung der PCE während der Speicherlipid-Akkumulation der Algen und die Entwicklung der dazu notwendigen Methodik. Die zugehörigen experimentellen Arbeiten wurden mit dem Modellorganismus *Phaeodactylum tricornutum*, einer Kieselalge, durchgeführt. Ferner sollten physiologische bzw. technische Beschränkungen des Wirkungsgrades untersucht und dabei relevante Einflussfaktoren in die Betrachtung einbezogen werden. Darüber hinaus wurde versucht durch die Prozessentwicklung Strategien zur effizienten Produktion von lipidreicher Algenbiomasse zu entwickeln. Die Modellierung und Simulation leisten in der Regel wesentliche Beiträge zum besseren Prozessverständnis und tragen dazu bei die Prozessentwicklung zu beschleunigen. Vor diesem Hintergrund sollte ein physiologisches

Modell entwickelt werden, das die mathematische Beschreibung des Wachstums und der Lipidbildung während einer Nährstofflimitierung ermöglicht. Grundlage der Modellierung bildete dabei die Überlegung, dass der Metabolismus des Organismus stöchiometrischen und physiologischen Beschränkungen unterliegt. Nach Berücksichtigung aller der mathematischen Abbildung zugänglicher Beschränkungen verbleiben allerdings wegen der Komplexität des Stoffwechsels mehrere Freiheitsgrade. Unter der Annahme, dass der Metabolismus *in vivo* eine für den Organismus optimale Ausprägung annimmt, wurde versucht das resultierende System mit der Methodik der linearen Programmierung *in silico* mathematisch abzubilden.

Zum Scale-up des Bioprozesses wurde im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Bi-Cycle-Projekts außerdem ein neuartiger Photobioreaktor am Institut entwickelt und getestet. Bei der Reaktorentwicklung wurde auch die Möglichkeit der Beleuchtung mit monochromatischen Lichtquellen in die Betrachtung mit eingeschlossen. Diese Option wurde experimentell untersucht und hinsichtlich der Effizienz bewertet. Ein weiteres Projektziel war die Integration phototropher Algen- und heterotropher Hefekultivierung zur Produktion von Einzellerölen. Dabei stand die stoffliche Nutzung von Nebenproduktströmen, insbesondere des CO₂-haltigen Abgases der Hefefermentation, zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit des Prozesses im Fokus der Betrachtung.

Letztlich ist neben der Beleuchtung der Algen auch die Versorgung mit der Kohlenstoffquelle CO₂ ein wichtiger Einflussfaktor auf das Wachstum der phototrophen Mikroorganismen. Der Einfluss der CO₂-Konzentration im Kulturmedium auf die Wachstumsrate sollte dazu quantitativ untersucht und die CO₂-Versorgung der Kulturen durch die Entwicklung eines modellprädiktiven Regelungskonzepts optimiert werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Die phototrophe Kultivierung von Mikroalgen

2.1.1 Klassifikation von Algen

Es existiert keine einheitliche Definition des Begriffs „Alge“. In verschiedenartigen Ansätzen wurde diese heterogene Gruppe von Organismen zu anderen, klarer definierten taxonomischen Gruppen abgegrenzt. So ordnete Ragan Cyanobakterien und photosynthetische eukaryotische Organismen den Algen zu, sofern diese nicht zu den grünen Pflanzen gehören [5]. Entwistle grenzte die einfachen photosynthetischen Organismen der Algen insbesondere gegenüber Moosen ab [6, 7]. Der Grund für die Schwierigkeit eine einheitliche Definition zu finden liegt darin begründet, dass viele lediglich entfernt verwandte Arten zu Algen gruppiert werden [6].

Zu den phänotypischen Klassifikationskriterien zählen die Arten der Pigmente, die Komponenten der Zellwand, die Art der Speicherstoffe und das Vorhandensein und der Aufbau von Flagellen. Darüber hinaus gilt auch die Anwesenheit oder das Fehlen einer endoplasmatische Umhüllung von Chloroplasten oder der Verbindung des endoplasmatischen Retikulums und des Zellkerns als Unterscheidungsmerkmal. Letztlich werden auch Unterschiede in der Kern- und Zellteilung als Klassifikationskriterien herangezogen [8]. Neben der Morphologie bzw. dem Phänotyp werden auch genetische Verwandtschaftsbeziehungen auf Grundlage der Sequenzierung von Nukleinsäuren zur Einordnung herangezogen [6]. Derzeit erfolgt die Zuordnung zu mehr als 30 Klassen von Algen [6]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl mit *Chlorella vulgaris* des Phylums Chlorophyta (Grünalge) als auch mit *Phaeodactylum tricornutum*, zugehörig zu den Bacillariophyta (Diatomeen), und mit *Nannochloropsis salina* des Phylums Eustigmatophyceae gearbeitet (siehe Abschnitt 3.1).

2.1.2 Photosynthese und die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen

Obwohl photosynthetisches Wachstum nicht die einzige Möglichkeit der Energiekonversion für Mikroalgen darstellt, sondern auch heterotrophes und mixotrophes Wachstum zu finden sind [9], stellt die Photosynthese ein zentrales Merkmal des Stoffwechsels von Mikroalgen dar. Die Photosynthese bildet die Grundlage aller natürlich erzeugten organischen Kohlenstoffverbindungen. Sie ist der Mechanismus der Energiekonversion von Lichtenergie in chemische Energie und stellt ATP und Reduktionsäquivalente für die Fixierung von CO₂ und weitere Reaktionen des Anabolismus zur Verfügung. Die vereinfachte Netto-Reaktionsgleichung der Photosynthese lautet [10]:



In dieser endothermen Reaktion werden aus der anorganischen Kohlenstoffquelle CO₂ organische energiereichere Kohlenhydrate gebildet. Die notwendige Energie wird im Zuge der Absorption von Photonen durch Chromophore bereitgestellt. Letztere sind hauptsächlich Chlorophyll-Moleküle, welche mit Proteinen assoziiert sind und dadurch Pigmente bilden. Ein geringer Teil der photosynthetischen Pigmente sind in sogenannten Reaktionszentren lokalisiert. Der größere Teil der Chromophore ist in Antennenkomplexen zu finden. Diese absorbieren Photonen und leiten die Energie zu den Reaktionszentren weiter. Dadurch entsteht ein Trichtereffekt: Auf größerer Fläche können Photonen absorbiert werden, während die aus Thylakoidmembran-assoziierten Molekülen bestehende Elektronentransportkette lokal konzentriert vorliegt [11, 12].

Man unterscheidet zwei wesentliche Phasen der Photosynthese, die Lichtreaktion und die Dunkelreaktion. Während die Energie der absorbierten Quanten in der Lichtreaktion genutzt wird, um ATP und NADPH zu synthetisieren, werden diese Moleküle in der Dunkelreaktion dephosphoryliert bzw. oxidiert um im Calvin-Benson-Zyklus CO₂ zu fixieren [13, 14].

In der Lichtreaktion findet eine Anregung von Elektronen in den beiden Photosystemen PS II (P680) und PS I (P700) statt. Die angeregten Elektronen werden entweder im linearen Elektronentransport über eine Reihe von Molekülen in der Elektronentransportkette auf den terminalen Elektronenakzeptor NADP⁺ übertragen (siehe Abb. 2.1) oder beim zyklischen Elektronentransport um das PS I auf dasselbe Molekül rückübertragen. Im ersten Fall wird die

entstehende Elektronenlücke am PS II durch Wasserspaltung geschlossen. Es entsteht molekularer Sauerstoff, weshalb dieser Reaktionsmechanismus auch als oxygene Photosynthese bezeichnet wird. Den beiden Mechanismen ist dabei gemeinsam, dass die Energie der angeregten Elektronen genutzt wird, um einen transmembranen elektrochemischen Gradienten aufzubauen. Er führt zur Ansäuerung des Lumens. Das elektrochemische Potential wird bei Rückfluss der Protonen über die Membran genutzt, um die Phosphorylierung von ADP durch die ATPase anzutreiben [15, 16].

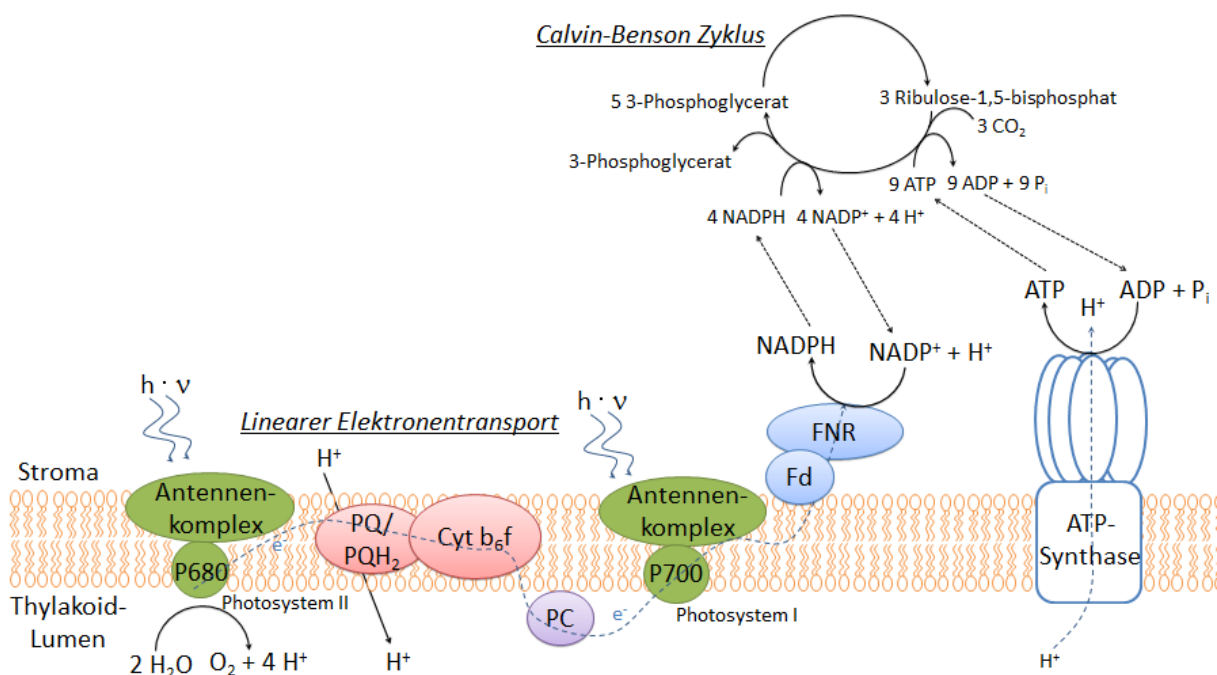


Abb. 2.1: Linearer Elektronentransport und CO₂-Fixierung. P680: Chlorophyll im Reaktionszentrum des PS II; P700: Chlorophyll im Reaktionszentrum des PS I; PQ: Plastochinon; Cyt b₆f: Cytochrom-b₆f-Komplex; PC: Plastocyanin; Fd: Ferredoxin; FNR: Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase; e⁻: Elektron.

In der Dunkelreaktion wird CO₂ auf Ribulose-1,5-bisphosphat übertragen und es entstehen zwei Moleküle Triosephosphat. Die Reaktion der Kohlenstofffixierung wird von dem Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO) katalysiert. Ein Teil des gebildeten Triosephosphats wird genutzt, um über die Glukoneogenese Glucose oder darüber hinaus weitere Kohlenhydrate, wie etwa Polysaccharide der Zellwand oder Kohlenhydrat-Reservestoffe zu synthetisieren. Außerdem können sie direkt der weiteren Glykolyse zugeführt werden. Der verbleibende Teil des Triosephosphats wird zur Regeneration von Ribulose-1,5-bisphosphat genutzt [17].

Die Photosynthese darf nicht als statisch ablaufender Prozess betrachtet werden bei dem alle Reaktionsschritte mit konstanten Raten ablaufen. Die Betrachtung der Effizienz der photosynthetischen Energieumwandlung muss vielmehr die dynamische Abstimmung vieler beteiligter Prozessschritte einbeziehen.

Einerseits laufen die einzelnen Reaktionen der Photosynthese bei isolierter Betrachtung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ab. Daher müssen die Konzentrationen aller beteiligten Moleküle aufeinander abgestimmt sein um die Akkumulation von Zwischenprodukten zu vermeiden. Andererseits fluktuiert die Lichtintensität in natürlichen Habitaten infolge von Tag-Nacht-Beleuchtungszyklen, aufgrund von Bewölkung oder durch die zeitlich variierende Eintauchtiefe in Gewässern stark. Daher muss eine leistungsstarke Regulation auf verschiedenen Ebenen der Photosynthese vorhanden sein [14]. Bei der Kultivierung in Reaktoren sind die Mikroorganismen drastischeren zeitlichen Variationen der Lichtintensität ausgesetzt, welche durch die in der Regel schnelle radiale Durchmischung und die starken Lichtgradienten bei hohen Biomassekonzentrationen verursacht werden.

Die Notwendigkeit der Anpassung der Photosyntheserate an die variierende Photonenflussdichten (PFD) und an den variablen Verbrauch infolge der CO₂-Fixierung und des Wachstums führt dazu, dass die Photosynthese mit variabler Effizienz abläuft.

Die Regulationsmechanismen werden vor allem durch die Ansäuerung des Lumens der Thylakoide infolge des Aufbaus des Protonengradienten sowie durch eine Akkumulation von Reduktionsäquivalenten gesteuert. Damit ist der lineare Elektronentransport direkt mit der Rate des Verbrauchs von NADPH und ATP im Calvin-Benson-Zyklus gekoppelt und beide Prozesse werden dynamisch aneinander angepasst [18, 19]. Die Prozesse der Regulation und der Nutzung alternativer Elektronensenken weisen unterschiedliche Zeitkonstanten auf und können demnach in langsame und schnelle Regulationsmechanismen eingeteilt werden. Die zentralen Mechanismen sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst. Eine ausführliche Darstellung ist in [14] zu finden.

Die Prozessdynamik und die alternativen Ausprägungen des photosynthetischen Prozesses implizieren allerdings, dass die Photosynthese nicht mit konstanter Effizienz abläuft. Vielmehr hängen die photosynthetische Nutzung absorbierten Elektronen einerseits und die Absorptionskapazität der Zellen andererseits von den Kultivierungsbedingungen und damit insbesondere von der Lichtintensität ab.

Tabelle 2-1: Regulationsmechanismen der Photosynthese

Prozess	Reaktions- geschwindigkeit der Zellen	Mechanismus / Bedeutung
zyklischer Elektronentransport	schnell	Elektronen werden vom Donor (PS I) zurück auf denselben Akzeptor transferiert; Anpassung des NADPH/ATP-Verhältnis; nur Bildung von ATP
Photorespiration	schnell	Alternative Elektronensenke; Oxygenierung von Ribulose-1,5-bisphosphat durch Konkurrenz von CO ₂ und O ₂ am RuBisCO, [20]
Nichtphotochemisches Quenching (NPQ)	schnell	Energie-Dissipation durch Fluoreszenz (vermutlich über Chlorophyll-Karotinoid-Interaktion) [21-23]
Photoinhibierung	schnell	Gleichgewicht zwischen ROS (reaktive Sauerstoffspezies) induzierter Degradation in PS II und Reparatur des D1-Proteins [24]
Malat-Shuttle	schnell	Oxidation von NADPH in der Atmungskette der Mitochondrien zur Anpassung des ATP/NADPH-Verhältnisses [25]
Mehler Reaktion	schnell	Direkte Oxidation am PS I; Übertragung der Elektronen auf O ₂ und Konversion von O ₂ ⁻ zu H ₂ O ₂ durch Superoxiddismutase; Photoprotektion und Anpassung des ATP/NADPH-Verhältnisses [26, 27]
Remodellierung von Antennenkomplexen - Photoakklimation	langsam	Reduktion der Größe oder des Querschnitts von Antennen; Anpassung des Verhältnisses von PS I : PS II; Reduktion der Anteile von PS I bei Eisenmangel [28-30]

2.1.3 Die Effizienz des photosynthetischen Wachstums

Infolge der dynamischen Prozesse der photosynthetischen Regulation ergeben sich unterschiedliche Wirkungsgrade der Photosynthese. Diese hängen im Wesentlichen von den Umgebungsbedingungen ab. Dabei beeinflusst hauptsächlich die Lichtintensität das Wachstum der Mikroorganismen.

Die Messung des Einflusses der Lichtintensität erfolgt in der Regel auf drei unterschiedliche Weisen. Einerseits wird oft die Rate der photosynthetischen O₂-Bildung gemessen, die sich bei verschiedenen Lichtintensitäten ergeben [31]. Andererseits kann die Energiedissipation infolge der Fluoreszenz als Maß für die Effizienz der Photosynthese herangezogen werden

[32]. Bei der Anwendung beider Methoden ist darauf zu achten, dass die Zellen vor der Messung eine angemessene Zeit lang der entsprechenden Lichtintensität ausgesetzt werden müssen, so dass die Photoakklimation vollständig abgeschlossen ist und prozessrelevante Daten erhoben werden können. Letztlich kann die Wachstumsrate in Satzkultivierungen oder Kultivierungen der Mikroorganismen im Turbidostat direkt gemessen und der Einfluss der PFD auf die Wachstumsrate untersucht werden [33]. Die Algen sind dann zum Zeitpunkt der Messung photoadaptiert und es können prozessrelevante Daten erhoben werden. Die Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Lichtintensität bzw. PFD wird in der Regel durch die sogenannte PI-Kurve dargestellt (Abb. 2.2).

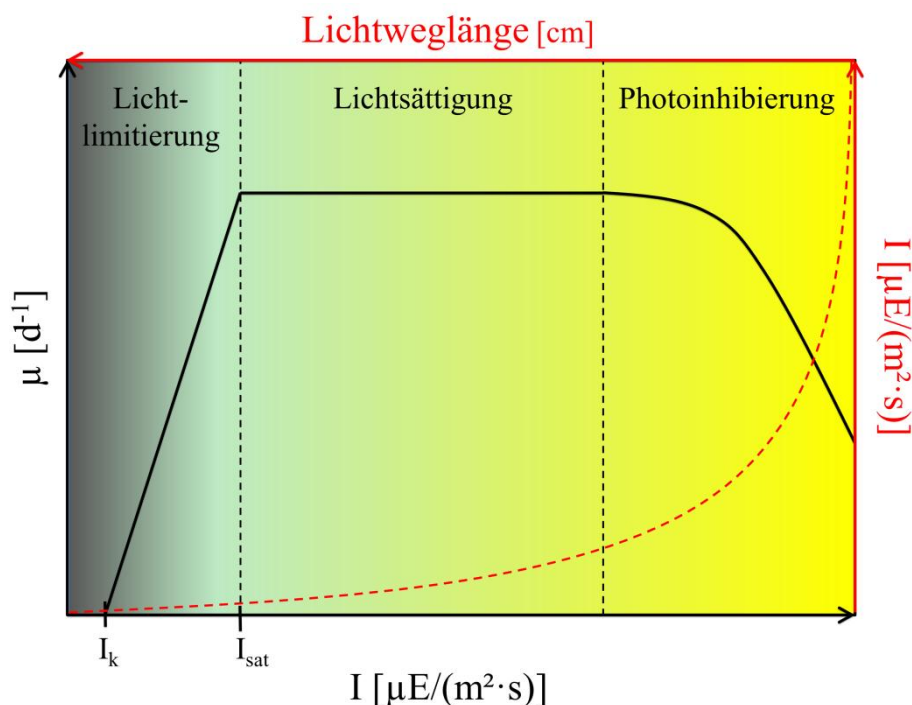


Abb. 2.2: Idealisierte PI-Kurve und Lichtgradient im Photobioreaktor. I : Photonendichte (PFD); μ : Wachstumsrate. I_k : Lichtkompensationspunkt; I_{sat} : sättigende PFD.

Die idealisierte PI-Kurve kann grob in drei Teilbereiche untergliedert werden. Im Bereich geringer PFD ist die Kultur lichtlimitiert und die Wachstumsrate steigt mit steigender Photonendichte linear an. Dabei muss die PFD I_k überschritten werden, so dass Nettowachstum beobachtet werden kann. Ist die PFD geringer, so ist der Energiebedarf des Erhaltungsstoffwechsels größer als die durch den photosynthetischen Apparat konvertierte und in Form von ATP und Reduktionsäquivalenten bereitgestellte Energie. Überschreitet die PFD I_{sat} , also die sättigende Lichtintensität, so steigt die Wachstumsrate nicht weiter an und ein größerer Teil der absorbierten Energie wird dissipiert. Der Wirkungsgrad der

Photosynthese sinkt [34]. Die in Tabelle 2-1 aufgeführten Energiedissipationsmechanismen gewinnen an Relevanz. Darüber hinaus führt die Photoakklimation dazu, dass die einzelne Zelle durch Reduktion des Querschnitts oder der Größe der Antennenkomplexe die Kapazität zur Lichtabsorption reduziert [14, 28-30].

Bei sehr hoher PFD sinkt die Wachstumsrate, da der Prozess der Photoinhibierung einsetzt. Die durch die Zelle absorbierte Energie übersteigt die Kapazität der Energiedissipation und auch die Reduktion der Lichtabsorption ist nicht ausreichend, um das Entstehen von Radikalen zu verhindern. In der Photoinhibierung steht die durch reaktive Sauerstoffspezies induzierte Schädigung des photosynthetischen Apparates im Gleichgewicht mit der Reparatur des D1-Proteins [24].

Wie Abb. 2.2 zeigt, liegt im Photobioreaktor immer ein Lichtgradient vor, da die Zellen Licht absorbieren und sich somit gegenseitig abschatten [34]. Der Lichtgradient kann unter Vernachlässigung der Lichtstreuung vereinfacht durch ein exponentielles Absinken der PFD beschrieben werden [35]. Bereits bei geringen Biomassekonzentrationen und hoher eingestrahelter PFD ist die Abschattung so stark, dass sich auch in Reaktoren mit geringer Schichtdicke ein Lichtprofil im Reaktor ausbildet, das alle drei Bereiche der PI-Kurve repräsentiert (Abb. 2.2, siehe auch [34]). Demnach liegen unter Umständen Bereiche im Reaktor vor, wo die PFD so hoch ist, dass bereits eine Schädigung der Zellen eintreten kann und Bereiche, welche derart geringe Lichtintensitäten aufweisen, dass kein Wachstum möglich wäre. Zusätzlich zum räumlichen Gradienten der PFD sind die Zellen in der Satzkultivierung starken zeitlichen Variationen der Lichtintensität ausgesetzt, da sich die Biomassekonzentration im Kultivierungsverlauf stark ändert. Auf diese vergleichsweise langsamen Änderungen der Lichtintensität reagieren die Zellen durch Photoakklimation in Form der Anpassung der Pigmentausstattung. Zudem werden weitere Energiedissipationsmechanismen, wie sie in Tabelle 2-1 dargestellt sind, und gegebenenfalls alternative Elektronensenken genutzt, um flexibel auf die Lichtverhältnisse zu reagieren. Wesentlich schnelleren zeitlichen Variationen der Lichtintensität sind die Zellen dagegen durch die radiale Durchmischung im Reaktor ausgesetzt. So induzieren die individuellen Strömungsprofile in den Photobioreaktoren die Zirkulation der Zellen durch helle und dunkle Bereiche [36]. Auch hierbei muss die Zelle die photosynthetische Lichtabsorption und Energiekonversion auf den Verbrauch von ATP und Reduktionsäquivalenten durch die oben aufgeführten Regulationsmechanismen abstimmen. Insgesamt können sich bei günstiger radialer Durchmischung und geeigneten Frequenzen positive Effekte auf die Wachstumsrate

ergeben, wenn die Zellen während der Exposition in hellen Bereichen der Zellsuspension ihre ATP- und NADPH-Speicher füllen und diese während der Dunkelphase durch die langsamere Reaktion der CO₂-Fixierung wieder geleert werden. Dieser Effekt wird als flashing light Effekt bezeichnet. In diesem Fall nimmt die Hydrodynamik erheblichen Einfluss auf die Effizienz der Photosynthese und das Wachstum kann nicht weiter als alleiniges Resultat der eingestrahnten PFD und isoliert von der radialen Durchmischung betrachtet werden [37].

Neben der Lichtintensität gibt es weitere Einflussfaktoren, welche den Wirkungsgrad der Photosynthese beeinflussen. So wurde beispielsweise die Temperaturabhängigkeit des Wachstums von Mikroalgen demonstriert [38]. Vermutlich bedingt die Überlagerung beider Einflüsse, der Temperatur und der Lichtintensität, dass die Effizienz der Photosynthese durch eine Akkumulation von Reduktionsäquivalenten und den verlangsamten Abbau des Protonengradienten verringert wird [14]. Letzterer entsteht beispielsweise dadurch, dass das Wachstum der Mikroorganismen bzw. die CO₂-Fixierung durch ungünstige Temperaturen verlangsamt ist und daher zeitlich weniger NADPH und ATP im Calvin-Benson-Zyklus verbraucht wird [38].

2.1.4 Die Photokonversionseffizienz als Kennzahl des Wirkungsgrades von Prozessen

Die Photokonversionseffizienz (photoconversion efficiency, PCE) gibt als Kennzahl den Wirkungsgrad phototropher Prozesse an. Dabei wird der Energiegehalt neu gebildeter Biomasse - bzw. deren Verbrennungsenthalpie - auf die absorbierte Lichtenergie bezogen. Vorteilhaft ist, dass die Kennzahl somit im Vergleich zur volumetrischen Produktivität die Haupteinflussgröße des phototrophen Wachstums, nämlich die Lichtintensität, in die Betrachtung einschließt. Dennoch gibt es einige Einflussgrößen, welche die PCE verändern können und somit hängt diese stark von den Prozessbedingungen ab. Letztlich muss ein Prozess im Hinblick auf die PCE optimiert werden, um konkurrenzfähig Biomasse bzw. Lipide für die Biodieselgewinnung zu produzieren und eine positive Energiebilanz des Gesamtprozesses zu erreichen.

In Bezug auf das eingestrahlte Licht kann für Organismen mit C₃-Metabolismus nach Tredici maximal eine PCE von ca. 12 % erreicht werden [34]. Die photosynthetischen Pigmente der Organismen absorbieren nur einen Teil des eingestrahnten Sonnenlichts, nämlich Photonen im photosynthetisch aktiven (photosynthetically active radiation, PAR) Bereich, und nutzen

diesen zur Energiekonversion. Der nicht genutzte Anteil von ca. 50 % bis 57 % [34, 39] der Energie des Sonnenlichts wird transmittiert oder durch das die Zellen umgebende Wasser oder andere Zellkomponenten absorbiert. Die Energie von Photonen der Wellenlängen 680 nm und 700 nm ist ausreichend, um die Quantenübergänge in den aktiven photosynthetischen Reaktionszentren auszulösen. Somit tritt ein weiterer Effizienzverlust dadurch auf, dass die Differenz des Energiegehalts kurzwelligerer Photonen dissipiert wird und damit einer energetischen Nutzung durch die Organismen nicht mehr zur Verfügung steht. Der Anteil der Energiedissipation beträgt ca. 21 % der Energie der absorbierten PAR-Photonen [34]. Hinzu kommt, dass die im fixierten Kohlenstoff enthaltene Verbrennungsenthalpie 477 kJ/mol beträgt, dagegen jedoch mindestens acht Photonen (im roten Farbbereich des Spektrums) zum Fixieren eines Moleküls CO₂ absorbiert werden müssen, was einer Energieabsorption von 1368 kJ/mol entspricht. Daher beträgt die Effizienz der Nutzung der Photonen 35 % [34, 40]. Die maximal erzielbare PCE von 12 % stellt lediglich eine physikalische/biochemische Obergrenze dar. In der Realität kann ein derart hoher Wirkungsgrad nicht erreicht werden. Die in Tabelle 2-1 dargestellten alternativen Elektronensenken und Energiedissipationsmechanismen führen dazu, dass die Photosynthese nur unter sehr eingeschränkten Bedingungen mit höchstmöglicher Effizienz abläuft. Dagegen führen insbesondere nicht-photochemisches Quenching, zyklischer Elektronentransport, Photorespiration und Photoinhibierung bei hohen Lichtintensitäten zu erheblichen Effizienzverlusten [34, 39, 41, 42]. Die Ausprägung dieser Verluste kann nicht pauschal quantifiziert werden, sondern ist stark von der Lichtverteilung innerhalb der Kultur abhängig. Hinzu kommt ein weiterer energetischer Aufwand durch Respiration, welcher den metabolischen Energiebedarf des Organismus abdeckt [39]. Darüber hinaus sind auch Verluste durch Reflektion an der Oberfläche der Photobioreaktoren oder Verluste der durch die Kultur aus dem Reaktor hinausgestreuten Photonen zu berücksichtigen. Die verschiedenen effizienz mindernden Vorgänge sind in der zeitlichen Folge des Auftretens in Abb. 2.3 dargestellt. In der Praxis ist aus den oben dargestellten Gründen eine PCE von 5 % zu erwarten, bzw. eine solche gilt als technisch realisierbar. Gegebenenfalls kann die PCE durch Maßnahmen der Prozessführung und Reaktorentwicklung in begrenztem Umfang darüber hinaus gesteigert werden. Optimistische Einschätzungen ergeben eine technisch realisierbare Obergrenze der PCE von 8 % bis 9 % [40]. Diese bleibt notwendigerweise hinter der physikalischen Obergrenze von ca. 12 % zurück [34].

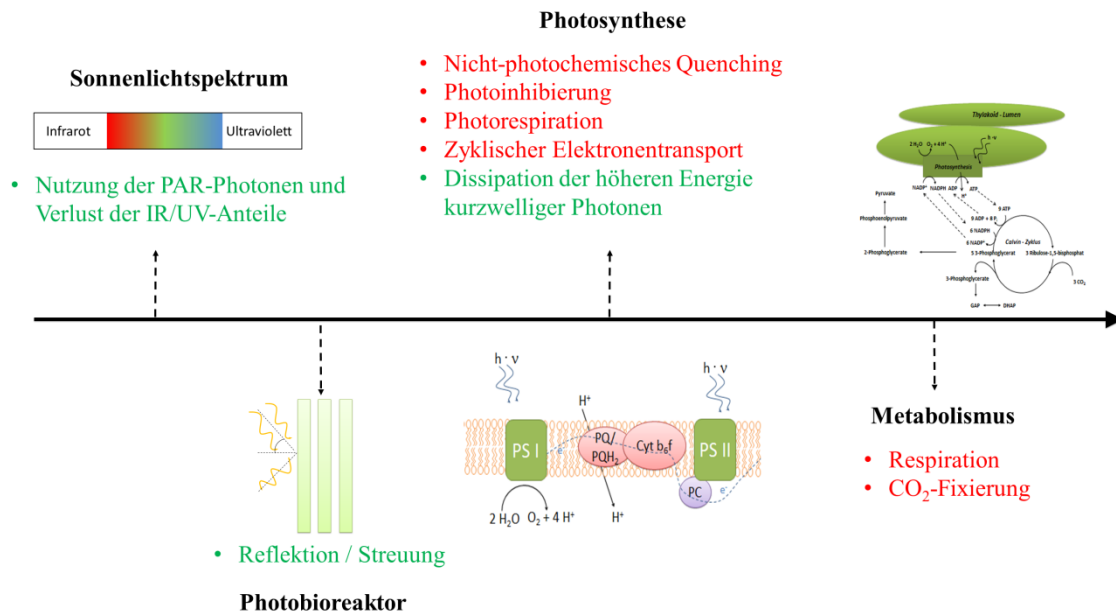


Abb. 2.3: Effizienzverluste bei der phototrophen Kultivierung. Die Verluste sind nach ihrem zeitlichem Auftreten von links nach rechts geordnet. Rein physikalische Ursachen der Verringerung des Wirkungsgrades sind grün dargestellt, während biochemisch kontrollierte Vorgänge rot markiert sind.

Als Kennzahl zur Beurteilung des Wirkungsgrades der Verwertung der Sonnenlichtenergie fasst die PCE demnach eine Reihe verschiedener Effekte zusammen und stellt nicht nur eine physiologische Obergrenze der Photosynthesekapazität der Zellen dar. Vielmehr fließt die Eignung des Kultivierungssystems zur Kultivierung der Mikroalgen in die Ausprägung der Kennzahl ein. Dennoch ist die Kennzahl als Optimierungskriterium geeignet und erlaubt den Vergleich verschiedener Prozessführungsstrategien im gleichen Kultivierungssystem oder den Vergleich der Eignung verschiedener Organismen bei gleichen Kultivierungsbedingungen.

2.1.5 Optimierung der Prozesseffizienz auf Basis der Reaktorentwicklung

Die Aufgabe des Photobioreaktors besteht im Wesentlichen darin optimale Bedingungen für das Wachstum der Mikroalgen aufrechtzuerhalten und das Auftreten von Gradienten zu vermeiden. Dennoch liegen Gradienten innerhalb des Reaktorsystems vor, die das Wachstum der einzelnen Zellen (bzw. deren spezifische Wachstumsrate μ) in der Zellsuspension beeinflussen (Abb. 2.4).

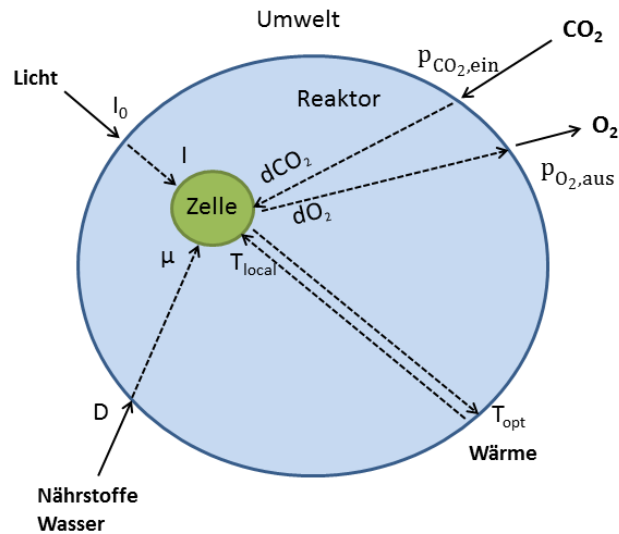


Abb. 2.4: Inhomogenität und Konzentrationsgradienten innerhalb des Photobioreaktors beeinflussen das Wachstum der Zellen. Licht, CO_2 und Nährstoffe werden für das phototrophe Wachstum benötigt, während aus der oxygenen Photosynthese freigesetztes O_2 sowie Wärme abgeführt werden müssen. I_0 (I): eingestrahlte (/lokale) Lichtintensität; $d\text{CO}_2$ ($d\text{O}_2$): gelöstes CO_2 (O_2); $p_{\text{CO}_2,\text{ein}}$ ($p_{\text{O}_2,\text{aus}}$) Partialdruck von CO_2 (O_2) im Zugsstrom (/Abgasstrom); T_{opt} (T_{local}): optimale (/lokale) Temperatur; D : Verdünnungsrate; μ : spezifische Wachstumsrate.

Dabei ist der Reaktor ein Dreiphasensystem, in dem neben der Flüssigphase des umgebenden Mediums mit der Biomasse selbst eine feste Phase vorliegt und außerdem in der Regel eine Gasphase zu finden ist. Die Dispersion der Gasphase in der Zellsuspension kann durch die Implementation von Membranen prinzipiell vermieden werden [43, 44], jedoch werden die meisten Reaktoren zurzeit mit Blasen begast. Mikroalgen müssen mit ausreichend CO_2 versorgt werden, um photosynthetisch Kohlenstoff fixieren zu können. Zugleich muss O_2 aus der Flüssigphase entfernt werden, da bei hohem Sauerstoffpartialdruck verstärkt Photorespiration auftritt [45] und hohe O_2 -Partialdrücke insbesondere in der Kombination mit hohen Lichtintensitäten zur oxidativen Zellschädigung beitragen [46, 47]. Zudem besteht eine Kopplung des pH mit der Konzentration des gelösten CO_2 , so dass beim Auftreten von CO_2 -Gradienten auch lokale Unterschiede des pH-Werts zu finden sind [48]. Neben Gradienten der gelösten Gase treten im Reaktor auch Temperaturgradienten auf, die durch geeignete Kühlsysteme minimiert werden müssen. Die anfallende Wärme, die insbesondere durch die Dissipation eines Teils der Lichtenergie erheblich sein kann, muss entsprechend aus dem System abtransportiert werden. Die hydrodynamischen Verhältnisse innerhalb des Reaktors müssen derart beschaffen sein, dass die genannten Gradienten minimiert werden und

innerhalb des Reaktors am Ort des Verbrauchs ausreichend Nährstoffe und CO₂ zur Verfügung stehen.

Werden durch ausreichenden Wärme- und Stofftransport günstige Bedingungen für das Wachstum der Zellen an jeder Stelle innerhalb der Suspension erzielt, so ist dennoch im Falle der phototrophen Kultivierung nicht gewährleistet, dass die Kulturen mit höchster Effizienz wachsen. Zu einer deutlichen Steigerung der Komplexität tragen die Lichtgradienten im Reaktor bei. Das Licht trifft auf die Reaktoroberfläche auf und wird durch die Zellen gestreut und absorbiert. Dadurch entstehen Lichtgradienten im Reaktor, die insbesondere durch die gegenseitige Abschattung der Algen bei höheren Biomassekonzentrationen verstärkt werden und wesentlichen Einfluss auf die Physiologie der Algen nehmen [35, 49, 50]. Die lokalen Unterschiede der Lichtintensität werden zudem von zeitlichen Änderungen der Intensität I_0 überlagert, die sich durch Tag-Nacht-Zyklen, Jahreszeiten und Änderungen der Wetterbedingungen ergeben.

In Bezug auf die Nutzung des eingestrahnten Lichts zeigen alle gängigen Reaktorausprägungen ähnliche Eigenschaften. Die Lichtweglänge ist durch eine geringe Reaktordicke begrenzt. Bei zu hoher Schichtdicke führt die exponentielle Abnahme der Lichtintensität bereits nach wenigen Zentimetern zur vollständigen Lichtabsorption und zur Ausprägung von dunklen Volumenelementen innerhalb des Reaktors [34, 49]. Nur bei unvollständiger Lichtabsorption kann exponentielles Wachstum erreicht werden. Bei einem steigenden Anteil unbeleuchteten Volumens hat dagegen der höhere Energieverbrauch durch Atmung negative Auswirkungen auf das Netto-Biomassewachstum. Demnach wird deutlich, dass die geometrische Ähnlichkeit beim Scale-up nicht beibehalten werden kann, sondern eine Dimension zumindest annähernd konstant gehalten werden muss.

Darüber hinaus muss durch das Reaktorsystem das Licht soweit verdünnt werden, dass sättigende Lichtintensitäten innerhalb der Kultur vermieden oder zumindest reduziert werden. Der optimale Arbeitspunkt ist in Abb. 2.2 am Punkt I_{sat} zu finden, also beim Übergang des lichtlimitierten Wachstums in den Sättigungsbereich. Bei höheren Lichtintensitäten wird nach den in Tabelle 2-1 aufgeführten Mechanismen Energie dissipiert und die PCE sinkt. Daher wird bei der Reaktorentwicklung ein hohes Verhältnis der transparenten Oberfläche zur Standfläche der Reaktoren angestrebt. Dadurch werden hohe Intensitätsspitzen des eingestrahnten Lichts „verdünnt“ und auf eine größere Oberfläche verteilt. Infolgedessen wird die Energiedissipation aufgrund von Sättigungseffekten und Photoinhibierung reduziert und die Prozesseffizienz verbessert.

Die Umsetzung dieser beiden Prinzipien führt dazu, dass alle Reaktoren große Oberfläche-zu-Flüssigvolumen-Verhältnisse aufweisen. Dies führt prinzipiell dazu, dass höhere Biomassekonzentrationen erreicht werden können. Die daraus abgeleiteten drei geometrischen Grundformen, welche auch Ausgangspunkt für die Entwicklung der meisten weiterführenden Reaktorkonzepte bildeten, sind ringförmige Blasensäulenreaktoren, Rohrreaktoren und Flachplattenreaktoren [51]. Tabelle 2-2 zeigt die Kennzahlen der geläufigen Reaktortypen anhand experimenteller und publizierter Ergebnisse.

Tabelle 2-2: Typische Reaktorgeometrien und deren Kennzahlen

Reaktortyp	Ringförmige Blasensäule	Rohrreaktor	Plattenreaktor
Reaktorvolumen [m ³]	0,12	7	6
Lichtweglänge [cm]	4,5	4	3
Beleuchtete Oberfläche [m ²]	5,3	600	500
Bodenfläche [m ²]	1,23	110	100
Oberfläche : Bodenfläche [-]	4,31	5,45	5,00
Oberfläche : Volumen [m ⁻¹]	44	86	83
Biomassekonzentration [g/l]	0,6-1,71	5-8	5-8
volumetrische Produktivität [g/(l·d)]	0,46	0,8-1,2	0,8-1,3
Referenz	[52, 53]	[47]	[47]

Die Optimierung der Lichtnutzung und Anpassung der Reaktoren an vorherrschende Lichtintensitäten ist die Hauptaufgabe der Reaktorentwicklung. Sie bestimmt im Wesentlichen die Prozesseffizienz. Darüber hinaus muss jedoch – wie zuvor erwähnt – auch ausreichender Massentransfer gewährleistet werden. Dies wird in der Regel durch Blasenbegasung erreicht (z. B. [54, 55]). Mit steigender Gasleerrohrgeschwindigkeit werden in der Regel höhere radiale Dispersionskoeffizienten erreicht, stärkere Turbulenzen induziert und damit der Massentransfer verbessert. [56, 57]. Interessant ist die Interaktion von Hydrodynamik und Zellphysiologie: Durch die radiale Durchmischung zirkulieren Zellen zwischen stärker und schwächer beleuchteten Volumenelementen innerhalb des Photobioreaktors. Die photosynthetische Bildung von ATP und NADPH erfolgt hauptsächlich in helleren Bereichen, die Fixierung von CO₂ dagegen auch in dunklen Volumenelementen,

solange genügend ATP und NADPH zur Verfügung stehen. Dadurch kann der Fall eintreten, dass der sonst kinetisch limitierende Schritt der CO₂-Fixierung nicht mehr geschwindigkeitsbestimmend ist und die Photosynthese bei sonst sättigenden Lichtintensitäten I_0 weiterhin mit höherer Effizienz abläuft. Die Signifikanz der Effizienzverbesserung ergibt sich durch experimentell nachgewiesene Produktivitätssteigerungen [58, 59]. Diese sind maximal sofern die Frequenzen der Bewegung durch helle und dunkle Volumenelemente mit der Durchsatzgeschwindigkeit von Elektronen im Photosystem II übereinstimmt (Kroon1994, MolinaGrima2000). Der Effekt wird als „flashing light effect“ oder „intermittend light effect“ bezeichnet [60]. Die Optimierung der radialen Durchmischung wurde als Scale-up Kriterium bereits in der Literatur vorgeschlagen [37] und sollte bereits im frühen Stadium der Entwicklung und Auslegung von Reaktoren berücksichtigt werden.

2.2 Das Potential der Biodieselproduktion mit Mikroalgen

2.2.1 Die Gewinnung erneuerbarer Energieträger aus Mikroalgen

Die energetische Nutzung von Mikroalgen kann auf verschiedene Arten erfolgen. Die derzeitige Forschung basiert vornehmend auf Konzepten zur Gewinnung von Biodiesel aus lipidreicher Algenbiomasse, der direkten Erzeugung molekularen Wasserstoffs oder der Methangewinnung durch anaeroben Abbau der Biomasse in Biogasanlagen [61-65].

Biodiesel besteht aus Monoalkylestern von pflanzlichen Ölen. Die Eigenschaften des Energieträgers sind ähnlich derjenigen von Dieselkraftstoff, welcher aus fossilen Quellen gewonnen wird. Biodiesel wird derzeit hauptsächlich aus Rapsöl (84 %) hergestellt. Weitere Rohmaterialien für die Gewinnung sind Sonnenblumenöl (13 %), Palmöl (1 %) und Sojabohnen (< 2 %) [66]. Anreize für die Gewinnung von Biodiesel aus nachwachsenden Rohstoffen sind die Verknappung fossiler Energieträger und die CO₂-Neutralität der Nutzung nachwachsender Rohstoffe [67]. Werden Kulturpflanzen, welche auch zur Nahrungsmittelproduktion dienen, zur Biodieselproduktion genutzt, so besteht eine direkte Konkurrenz zwischen beiden alternativen Verwendungszwecken. In der Folge ist das Produktionsvolumen von Nahrungsmitteln gefährdet oder die Preise für Grundnahrungsmittel steigen aufgrund der Ressourcenverknappung. Letztere ist durch die Begrenzung fruchtbarer Anbauflächen bedingt und nur marginal (und mit negativen ökologischen Folgen gekoppelt)

erweiterbar [66, 68, 69]. Daher fokussiert eine nachhaltige Entwicklung nachwachsender Rohstoffe für die Biodieselgewinnung auf Biomasse, die gewöhnlich nicht auf Ackerbauflächen kultiviert werden muss und nicht in direkter Konkurrenz mit der Lebensmittelproduktion steht. Die daraus gewonnenen Kraftstoffe werden als Biodiesel der zweiten Generation bezeichnet. Rohstoffe, welche die Kriterien erfüllen, sind etwa Lignocellulose-haltige Biomasse oder auch Mikroalgenbiomasse [61, 63, 69].

Das Potential der Kultivierung von Mikroalgen für die Biodieselgewinnung gründet – neben den in Kapitel 1.1 dargestellten Vorteilen – insbesondere auf dem hohen Lipidgehalt der Biomasse. Letzterer ist einer der wichtigsten Eignungskriterien der Biomasse als Rohstoff für diesen Verwendungszweck, denn er beeinflusst wesentlich die Produktionskosten [66]. Der Lipidgehalt kann in einigen Spezies sogar 80 % der Trockenmasse erreichen [34, 64]. Darüber hinaus wachsen Algen mit hoher volumetrischer Produktivität. Die PCE ist vergleichsweise hoch, da Algen im technischen Maßstab eine PCE zwischen 5 % und 9 % erreichen können [40, 51]. Terrestrische Pflanzen dagegen erreichen eine deutlich geringere Konversionseffizienz, die zwischen 0,1 % und 2 % liegt [70, 71]. Dabei wurden hohe PCE-Werte von bis zu 2 % lediglich mit C₄-Pflanzen, etwa mit dem Riesen-Chinaschilf *Miscanthus giganteus*, erreicht [71]. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die PCE während der Lipidakkumulation von Mikroalgen erwartungsgemäß geringer ist als die maximal zu erwartenden Werte, wenn man unlimitierten bzw. lichtlimitierten Metabolismus zugrunde legt [72]. Zu Beginn dieser Arbeit war diese Vermutung jedoch nicht experimentell bestätigt und bildete eine zentrale Fragestellung, die im Rahmen der Untersuchungen betrachtet wurde. Sie besitzt hohe Relevanz für die Beurteilung der ökonomischen und ökologischen Sinnhaftigkeit der Biodieselproduktion mit Mikroalgen.

Neben einem hohen Lipidgehalt und hoher volumetrischer Produktivität bzw. PCE spielt auch die Biodieselqualität eine entscheidende Rolle bei der Auswahl eines geeigneten Rohstoffes. Die Biodieselqualität ist im Wesentlichen von der Fettsäurezusammensetzung der Lipide abhängig, im Speziellen von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der Fettsäuren. Diese Eigenschaften bestimmen die Oxidationsempfindlichkeit, Fließ-, Zünd- und Verbrennungseigenschaften. Die zugehörigen Kennzahlen, die Iodzahl, die Cetanzahl, der CFPP-Wert (cold filter plugging point) und weitere Qualitätskriterien müssen den in der europäischen Norm EN 14214 festgelegten Mindestanforderungen entsprechen. Für eine weiterführende Darstellung siehe [73, 74]. Grundsätzlich ist nach Brennan die Lipidzusammensetzung von Algen für die Biodieselherstellung geeignet [67]. Ein hoher

Anteil langkettiger, ungesättigter Fettsäuren, wie er in Algenbiomasse oft zu finden ist, ist jedoch wegen der leichten Oxidierbarkeit als nachteilig zu sehen. Diese kann allerdings durch katalytische Hydrogenierung der Fettsäuren in einem weiteren Prozessschritt vermindert werden [69]. Zudem ändert sich die Fettsäurezusammensetzung während des Kultivierungsverlaufes, wobei durch eine gezielte Prozessentwicklung in beschränktem Umfang Einfluss auf das Fettsäureprofil zum Erntezeitpunkt genommen werden kann [75]. Die Verteilung und die Kettenlängen der Fettsäuren sowie deren Sättigungsgrad müssen bereits bei der Auswahl der Mikroorganismen berücksichtigt werden um Biodiesel mit hoher Qualität produzieren zu können.

2.2.2 Die Induktion der Lipidsynthese

Die Lipide der Mikroalgen stellen eine heterogene Gruppe von Makromolekülen dar [76, 77]. Einerseits unterscheiden sich die Moleküle in Bezug auf die Kettenlänge der Fettsäuren, den Sättigungsgrad und die Positionen der Doppelbindungen. Darüber hinaus können Fettsäuren mit der gleichen Summenformel und Position der Doppelbindungen als Konfigurationsisomere vorliegen. Aus dieser Vielfältigkeit ergibt sich die große Heterogenität dieser Molekülklasse. Außerdem können verschiedene Fettsäuren an unterschiedlichen Positionen des Glycerin-Grundgerüsts angeordnet sein. Die Lipide unterscheiden sich ferner hinsichtlich der Anzahl der Fettsäuren und in Bezug auf gegebenenfalls vorhandene polare Kopfgruppen. Vor dem Hintergrund der Biodieselproduktion können vor allem polare Lipide und neutrale Lipide unterschieden werden [76]. Zur ersten Gruppe gehören vor allem die für die Struktur und Funktionalität relevanten Membranlipide. Neutrale Lipide, insbesondere Triacylglyceride (TAGs), werden dagegen vor allem als Speicherstoffe angereichert und sind aufgrund ihrer günstigen Eigenschaften als Rohstoff für die Biodieselgewinnung von Interesse.

Einige Mikroalgen spezialisiertes akkumulieren TAGs als Speicherstoffe. Verantwortlich für die Induktion dieser Synthesewege können verschiedene stressinduzierende Bedingungen (z. B. osmotischer Druck und Temperatur) sein [78]. Als effizienteste Methode zur Induktion der Speicherlipidsynthese wurde dagegen in der Literatur die Limitierung gewisser Nährstoffe genannt. Insbesondere wenn eines der beiden Elemente Stickstoff oder Phosphor nicht zur Verfügung steht, konnten experimentell hohe Anteile von TAGs in der Biomasse erreicht werden (z. B. [79-84]). Unter diesen Bedingungen kann keine weitere Netto-Synthese

bestimmter Moleküle stattfinden. Ist beispielsweise die Stickstoffquelle des Kulturmediums aufgebraucht, so kann keine weitere Akkumulation von Aminosäuren, Proteinen und Nukleinsäuren stattfinden. Daher stoppt die Zellteilung bald nach Eintritt in die limitierte Wachstumsphase und in der Folge findet lediglich eine Akkumulation stickstofffreier Speichermoleküle statt [85].

Die Biosynthese von Fettsäuren findet in Algen hauptsächlich in Chloroplasten statt [84]. Diese werden anschließend vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum weiter prozessiert und an das Grundgerüst aus 3-Phosphoglycerat angeheftet, um so in einer Reihe enzymatischer Schritte polare Lipide oder Speicherlipide (TAGs) zu synthetisieren (Abb. 2.5). Am Anfang der Lipidsynthese steht Acetyl-CoA, das einerseits aus der Glykolyse in den Chloroplasten oder im Cytoplasma gewonnen werden kann. Andererseits (wie in Abb. 2.5 gezeigt) kann es auch direkt nach der enzymatischen Umwandlung von 3-Phosphoglycerat über wenige Zwischenprodukte aus dem Calvin-Benson-Zyklus bereitgestellt werden [76]. Der erste durch das Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase katalysierte Schritt führt zur Addition von CO₂, das als Hydrogencarbonat im Chloroplasten vorliegt, an Acetyl-CoA. Dieser Schritt gilt als irreversibel [86, 87]. Der Malonyl-Rest des Produkts Malonyl-CoA wird anschließend auf das Acyl-carrier-protein (ACP) übertragen von dem ausgehend die Kettenverlängerung startet. In einer ersten Kondensationsreaktion wird ein Intermediat mit einer Kettenlänge von vier Kohlenstoffatomen synthetisiert, das durch die Kondensationsreaktionen mit Acetyl-CoA um jeweils zwei Kohlenstoffatome verlängert wird [88]. Doppelbindungen werden durch die Aktivität von Desaturasen an verschiedenen Stellen der Fettsäuren eingeführt [76].

Die Regulation der Lipidsynthese ist komplex und erfolgt über die Regulation der Aktivität der beteiligten Enzyme. Insbesondere die Abspaltung von ACP, die grundsätzlich bei verschiedenen Kettenlängen und Sättigungsgraden erfolgen kann, bildet einen zentralen Regulationsmechanismus der Fettsäuresynthese, da sie die Fettsäuresynthese beendet und damit die Fettsäurezusammensetzung des Organismus bestimmt [84]. Bei der Abspaltung des ACP findet die Übertragung des Acyl-Rests auf ein Glycerin-Grundgerüst im Chloroplasten statt [89] oder es entsteht eine freie Fettsäure, die ins endoplasmatische Retikulum transportiert wird und dort eine kovalente Bindung mit 3-Phosphoglycerat eingeht. Zwei weitere Fettsäuren werden in der anschließenden Reaktionsfolge an das Glycerin-Grundgerüst angeheftet und es entsteht TAG. Die Lipidtröpfchen, welche die Lipidspeicher der Zellen darstellen, schnüren sich am endoplasmatischen Retikulum ab und liegen dann frei im Cytosol

vor. Die Zwischenprodukte Phosphatidsäure und Diacylglycerin können allerdings auch genutzt werden, um Membranlipide, z. B. Phospholipide, zu bilden [76, 84, 87].

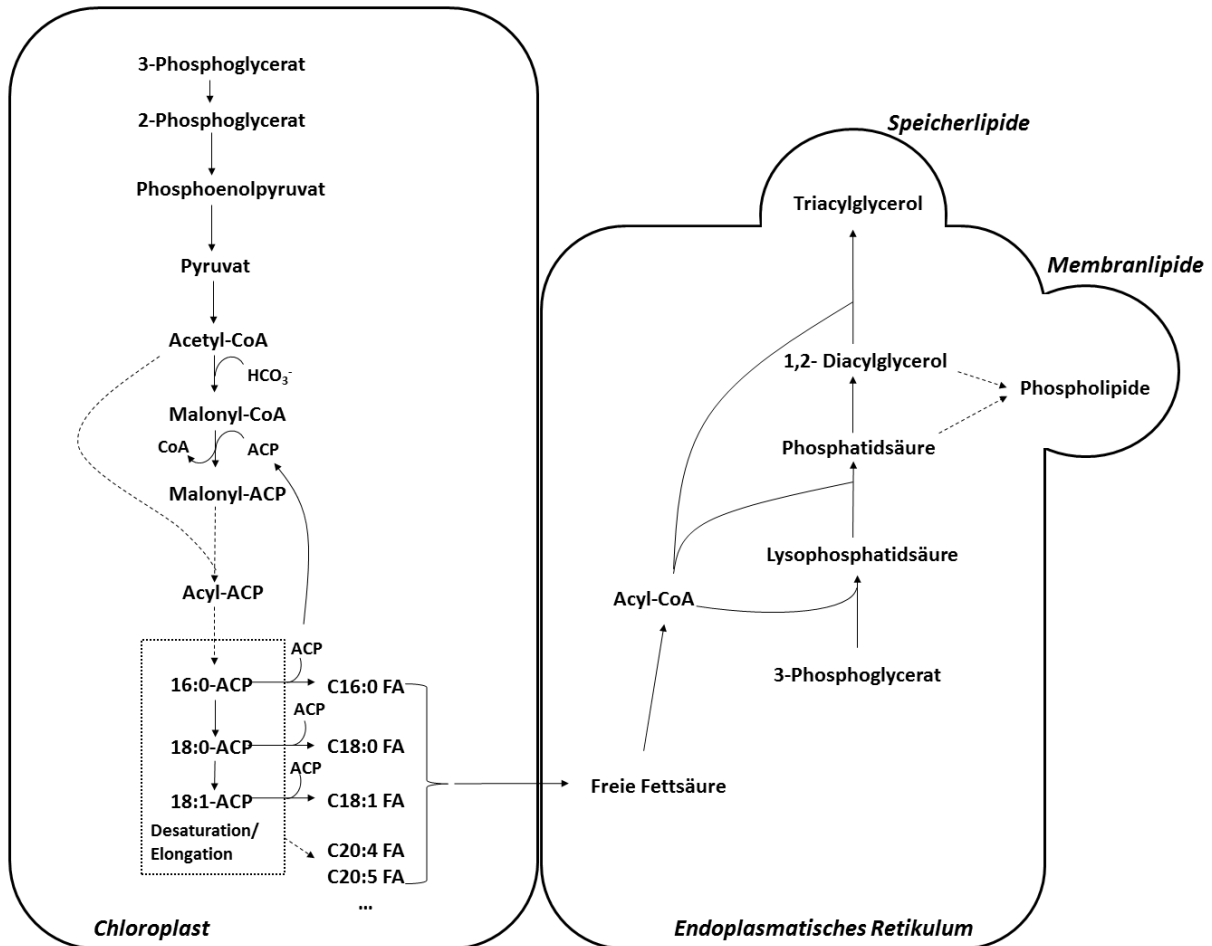


Abb. 2.5: Lipidbiosynthese im Metabolismus von Mikroalgen. CoA: Coenzym A; ACP: Acyl-carrier-protein; FA: Fettsäure (fatty acid).

2.2.3 Prozessstufen der Biodieselproduktion

Eine typische Darstellung der Wertschöpfungskette der Biodieselproduktion ist in Abb. 2.6 dargestellt. Zunächst müssen die Algen kultiviert werden. In Bezug auf das Kultivierungssystem wird in der Regel die Unterscheidung zwischen Open Ponds und geschlossenen Photobioreaktoren getroffen. Die Kultivierung in Open Pond bzw. Raceway Pond Systemen ist dabei die instrumentell einfachere Variante. Die Becken sind offen, was infolge der Verdunstung einen hohen Wasserbedarf bedingt, und werden meist mit einem Schaufelrad durchmischt. Meist werden die Becken nicht begast, so dass CO₂ ausschließlich

aus atmosphärischer Quelle mit dem geringen Partialdruck von ca. 0,04 kPa genutzt werden kann. Zudem ist die Lichtweglänge aufgrund der Bauweise deutlich länger als bei den meisten geschlossenen Reaktorsystemen, so dass bereits bei geringen Biomassekonzentration dunkle, lichtlimitierte Volumenelemente in der Zellsuspension zu finden sind. Vorteilhaft ist, dass die Investitionskosten und Betriebskosten vergleichsweise gering sind. Die Kultivierung in geschlossenen Reaktoren ist auf der anderen Seite mit höherem technischem und energetischem Aufwand verbunden. Allerdings können deutlich höhere Biomassekonzentrationen erreicht werden und der Wasserverlust durch Evaporation ist minimiert. Darüber hinaus bietet sich die Möglichkeit axenisch zu kultivieren und weitere Prozessparameter, etwa die Temperatur und den pH-Wert, beim Optimum der Mikroalgen zu regeln [61, 90-92].

Für die Biodieselproduktion ist es notwendig, dass eine Prozessführungsstrategie verfolgt wird, welche die Induktion der Lipidbildung beinhaltet. Meist wird dabei auf eine Limitierung der Stickstoffquelle im Nährmedium abgezielt. Eine zeitliche oder örtliche Trennung von Biomassewachstum und Lipidakkumulation kann etwa durch Satzkultivierung mit gezielter Stickstofflimitierung oder durch mehrstufige Kultivierung in abgetrennten Reaktormodulen erfolgen.

Die Art des Kultivierungssystems und die erreichten Biomassekonzentrationen bestimmen wesentlich den nächsten Prozessschritt. Nach der Kultivierung muss die Biomasse vom Kulturmedium abgetrennt werden. In Open Pond Kultivierungssystemen liegt die Biotrockenmassekonzentration in der Größenordnung von maximal 0,1 % (w/w) [74, 93]. Daher bietet es sich an durch Zugabe chemischer Agenzien oder Änderungen physikalischer Parameter Flotation oder Flokkulation zu induzieren und damit das Abtrennen an der Oberfläche oder die Sedimentation von Zellaggregaten zu erleichtern [94-98]. Bei der Kultivierung in geschlossenen Reaktorsystemen ist dagegen eine zehnfach höhere Biomassekonzentration technisch erreichbar, so dass auch trotz des höheren Energieeinsatzes das Zentrifugieren als Fest-Flüssig-Trennmethode in Frage kommt. Dennoch muss der Einsatz von Zentrifugen kritisch hinterfragt werden, da der Energieeinsatz zwischen 4 MJ/m³ und 14 MJ/m³ beträgt [74, 99]. Die energetisch günstigere Alternative ist die Filtration. Wegen der Kompressibilität der Biomasse ist die Kuchenfiltration ungeeignet zur Abtrennung der Biomasse. Dagegen wird bei der Querstromfiltration das Fouling der Filter durch tangentielle Scherkräfte verhindert, so dass diese Methode mit einem Energiebedarf von ca. 0,7 MJ/m³ energetische Vorteile gegenüber dem Zentrifugieren birgt [76, 100].

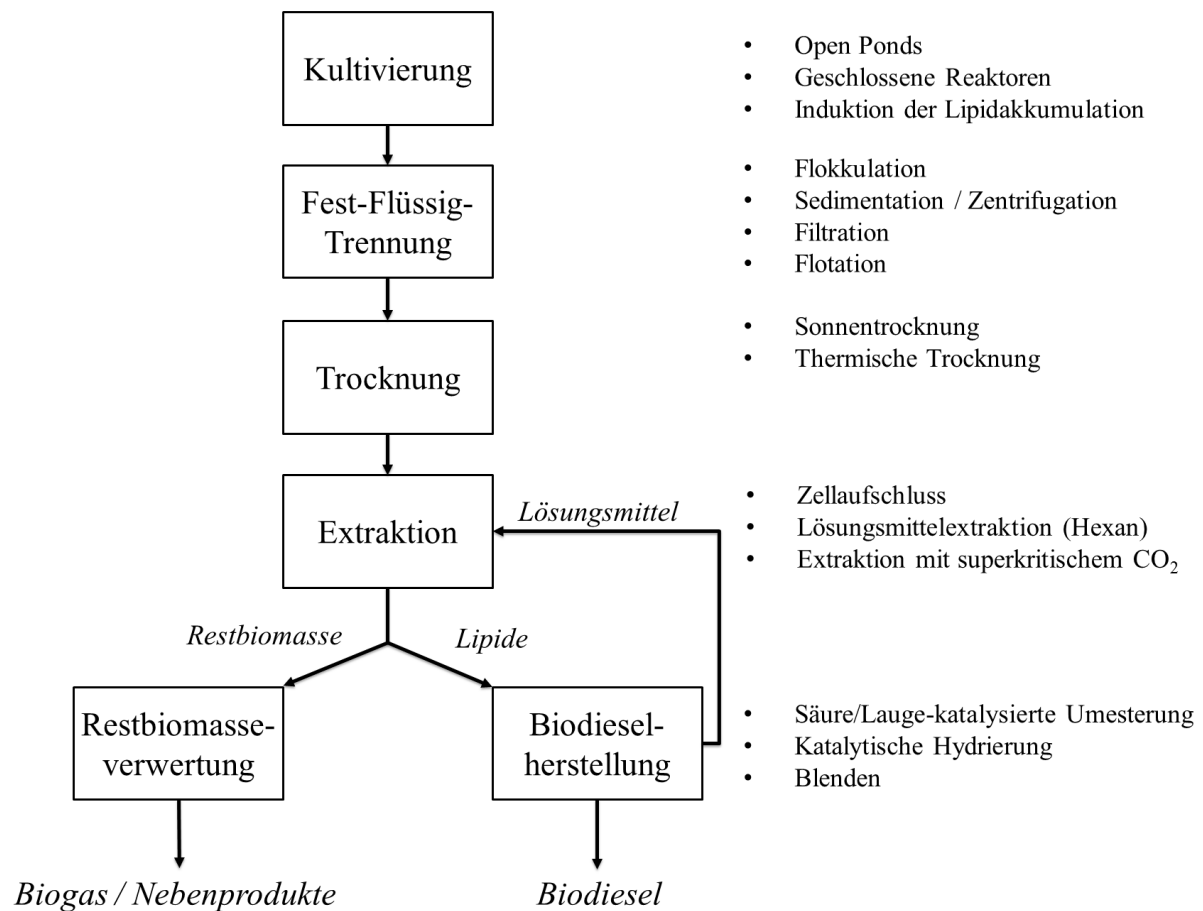


Abb. 2.6: Wertschöpfungskette und technische/apparative Umsetzung der verschiedenen Prozessstufen der Biodieselproduktion.

Je nach den Prozessbedingungen in den folgenden Stufen ist es gegebenenfalls erforderlich die Biomasse vor der Extraktion und Umesterung zu trocknen [101]. Bei der Hexan-Extraktion ist beispielsweise eine Restfeuchte von 9 % anzustreben [101, 102]. Die Trocknung kann ohne zusätzlichen Energieeintrag durch Nutzung der Sonnenenergie erfolgen. Diese Methode wird bereits bei der kommerziellen Produktion von Algenbiomasse für den Nahrungs- und Futtermittelsektor in asiatischen Ländern angewandt [103], jedoch wäre der große Flächenbedarf und die Wetterabhängigkeit für die Herstellung von Biodiesel mit den größeren Produktionsvolumina kritisch zu sehen [101]. Alternative mechanische und thermische Trocknungsmethoden erfordern weiteren Energieeintrag, der insbesondere bei der thermischen Trocknung einen signifikanten Anteil der in der Biomasse gespeicherten Energie betragen kann [101].

Die Extraktion der Lipide erfolgt in der Regel mit organischen Lösungsmitteln, wie beispielsweise n-Hexan. Experimentell werden derzeit Untersuchungen mit alternativen

Verfahren, wie der Extraktion mit superkritischem CO₂ durchgeführt. Dadurch sollen toxische Lösungsmittel im Prozess vermieden werden. Die energetische Bewertung der Methode bei der Anwendung im technischen Maßstab steht allerdings noch aus [104, 105]. Gegebenenfalls kann ein zusätzlicher Zellaufschluss die Extraktionseffizienz verbessern. Dabei muss der zusätzliche energetische und apparative Aufwand gegenüber den Vorteilen abgewogen werden [104, 106].

Die extrahierten Lipide werden anschließend im sauren oder basischen Milieu umgeestert. Dabei reagiert 1 mol der TAG mit 3 mol Methanol. Es entstehen 3 mol Fettsäuremethylester und 1 mol Glycerin. Die Umsetzung unter Anwesenheit des alkalischen Katalysators bietet den Vorteil, dass die Reaktionen bei geringeren Temperaturen (60 °C) und Atmosphärendruck wesentlich schneller als bei saurer Katalyse ablaufen [61, 107]. Dagegen führt die Anwesenheit von Restwasser oder von freien Fettsäuren in Verseifungsreaktionen zum Verbrauch des Katalysators und zu ungewünschten Nebenprodukten, welche die anschließende Phasentrennung hindern [76, 93, 108]. Auch die Anwendung heterogener Katalysatoren ist prinzipiell möglich und kann zu einer weiteren Kostenersparnis beitragen. Außerdem kann die Prozesssicherheit durch Verzicht auf Lauge und Säure verbessert werden [74, 76, 109, 110].

Genügt die Qualität der gewonnenen Fettsäuremethylester nicht den Anforderungen zur Produktion von Biodiesel, so kann diese durch Blenden mit Diesel, der aus anderen Rohmaterialien gewonnen wurde, oder durch katalytische Hydrierung verbessert werden. Dies kann gegebenenfalls erforderlich sein, da die Anforderungen gemäß den anzuwendenden Bestimmungen (z. B. EN 14214) erfüllt werden müssen [61, 69, 111-113].

Die Restbiomasse kann nach der Extraktion der Lipide etwa durch anaerobe Vergärung in einer Biogasanlage verwertet werden um Methan zu produzieren und trägt damit zur Verbesserung der Energiebilanz des Gesamtprozesses bei [61, 67, 74].

2.2.4 Prozesseffizienz und Wirtschaftlichkeit der Biodieselgewinnung mit Mikroalgen

Die energetische und ökonomische Beurteilung von Prozessen zur Biodieselgewinnung ist problematisch, da keine ausreichenden Daten aus Produktionsanlagen oder größeren Pilotanlagen zur Verfügung stehen [67, 92]. Damit basieren die Literaturdaten hauptsächlich auf Extrapolation und Projektionen der im kleineren Maßstab gewonnenen experimentellen

Daten hinsichtlich der volumetrischen Produktivität der Mikroalgenkultivierung. Zudem greifen vergleichende Studien häufig auf Analogien zu etablierten Technologien zurück.

Auf der Grundlage von volumetrischen Produktivitäten berechnete Szenarien weichen in den Angaben zu den im technischen Maßstab realisierbaren flächenbezogenen jährlichen Produktionsvolumina deutlich voneinander ab. Beispielsweise finden sich Werte für die flächenbezogene Produktivität von Photobioprosessen von mehr als 100 t/(ha·a) [78] und teilweise wurden sogar Projektionen veröffentlicht, welche von einer Produktivität von mehr als 200 t/(ha·a) ausgehen. Diese Werte sind in der Praxis auch bei wesentlichen technologischen Verbesserungen nicht zu erreichen [34]. Die kurzzeitig erreichten Produktivitäten von 30 g/(m²·d) bzw. 110 t/(ha·a) konnten nicht über längere Zeiträume experimentell im Outdoor-Betrieb aufrechterhalten werden. Stattdessen wurden im längeren Zeitraum Werte von 15 g/(m²·d) bis 25 g/(m²·d), also - auf eine größere Anlage projiziert - von 55 t/(ha·a) bis 91 t/(ha·a) erreicht [34]. Bessere Ansätze zur Beurteilung der Produktionskapazität von Anlagen gingen von der eingestrahnten solaren Energieleistung aus und berechneten anhand der PCE die im betrachteten Zeitintervall erzielbare Biomasse [72, 74, 114]. Dabei wurden unterschiedliche PCE-Werte für die verschiedenen Reaktorsysteme angenommen, wobei diejenige bei der Kultivierung in Open Ponds bzw. Raceway Ponds mit 1,5 % niedriger angesetzt wurden als in geschlossenen Reaktorsystemen mit 3 % bis 5 % [74, 114]. Da zum Zeitpunkt der Ausarbeitung der Studien und zu Beginn dieser Arbeit keine Daten zur PCE während der Lipidbildung vorlagen, wurde angenommen, dass diese geringer ist als die PCE bei nicht-nährstofflimitiertem Wachstum. Wijffels schätzte die PCE mit 3 % ein und berechnete darauf basierend einen Flächenbedarf von 92500 km² zur Produktion des jährlichen Treibstoffbedarfs von 4·10¹¹ m³ in Europa [72].

Sollte die Produktion von Biodiesel auf Basis von Algenbiomasse im technischen Maßstab kommerzialisiert werden, so muss die Produktion der Biomasse konkurrenzfähig sein. Daher müssen die Produktionskosten minimiert werden, so dass der Preis für Biodiesel mit demjenigen von anderen Energieträgern vergleichbar ist. Die Angaben zu Herstellungskosten und Preisen von Biomasse variieren sehr stark. Die niedrigsten aufgeführten Preise betragen weniger als 0,5 €/kg [69, 115]. Maximale Werte reichen bis zu 50 €/l für die Herstellung von Biodiesel auf der Basis von Algenbiomasse [93]. Derzeitige Marktpreise für Algen-Biodiesel sind nicht verfügbar, da noch keine Produktion im technischen Maßstab durchgeführt wurde. Norsker et al. führten eine Kostenanalyse unter Berücksichtigung des notwendigen Einsatzes

von Hilfsenergie, sonstiger Betriebskosten und Investitions- bzw. Kapitalkosten durch und ermittelte Produktionskosten von 4,15 € für die Bereitstellung von 1 kg Biotrockenmasse [114]. Derzeitig ist die Produktion von Algenbiodiesel noch nicht rentabel. Sie würde stark von Regierungssubventionen und der zukünftigen Rohölpreisentwicklung abhängen [116]. Hingegen wird Algenbiomasse für andere Märkte produziert und erzielt einen Marktpreis von 36 €/kg im Ernährungsbereich. Hochpreisige aus Algen gewonnene Produkte erzielen deutlich höhere Preise von bis zu 7150 €/kg (Daten aus 2008) für das Karotinoid Astaxanthin [67, 117].

Betrachtet man die Energiebilanz des gesamten Prozesses zur Herstellung von Biodiesel unter Berücksichtigung der Produktion und dem Ernten der Biomasse, der Extraktion und Umesterung der Lipide und Verwertung der Restbiomasse zur Biogaserzeugung, so zeigen vorsichtige Schätzungen für den Basisfall unter Berücksichtigung des derzeitigen Standes der Technik, dass die Bilanz zunächst positiv ist. Circa 70 % bis 77 % der Verbrennungsenthalpie des Biodiesels müssten allerdings zu dessen Erzeugung aufgewendet werden. Berücksichtigt man dagegen, dass der Diesel in Motoren mit begrenztem Wirkungsgrad verbrannt wird, so würde weniger Energie bei der Verbrennung genutzt als für dessen Erzeugung aufgewendet wird. Auch die CO₂-Bilanz zeigt in diesem Fall einen Netto-Ausstoß von CO₂ in die Atmosphäre [74]. Auf dieser Grundlage muss die Prozesseffizienz und Kosteneffizienz der Biodieselherstellung weiterentwickelt werden. Norsker identifizierte die kritischen Kostenfaktoren in verschiedenen Reaktorsystemen. Bei Kultivierungen in Ponds verursachen wegen der geringen Biomassekonzentration insbesondere das Ernten, in Rohrreaktoren das Pumpen und in Flachplattenreaktoren die Begasung, hohe Kosten [114]. Die hohen Kosten resultieren dabei aus dem hohen Verbrauch von Hilfsenergie. Die Optimierung der Verfahren muss an diesen Stellen ansetzen, um darüber zu einer positiven Energiebilanz zu gelangen und gleichzeitig in Bezug auf den Preis konkurrenzfähig zu werden. Letztlich muss vor der technischen Produktion von Biodiesel aus Algen eine Weiterentwicklung des gesamten Prozesses auf allen Prozessstufen erfolgen (Tabelle 2-3).

Bereits bei der Selektion geeigneter Stämme genügt es nicht, ausschließlich die Wachstumsraten und volumetrischen Produktivitäten zu beachten, sondern es muss auch sichergestellt sein, dass die Organismen an die vorherrschenden Prozessbedingungen (Temperatur, Lichtintensität) angepasst sind. Ferner muss im Hinblick auf die Verwertung bereits bei der Stammselektion ein Organismus mit günstiger Fettsäurezusammensetzung für

die Biodieselherstellung gewählt werden, der auch die Nutzung höherwertiger Nebenprodukte erlaubt [74, 92].

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit die metabolischen Synthesewege durch genetische Modifikation um weitere enzymatische Schritte zu ergänzen. Dadurch kann möglicherweise die Effizienz der Synthese von Speicherlipiden verbessert werden oder es können modifizierte Nebenprodukte erhalten werden [91, 92]. Durch DNA-Rekombinationstechnik oder Mutagenese und Selektion können außerdem die Lichtabsorptionseigenschaften der Zellen verändert werden, was fundamentale Änderungen der Lichtverteilung im Reaktor bewirken kann [118].

Auf der Stufe der Prozessentwicklung können über die in Kapitel 2.1.5 ausgeführten Punkte zur Prozessoptimierung hinaus weitere Einsparungen von Hilfsenergie erzielt werden, in dem Reaktoren mit geringer Höhe entwickelt werden. Infolge dieses „low-ceiling“-Konzepts ist der hydrostatische Druck reduziert und der Druckabfall über die Reaktorhöhe deutlich vermindert. Dementsprechend kann der energetische Aufwand der Blasenbegasung minimiert werden. Zudem ist es sinnvoll die Begasungsrate zu minimieren und im Extremfall durch Regelung an die photosynthetische Aktivität anzupassen [119]. Ein gänzlicher Verzicht auf Blasenbegasung ist außerdem durch Membranbegasung möglich. Hierbei bestimmt die Membranoberfläche die Austauschfläche zwischen der Gas- und Flüssigphase und nicht weiter die Oberfläche der Blasen. Auf die Erzeugung von Gasblasen kann verzichtet und dadurch der Verlust der Energie bei Blasenplatzen an der Oberfläche vermieden werden [43, 44].

Darüber hinaus können im Zuge der Reaktorentwicklung Lichtkollektoren implementiert und dadurch die Lichtabsorption vom Reaktionskompartiment entkoppelt werden [120]. Damit kann etwa die Temperatur in der Suspension besser kontrolliert werden und die Reaktoren sind nicht mehr den Wetterbedingungen ausgesetzt. Im Bereich der Lichtabsorption wäre es außerdem vorteilhaft, den Infrarot (IR)-Anteil vor Auftreffen auf die Reaktoroberfläche zu eliminieren (durch Filter oder Reflektion [121-123]) um die erforderliche Kühlleistung zu minimieren. Möglicherweise kann künftig die Energie des IR-Anteils nach entsprechender Umwandlung zum Betreiben der Reaktoren genutzt werden.

Im Bereich der Produktaufarbeitung erfordert die Ernte der Biomasse einen Großteil der in den gesamten Prozess eingesetzten Energie. Dementsprechend besteht hier ein wesentliches Verbesserungspotential. Wie in Abschnitt 2.2.3 dargestellt, ist die Querstromfiltration in der Regel dem Zentrifugieren vorzuziehen. Aber auch die Flokkulation, die Flotation und weitere

Erntesysteme, wie z. B. das Ernten der Biomasse mit magnetisierbaren Partikeln, werden im Hinblick auf ihr Einsparpotential untersucht [124-126]. In der weiteren Verarbeitung der Biomasse ist neben alternativen Extraktionsverfahren und heterogener Katalyse (siehe Abschnitt 2.2.3) die direkte in situ Hydrolyse und Umesterung von Lipiden ein vielversprechender Ansatz. Bei hohen Temperaturen von ca. 250 °C werden die in der Biomasse vorliegenden Lipide hydrolysiert. Nach anschließender Filtration wird das Retentat unter superkritischen Bedingungen mit Ethanol verestert. Das Filtrat kann ebenfalls genutzt werden, um Phosphor und Stickstoff zurückzugewinnen [127]. Neben dem Verzicht auf toxische Lösungsmittel wäre bei diesem Verfahren vorteilhaft, dass die Biomasse nicht getrocknet werden muss und somit eine signifikante Energieeinsparung erreicht würde.

Tabelle 2-3: Optimierung der Rentabilität und Energiebilanz der Biodieselerzeugung

Prozessstufe	Zielsetzung	Technologie / Lösungsansatz
Upstream	<ul style="list-style-type: none"> • Biodieseleigenschaften • verwertbare Nebenprodukte • hoher Lipidanteil • günstige Lichtabsorptionseigenschaften 	<ul style="list-style-type: none"> • Stammselektion • genetische Modifikation
Kultivierung	<ul style="list-style-type: none"> • hoher Wirkungsgrad • geringer Einsatz von Hilfsenergie 	<ul style="list-style-type: none"> • geringe Reaktorhöhe • Nutzung des IR-Anteils • Kollektoren • Membranbegasung
Downstream / Biodiesel-Synthese	<ul style="list-style-type: none"> • effiziente Fest-Flüssig-Trennung • Vermeiden toxischer Extraktionsmittel 	<ul style="list-style-type: none"> • Filtration, Flokkulation, Flotation • superkritisches CO₂ • heterogene Katalyse • in situ Lipidhydrolyse und Umesterung
Verwertung	<ul style="list-style-type: none"> • günstige Biodieseleigenschaften • Rentabilität • Bioraffinerie-Konzept 	<ul style="list-style-type: none"> • Blenden • Verwertung von Nebenprodukten und Reststoffströmen • Abwasser-Aufbereitung • CO₂-Sequestrierung

Ähnliche Ansätze, welche den Trocknungsschritt vermeiden sollen, zielen auf enzymatische Vorbehandlung mit Lipasen oder die katalytische Umesterung im sauren Milieu ab, wo ein

höherer Wasseranteil des Substrats (und ein höherer Anteil freier Fettsäuren) weniger störenden Einfluss nimmt als bei der alkalischen Katalyse [93, 128].

Die Wirtschaftlichkeit der Prozesse kann wesentlich verbessert werden, indem Nebenproduktströme und Reststoffe genutzt werden. Im Zuge des Bioraffinerie-Konzepts soll die gesamte Biomasse verwertet werden. Neben der Lipidfraktion, welche zur Biodiesel-Gewinnung extrahiert wird, kommt die proteinreiche Restbiomasse zur Verwertung als Futtermittel in Frage. Die verbleibenden Anteile sollten der anaeroben Gärung zugeführt werden um Methan zu gewinnen [61, 113]. Zusätzliche Wertschöpfung kann dadurch erreicht werden, dass im Zuge der Kultivierung Abwasser geklärt wird, etwa um die Nitratbelastung zu reduzieren [93]. Die Kosten für die Rohstoffe und Hilfsstoffe bei der Kultivierung können durch Nutzung von CO₂-haltigen Abgasen von Kraftwerken und Industrieanlagen gesenkt werden. Außerdem kann Frischwasser bei der Kultivierung von marinen Algen durch Salzwasser bzw. Meerwasser ersetzt werden [113].

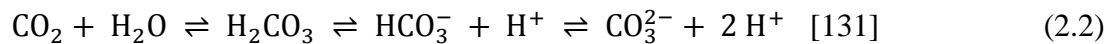
Die Nutzung von hochpreisigen Nebenprodukten, wie beispielsweise von Pigmenten (Astaxanthin oder anderen Karotinoiden), Antioxidantien oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren als Nahrungsmittelzusatz [129], bietet sich in der frühen Phase der Markteinführung an. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass die großen Produktionsvolumina von Biodiesel einen Preisverfall von Hochwertprodukten nach sich ziehen würden. Dementsprechend muss auf die Mengengerüste der Produktion und die Abstimmung auf das an den Märkten nachgefragte Volumen geachtet werden. Vor diesem Hintergrund wäre eine Option, chemische Grundstoffe aus der Algenbiomasse zu gewinnen und diese dann als Rohstoffe für die Synthese von Kunststoffen zu nutzen [130].

2.3 Die Versorgung phototropher Prozesse mit CO₂ und Regelungskonzepte

2.3.1 CO₂ als Substrat in der phototrophen Kultivierung

Die Biomasse von Mikroalgen besteht zu etwa 50 % aus Kohlenstoff. Dieser wird hauptsächlich durch die Fixierung von CO₂ im Calvin-Benson-Zyklus gewonnen. Zudem wird Kohlenstoff aber auch beispielsweise bei der Lipidsynthese durch die Verknüpfung von Hydrogencarbonat mit Acetyl-CoA fixiert. Über die Massenbilanz ergibt sich rechnerisch für die Bildung von 1 kg Biotrockenmasse ein Verbrauch von 1,8 kg CO₂. Bei höherem

Lipidanteil der Biomasse kann dieser Wert allerdings noch überschritten werden [74]. In der Rektionstechnik kann CO_2 als Substrat für die Synthese der Biomasse angesehen werden. Üblicherweise wird es kontinuierlich über die Gasphase in den Reaktor eingebracht. Allerdings kann die C-Quelle auch durch die Zugabe von Hydrogencarbonat oder Carbonat supplementiert werden. Da Hydrogencarbonate und Carbonate jedoch über die Reaktionen



im Gleichgewicht stehen und über Kohlensäure unter Wasserabspaltung auch zu freiem CO_2 reagieren können, gast CO_2 zu einem gewissen Teil auch wieder aus, bevor es durch die phototrophen Organismen aufgenommen werden kann. Letztendlich wird sich ein Gleichgewicht zwischen dem Verbrauch durch die Algen und dem Massentransfer aus der Gasphase einstellen.

Der Anteil des gelösten CO_2 am gesamten anorganischen Kohlenstoff ist stark abhängig vom pH-Wert der Lösung (Abb. 2.7). Im pH-Bereich zwischen pH 7,0 und pH 8,0, wo das Wachstumsoptimum vieler Algenspezies zu finden ist (z. B. [132]), liegt hauptsächlich Hydrogencarbonat vor. Alle Algen nehmen gelöstes CO_2 aus der Umgebung auf, die meisten besitzen zudem die Fähigkeit zur Aufnahme von Hydrogencarbonat [133]. Man erkennt anhand obiger Reaktionsgleichung, dass der pH-Wert wiederum durch das Lösen von CO_2 und die nachfolgenden Reaktionen beeinflusst wird und demnach auch vom Partialdruck von CO_2 in der Gasphase und der Aufnahmerate der Algen abhängt [48].

In der experimentellen Praxis wird CO_2 in der Regel mit Luft in einem definierten Verhältnis gemischt und die Kulturen werden mit konstantem CO_2 -Volumenanteil begast [134]. Häufig finden sich auch Regelungskonzepte, wobei der pH-Wert durch einen variablen CO_2 -Volumenanteil geregelt wird [135]. Für die technische Produktion von Algenbiomasse wird dagegen vorgeschlagen das mit CO_2 angereicherte Abgas von Kraftwerken oder industriellen Anlagen zu nutzen. Dabei wird nicht nur ein Abfallstoff genutzt, sondern nach der Einführung von CO_2 -Zertifikaten besteht derzeit auch ein finanzieller Anreiz, den CO_2 -Anteil von Industrieabgasen durch technische Lösungen zu senken [136].

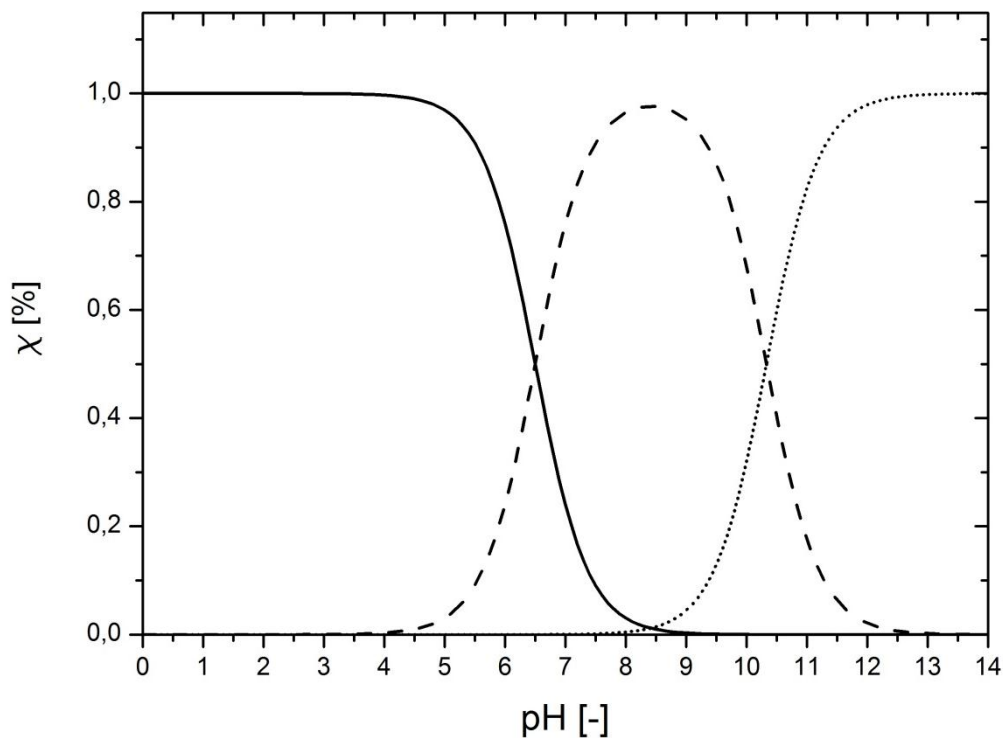


Abb. 2.7: Einfluss des pH-Werts auf die Stoffmengenanteile von CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- und CO_3^{2-} im Gemisch aus den vier Spezies. — Stoffmengenanteil von CO_2 und H_2CO_3 $\chi(\text{CO}_2+\text{H}_2\text{CO}_3)$; ---: Stoffmengenanteil von HCO_3^- $\chi(\text{HCO}_3^-)$; ⋯: Stoffmengenanteil von CO_3^{2-} $\chi(\text{CO}_3^{2-})$.

Der Einfluss des CO_2 -Volumenanteils auf das Wachstum von Mikroalgen wurde in vielen experimentellen Arbeiten untersucht. Es ist schwierig den Partialdruck des CO_2 in der Lösung zu messen und zu regeln. Aufgrund des hohen technischen Aufwandes wurde die Untersuchung daher oft auf die Steuerung des CO_2 -Volumenanteils in der Begasung beschränkt [137-139]. Allerdings kann dann keine Aussage über den Partialdruck im Medium gemacht werden, da dieser stark von der Aufnahmerate des CO_2 durch die Algen (also der Biomassekonzentration und der Wachstumsrate der Algen) abhängt und weiterhin wesentlich durch den Massentransferkoeffizienten im Reaktorsystem beeinflusst wird. Um prozesstechnisch relevante Daten zu erheben muss dagegen der Partialdruck in der Lösung bekannt sein und darauf basierend der Einfluss auf die Wachstumsrate untersucht werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Der kinetische Einfluss des CO_2 -Partialdrucks resultiert hauptsächlich aus der begrenzten Affinität des Enzyms RuBisCO zu CO_2 . Bei atmosphärischem CO_2 -Partialdruck wird die maximale Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms nicht erreicht [133]. Zudem weist es neben der

eigentlichen Funktion der Carboxylierung, welche für die CO₂-Fixierung im Calvin-Benson-Zyklus verantwortlich ist, auch Oxygenase-Aktivität auf [140]. Damit findet eine Konkurrenz der CO₂-Fixierung und der Synthese von Glykolat statt. Geringe Konzentrationen von CO₂ in der Umgebung des Enzyms RuBisCO führen demnach zu einem geringen Umsatz von CO₂ im Calvin-Benson-Zyklus und damit letztendlich zu einer geringen Wachstumsgeschwindigkeit. Niedrige intrazelluläre Konzentrationen von CO₂, insbesondere in den Chloroplasten, finden sich besonders bei geringem CO₂-Partialdruck im Kulturmedium. Hier wirkt dann die CO₂ Aufnahme limitierend und begrenzt somit das Wachstum der Algen.

Um die Konzentration von CO₂ in den Chloroplasten zu erhöhen finden sich sogenannte CO₂-konzentrierende Mechanismen (CO₂ concentrating mechanisms, CCMs). Die Mechanismen umfassen den aktiven Transport von HCO₃⁻ und teilweise auch von CO₂ und das Ansäuern von Kompartimenten und die damit gekoppelte Verschiebung der Gleichgewichte zu gelöstem CO₂ [141, 142]. Außerdem sind einige Spezies zur Carboxylierung eines C₃-Moleküls und zur Decarboxylierung des C₄-Produkts in unmittelbarer Umgebung des RuBisCO fähig, wodurch CO₂ transportiert und am Ort des Verbrauchs bereitgestellt wird [143, 144]. Des Weiteren spielen Carboanhydrasen eine entscheidende Rolle. Diese beschleunigen die Gleichgewichtseinstellung zwischen gelöstem CO₂ und Hydrogencarbonat in verschiedenen Kompartimenten [145, 146].

Die Expression der involvierten Gene und Aktivität der beteiligten Enzyme wird durch die CO₂-Konzentration bzw. den CO₂-Partialdruck geregelt. Dabei versuchen die Organismen insbesondere in einer Umgebung mit geringem CO₂-Partialdruck durch Expression von CCMs das gelöste Gas bzw. Hydrogencarbonat intrazellulär zu konzentrieren [147]. Aber auch eine lichtabhängige Aktivierung der CCMs wurde experimentell nachgewiesen. Man geht davon aus, dass der höhere Energieverbrauch durch Expression der involvierten CCM-Gene und für z .B. den aktiven Transport im Falle der Lichtlimitierung nicht aufrechterhalten werden kann und entsprechend herunterreguliert wird [133, 148, 149].

2.3.2 Die Regelung der CO₂-Versorgung in der phototrophen Kultivierung

Während phototrophe Kulturen in vielen experimentellen Arbeiten mit einem konstanten CO₂-Volumenanteil begast werden, ist auch die Regelung mit einfachen P-Reglern über den pH-Wert in der Praxis weit verbreitet [134, 135]. Letztere Variante ist möglich, da das Lösen

von CO₂ über die in (2.2) dargestellten Gleichgewichtsreaktionen auch den pH-Wert absenkt. Neben der Regelung von wachstumsrelevanten Prozessgrößen wie der CO₂-Konzentration und des pH-Werts, deren kinetischer Einfluss in vielen Studien gezeigt wurde (z. B. [150, 151]) ist eine weitere relevante Fragestellung etwa die Minimierung des CO₂-Volumenanteils im Abgasstrom. Dies kann etwa bei der Auslegung von Lebenserhaltungssystemen oder bei der Sequestrierung von CO₂ relevant sein [152-154]. Darüber hinaus kann eine solche Optimierungsaufgabe hohe Bedeutung besitzen, sofern CO₂ nicht frei verfügbar, sondern der Einsatz mit Kosten behaftet ist.

Der CO₂-Bedarf phototropher Kulturen und die Auswirkungen des CO₂-Verbrauchs über den pH-Wert kann als nicht-lineares System betrachtet werden [35, 155, 156]. Wegen der Komplexität ist die vollständige modelltheoretische Erfassung und modellbasierte Regelung des Systems zunächst nicht praktikabel. Dennoch finden sich modellbasierte Ansätze zur Regelung in der Literatur. In Form von modellprädiktiven Reglern wurde die pH-Regelung durch Injektion von CO₂ bereits vorgenommen [153, 155, 157]. In den modellprädiktiven Regelungsansätzen (Model Predictive Control, MPC) findet man wegen der hohen Komplexität unter anderem Modelle, die allein mit stochastischen Verfahren der Systemidentifikation aus dem beobachteten dynamischen Systemverhalten abgeleitet wurden [153, 155] oder komplexere MPC-Regelalgorithmen, die etwa künstliche neuronale Netzwerke einbeziehen [157].

Die modellprädiktive Regelung basiert auf der zeitdiskretisierten Prädiktion zukünftiger Systemzustände, die anhand eines mathematischen Modells berechnet werden. Die Abweichungen von Sollwerten (der Trajektorie) werden zu allen zukünftigen Zeitpunkten berechnet und durch die Wahl geeigneter Stellgrößenänderungen minimiert. Diese Methodik der Regelung ist vorteilhaft, weil die Optimierungskriterien flexibel gewählt und erweitert werden können. So können beispielsweise geringe Stellgrößenänderungen einem direkten Ausregeln der Regeldifferenz durch extreme Stellgrößenänderungen vorgezogen werden. Zudem können Stellwertbeschränkungen in die Optimierungsaufgabe einbezogen werden. Eine modellprädiktive Regelung kann außerdem um eine Störgrößenaufschaltung erweitert werden, was im Falle der phototrophen Kultivierung durch Messung und Berücksichtigung der Lichtintensität erfolgen kann. Die variable Lichtintensität kann als die wesentliche Störgröße des Systems betrachtet werden. Eine ausführliche Darstellung von MPC-Konzepten kann bei Camacho [158] gefunden werden.

3 Material und Methoden

3.1 Algenstämme

3.1.1 *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum ist eine Kieselalge (Diatomee) der Klasse der Bacillariophyceae. Abhängig von der Art des Stammes und den Kultivierungsbedingungen nehmen die Zellen die ovale, die spindelförmige oder die triradiäre Morphologie an [159]. Üblicherweise treten bei Kultivierungen der Alge mehrere Morphologien zeitgleich auf. *P. tricornutum* kann bei Vorhandensein von Kieselgel Frusteln ausbilden, jedoch ist eine Kultivierung auch ohne eine Siliziumquelle im Medium möglich [132]. Neben der Fähigkeit unter Nährstofflimitierung Speicherlipide zu synthetisieren ist der Organismus ein interessanter Stamm für potentielle technische Verfahren aufgrund des hohen Gehaltes an mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Insbesondere weist die Alge einen hohen Anteil an Eicosapentaensäure (EPA) auf, deren mögliche Rolle bei der Prävention und Behandlung von kardiovaskulären und inflammatorischen Erkrankungen untersucht wurde [160-163]. Zudem ist *P. tricornutum* ein typischer Modellorganismus in der Photobiotechnologie, weil auch das Genom vollständig sequenziert ist (Bowler et al., 2008). Der photosynthetische Apparat besteht aus Chlorophyll a, Chlorophyll c und Karotinoiden [164].

Zunächst wurde der Stamm 1090-1b genutzt, jedoch wurde aufgrund experimentell beobachteter Zellagglomeration bei der Kultivierung in Plattenreaktoren danach der Stamm 1090-1a weiterverwendet. Beide Stämme wurden von der Sammlung von Algenkulturen Göttingen (EPSAG) bezogen. Sie wurden ursprünglich in marinen Gewässern vor der Küste Großbritanniens isoliert.

3.1.2 *Nannochloropsis salina*

Die Salzwasseralge *Nannochloropsis salina*, zur Klasse der Eustigmatophyceae gehörig, hat eine Größe von ca. 2-4 µm und besitzt die Fähigkeit unter Nährstofflimitierung durch die Synthese von Speicherlipiden einen hohen Lipid-Massenanteil, im Folgenden auch als spezifische Lipidkonzentration bezeichnet, zu erzielen [165]. Dadurch ist die Alge für die

Gewinnung von Biodiesel grundsätzlich interessant. Darüber hinaus weist auch diese Alge einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren und an Karotinoiden auf, was auch eine weitergehende wirtschaftliche Nutzung ermöglicht. Kennzeichnend für die Alge ist, dass sie lediglich Chlorophyll a synthetisiert und in den Antennenkomplexen keine Moleküle des Chlorophylls b oder des Chlorophylls c zu finden sind [166]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Stamm 40.85 der Sammlung von Algenkulturen Göttingen (EPSAG) verwendet. Er wurde ursprünglich vor der Küste Schottlands isoliert.

3.1.3 *Chlorella vulgaris*

Die schnell wachsende Süßwasseralge *Chlorella vulgaris* gehört zur Klasse der Trebouxiophyceae. Die Pigmentierung besteht aus Chlorophyll a, Chlorophyll b und Karotinoiden. Neben der phototrophen Kultivierung wird die Alge häufig mixotroph oder heterotroph kultiviert. Einerseits gilt die Alge als potentieller Lieferant für Proteine für die Nahrungs- und Futtermittelindustrie, andererseits liegt auch die Nutzung weiterer Zellbestandteile wie der Lipide, Vitamine und Pigmente nahe [167]. Der Stamm SAG 211-12 wurde von der Sammlung von Algenkulturen Göttingen (EPSAG) bezogen. Er wurde ursprünglich in einem eutrophen stehenden Gewässer nahe bei Delft (Niederlande) isoliert.

3.2 Kultivierungsbedingungen

3.2.1 Nährmedium

Das in der Arbeit verwendete Kultivierungsmedium basiert auf einer von Mann und Myers [168] veröffentlichten Zusammensetzung. Im Zuge der Optimierung des Mediums wurde die Konzentration von $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ um die Hälfte auf 0,6 g/l reduziert um dem geringen Verbrauch des Sulfats Rechnung zu tragen. Die Konzentration von K_2HPO_4 und NaNO_3 wurden im Standardmedium auf 0,15 g/l und 1,0 g/l eingestellt, um höhere Biomassekonzentration zu erreichen. Die Konzentrationen beider Salze wurden insbesondere in Versuchen variiert, wo eine gezielte Nährstofflimitierung erreicht werden sollte. Entsprechende Variationen sind im Ergebnisteil gesondert aufgeführt. Für die Süßwasseralge *C. vulgaris* wurde auf eine Zugabe von NaCl vollständig verzichtet. Das Medium für die beiden Salzwasseralgen *P. tricornutum* und *N. salina* wies eine NaCl-Konzentration von

27,0 g/l auf. Das Medium für *P. tricornutum* enthielt zusätzlich $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in einer Konzentration von 30 mg/l um die Ausbildung der Frusteln zu ermöglichen.

Zur Reduktion der Infektionsgefahr der phototrophen Kulturen wurden die Algen in Reaktoren nicht mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer (im Folgenden kurz als Tris bezeichnet) kultiviert, da dieser als Kohlenstoffquelle heterotrophes Wachstum fördern kann (Fábregas et al., 1993). Der pH-Wert wurde während der Kultivierung im Allgemeinen über den CO_2 -Volumenanteil im Gasstrom geregelt. Lediglich das Medium für Vorkulturen enthielt eine Tris-Konzentration von 3,1 g/l. Hier wurde der pH vor dem Autoklavieren mit HCl oder NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Die Zusammensetzung der Standardmedien für die drei Algenspezies ist im Anhang angegeben. Alle Chemikalien wurden von Carl Roth bezogen und waren analysenrein (p.a.).

3.2.2 Stammhaltung und Vorkulturen

Die Vorkulturen wurden in 500 ml Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 200 ml angezogen und in Intervallen von 14 Tagen überimpft. Dabei wurden die Vorkulturen auf Rotationsschüttlern (KS 501 digital, IKA Werke GmbH) bei einer Frequenz von 100 U/min in temperaturregulierten Inkubatoren (MK 1200, Flohr Instruments) geschüttelt. Die beiden Stämme *N. salina* und *P. tricornutum* wurden bei 21 °C kultiviert, *C. vulgaris* dagegen bei 25 °C. Die Schüttler waren mit Beleuchtungsmodulen ausgestattet, welche mit SMD-LEDs bestückt waren. Dadurch war eine Beleuchtung durch die Unterseite der Schüttelkolben gegeben. Die Beleuchtungsmodule wurden im Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich III: Bioverfahrenstechnik des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) entwickelt. Die Photonenflussdichte (PFD) wurde auf 150 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ eingestellt. Zusätzlich wurden die Stämme auf Agarplatten kultiviert. Diese wiesen die Zusammensetzung des Standardmediums mit einem Zusatz von 1 % Agar auf. Nach ca. sechs Monaten der Submerskultivierung mit zwischenzeitlichem Überimpfen wurden neue Schüttelkulturen von den Oberflächenkulturen der Agarplatten angeimpft.

3.2.3 Satzkultivierung in Mini-Plattenreaktoren

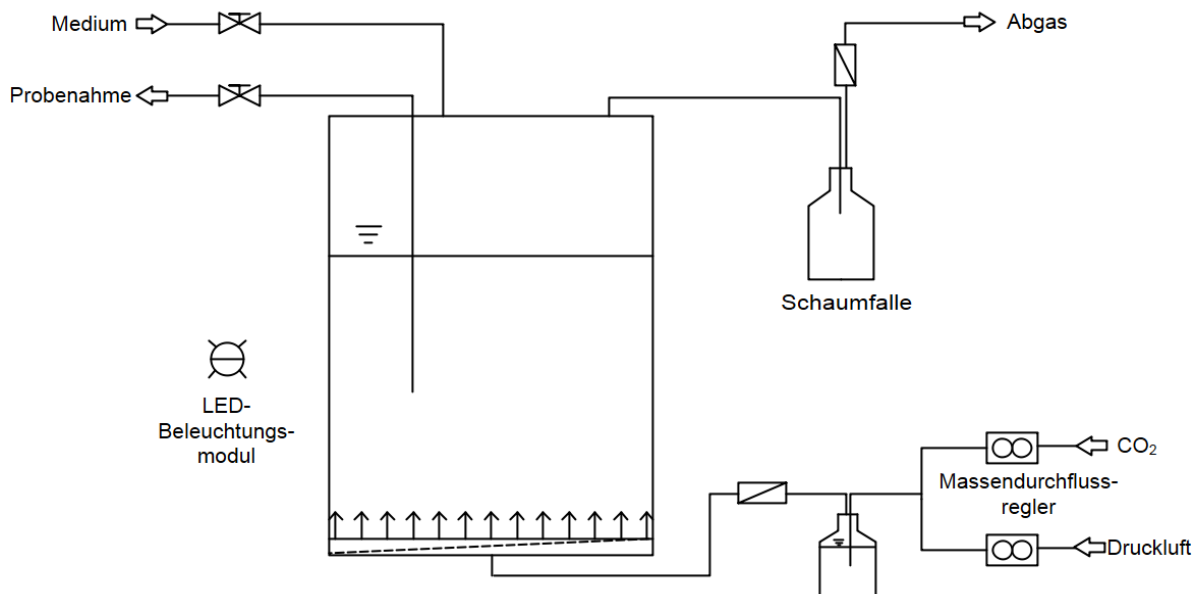


Abb. 3.1: Verfahrensfliesschema zur Satzkultivierung in 200 ml Mini-Plattenreaktoren.

Zur Parallelisierung von Satzkultivierungen wurden Versuche parallel in sechs Mini-Plattenreaktoren der Abmessungen 140 mm × 100 mm × 20 mm mit einem Flüssigkeitsvolumen von 200 ml kultiviert. Abb. 3.1 zeigt das zugehörige Verfahrensfliessbild. Die Reaktoren bestanden aus einem Gehäuse aus Stahl und zwei transparenten Platten aus Borosilikatglas an der Front- und Rückseite. In der Bodenplatte der Reaktoren war eine Polytetrafluorethylen (PTFE)-Membran mit 1 µm Porengröße (THOMAPOR, Reichelt Chemietechnik) eingelassen. Hierüber wurde das Kulturvolumen begast. Dabei wurde die durch einen Multikanal Gasflussregler MKS 647C (MKS Instruments) und zwei Massendurchflussregler (Mass-Flo, MKS Instruments) gesteuerten Gasflüsse von Luft und CO₂ in der Schlauchstrecke vor Eintritt in den Reaktor gemischt und anschließend durch eine Gaswaschflasche geleitet um das Gasgemisch mit Wasserdampf zu sättigen und signifikante Evaporationsverluste im Reaktionsvolumen zu vermeiden. Beim Durchtritt durch die Membran lösten sich über der gesamten Oberfläche der Membran Luftblasen ab, was zu einer gleichmäßigen Blasenbegasung während der gesamten Kultivierungsdauer führte. Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren auf pH 11,0 ± 0,2 titriert und vor dem Inokulieren der Kultivierung durch manuelles Steuern des CO₂-Volumenstroms eingestellt. Die Begasungsrate wurde auf 0,4 vvm eingestellt. Das Abgas wurde über eine Schaumfalle und einen PTFE Spritzenvorsatzfilter mit der Porengröße 0,2 µm (Minisart SRP15, Sartorius)

abgeleitet. Die Reaktoren wurden in einem Klimaschrank MKK 1200 (Flohr Instruments) bei 21 °C Umgebungstemperatur betrieben. Sie wurden vor der Kultivierung in einem Kammerautoklaven (Varioklav, H+P Labortechnik) sterilisiert. Autoklaviertes Medium konnte über Luer-Lock Kupplungen nach der Sterilisation in die Hauptreaktorkammer gefüllt werden. Der Reaktor wurde unter sterilen Umgebungsbedingungen in einer Sterilbank Hera Safe HS 12 (Thermo Fisher Scientific) mit 5 ml Vorkulturvolumen über die am Deckel angebrachten Luer-Lock- Anschlüsse angeimpft. Die Probenahme erfolgte mit sterilisierten Spritzen über ein Safeflow Membranventil (Braun), das über die Luer-Lock-Anschlüsse mit einer in die Suspension ragenden Kanüle verbunden war. Die Beleuchtung der Reaktoren erfolgte durch mit lichtemittierenden Dioden (LEDs) bestückte Beleuchtungsmodule, welche in 10 cm Entfernung von der Oberfläche der Reaktoren fixiert waren. Die Beleuchtungsmodule waren austauschbar. Einerseits wurden warmweiße LEDs des Typs NS6L083AT (Nichia) verwendet. Diese waren mit Kollimatoren mit 6° Abstrahlwinkel (IMM Photonics) bestückt. Für andere Versuche wurden Beleuchtungsmodule entwickelt, welche die Kombination von zwei monochromatischen Lichtquellen erlaubte (Abb. 3.3 B). Dabei wurden ebenfalls mit Kollimatoren bestückte blaue LEDs des Typs LXML-PR01-0500 (Luxeon) mit dem Emissionsmaximum zwischen 440 und 445 nm und rote LEDs der Kennung L680-02AU (Epitex) mit dem Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 680 nm kombiniert. Letztere wiesen nach Herstellerangaben einen Abstrahlwinkel von 7° auf und waren daher nicht mit Kollimatoren bestückt. Die Kalibrierung der Lichtintensität erfolgte durch Variation der Stromstärke und Messung der Photonenflussdichte hinter der zweiten Glasscheibe des mit Wasser gefüllten Reaktors. Die Messung der Photonenflussdichte erfolgte mit dem Lichtsensor LI-250 (LI-Cor).

3.2.4 Satzkultivierung in Midi-Plattenreaktoren

Abb. 3.2 zeigt ein Verfahrensflißschema zur Satzkultivierung in Midi-Plattenreaktoren. Diese wurden - ebenso wie die Mini-Plattenreaktoren - in der Arbeitsgruppe entwickelt. Die Konstruktion entspricht grundsätzlich derjenigen der kleineren Mini-Plattenreaktoren. Die Abmessungen waren 350 mm × 200 mm × 20 mm. Die Reaktoren wurden mit 1,2 l Kulturmedium gefüllt. Im Gegensatz zu den Mini-Plattenreaktoren bestand die Möglichkeit der direkten Temperaturregelung durch die seitlichen Edelstahlelemente des Rahmens. Hier konnten der Kühlwasserzulauf und -rücklauf angeschlossen werden. Die Magnetventile zur

Temperaturregelung wurden über das Prozessleitsystem BioProCon, das auf der LabView-Entwicklungsumgebung (National Instruments) programmiert wurde, angesteuert. Als Temperatursensor war ein PT100 Widerstandsthermometer im Reaktor über die Deckelplatte eingebaut, der in die Zellsuspension ragte. Für alle Experimente mit *P. tricornutum* und *N. salina* wurde die Temperatur über einen P-Regler bei 21 ± 1 °C eingestellt. Für *C. vulgaris* wurde ein Sollwert von 25 °C vorgegeben. Der im Reaktor eingebaute pH Sensor (Polylite Plus Arc 225, Hamilton) wurde zur pH-Regelung genutzt. Stellglied in dem Regelkreis war der CO₂-Volumenstrom. Vor Beginn der Kultivierung wurde der pH-Wert des Kultivierungsmediums auf pH 10,5 eingestellt. Durch Sättigen mit CO₂ wurde der Sollwert von pH 7,7 bei Experimenten mit *P. tricornutum* und *N. salina* und pH 7,5 bei Kultivierungen von *C. vulgaris* erreicht. Diese Vorgehensweise diente dazu einen ausreichen hohen CO₂-Volumenstrom schon zu Beginn der Kultivierung zu erreichen, so dass kein limitierender Einfluss einer zu geringen Konzentration von gelöstem CO₂ auf die Wachstumsrate auftrat. Begast wurden die Reaktoren bei einem Flüssigkeitsvolumen von 1,2 l mit 0,2 vvm, bei einem Flüssigkeitsvolumen von 1 l mit 0,3 vvm. Der Aufbau der Begasungsvorrichtung entsprach derjenigen der Mini-Plattenreaktoren (Abb. 3.1).

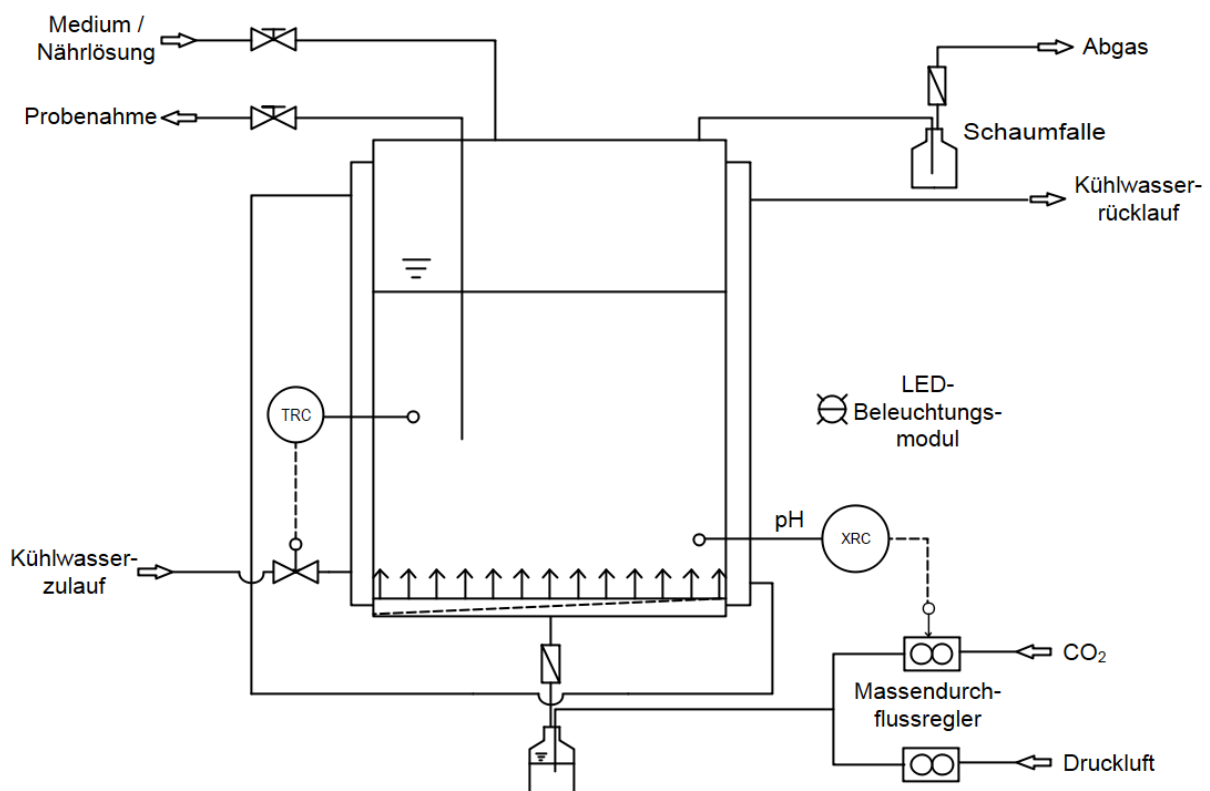


Abb. 3.2: Verfahrensfliessschema zur Satzkultivierung in 1 l Midi-Plattenreaktoren.

Die Reaktoren und das Medium wurden vor Beginn der Kultivierung im Kammerautoklaven sterilisiert. Bei der Inokulation wurden 20 ml Vorkulturvolumen durch Safeflow-Ventile injiziert. Zusätzlich konnte durch weitere Safeflow-Ventile am Reaktordeckel Nährlösung während des Kultivierungsverlaufs zugegeben werden. Die mit warmweißen LEDs ausgestatteten Beleuchtungsmodule waren 125 mm von der Oberfläche der Reaktoren entfernt installiert. Der Aufbau entsprach prinzipiell demjenigen der Beleuchtungseinheiten der Mini-Plattenreaktoren.

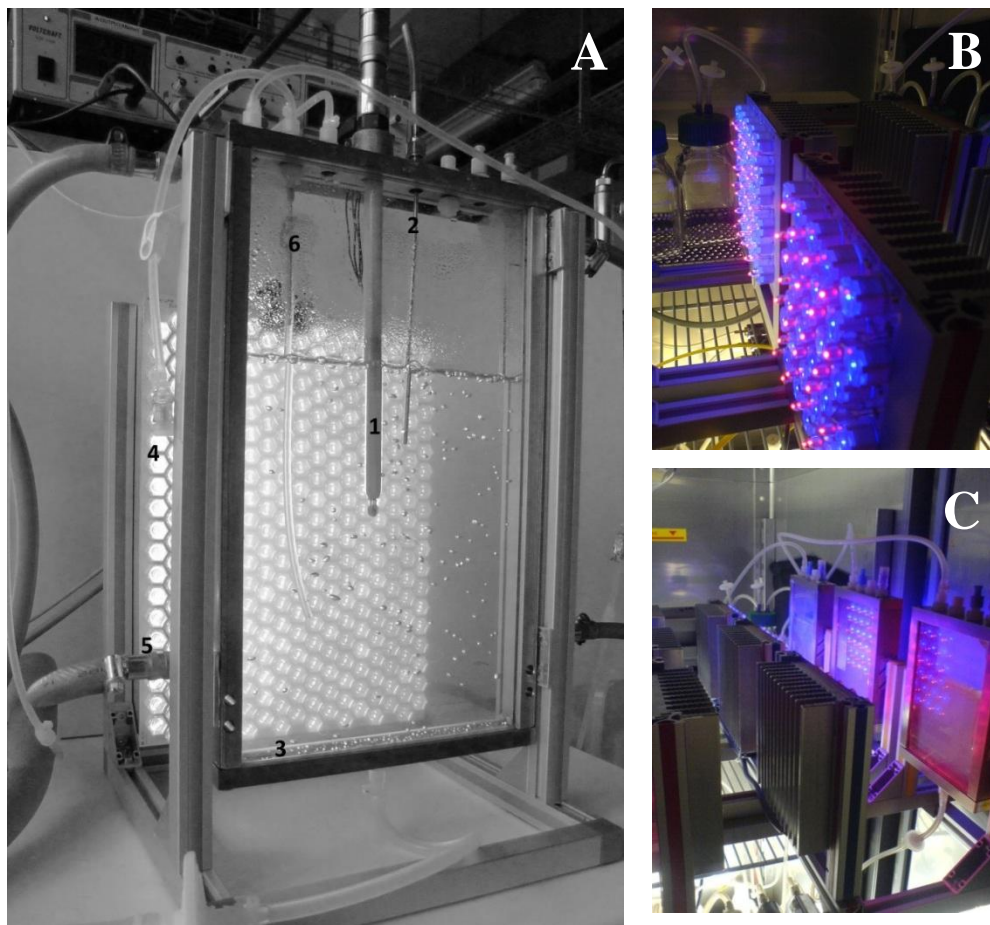


Abb. 3.3: Midi- und Mini-Plattenreaktoren. A: Midi-Plattenreaktor, 1: pH Sonde, 2: PT100 Temperatursonde, 3: PTFE Membran, 4: LED-Beleuchtungsmodul, 5: Anschluss für den Kühlwasserzulauf. B: Beleuchtungsmodule zur Beleuchtung mit monochromatischen LEDs. C: Kultivierung in Midi-Plattenreaktoren.

3.2.5 Diskontinuierliche Kultivierung in Midi-Plattenreaktoren mit wiederholten Ernteschritten

Bei dieser Variante der Prozessführung wurde ein Teil der Kultursuspension zu definierten Zeitpunkten durch manuelle Steuerung einer Schlauchpumpe über mit einem Steigrohr im Reaktor verbundene Schläuche abgepumpt. Das entnommene Volumen wurde durch Zuführen frischen Mediums ausgeglichen. Die Vorratsflasche war - ebenso wie das im Reaktor eingebrachte Steigrohr - durch Schläuche an Luer-Lock Anschlüsse des Reaktordeckels gekoppelt. Der pH-Wert des zugeführten Mediums wurde vor dem Autoklavieren auf pH 10,5 eingestellt, so dass durch Sättigung mit CO₂ nach dem Nachfüttern im Gleichgewicht wieder ein pH-Wert von pH 7,7 erreicht werden konnte. In diesem Fall war eine pH-Regelung über den CO₂-Volumenstrom noch nicht vorgesehen. Die Begasung erfolgte bei 0,6 vvm und einem CO₂-Volumenanteil von 4 %. Zusätzlich wurde das Medium mit Tris in einer Konzentration von 6,3 g/l gepuffert.

3.2.6 Kontinuierliche Kultivierung in Midi-Plattenreaktoren

Um die beiden Prozessschritte der Biomassebildung bei vollständiger Versorgung mit Nährsalzen und der Lipidbildung bei Stickstofflimitierung räumlich zu trennen, wurde ein zweistufiger kontinuierlicher Prozess entworfen und umgesetzt. Der Aufbau ist in Abb. 3.4 zu sehen.

Zwei Midi-Plattenreaktoren wurden in Serie geschaltet. Der erste Reaktor mit einem Füllvolumen von 0,5 l diente der Synthese von Biomasse. Hier sollte eine Nährstofflimitierung im Fließgleichgewicht vermieden werden. In diesen Reaktor wurde kontinuierlich frisches Medium zunächst mit einem Volumenstrom von 0,25 l/d und später mit 0,30 l/d gepumpt. Zugleich wurde Zellsuspension über ein Steigrohr - bestehend aus einer Kanüle mit einer Silikonschlauch-Verlängerung - abgeführt. Das Steigrohr war so hoch angebracht, dass das Flüssigkeitsvolumen auf 0,5 l festgelegt war. Der Gas Hold-up wurde dabei berücksichtigt. Im zweiten Reaktor wurde auf dieselbe Weise über den gesamten Kultivierungszeitraum ein Flüssigkeitsvolumen von 1 l eingestellt. Damit wurde in der zweiten Stufe der Kaskade die Verweilzeit der Zellen verdoppelt, was zu einer stärkeren Akkumulation von Speicherlipiden führen sollte. Aufgrund der unterschiedlichen Füllvolumina ergab sich zunächst eine Verdünnungsrate von 0,5 d⁻¹ im ersten und 0,25 d⁻¹ im zweiten Reaktor. Später wurde durch Erhöhung des Volumenstromes eine Verdünnungsrate

von $0,6 \text{ d}^{-1}$ in der ersten Stufe und $0,3 \text{ d}^{-1}$ in der zweiten Stufe erreicht. Das zu Beginn der Kultivierung vorgelegte Medium war identisch mit der im kontinuierlichen Zustrom geförderten Nährlösung. Es handelte sich um das im Anhang A1 angegebene Standardmedium für *P. tricornutum*. Lediglich die Konzentrationen von K_2HPO_4 und NaNO_3 wurden abweichend auf $0,2 \text{ g/l}$ bzw. $1,2 \text{ g/l}$ erhöht.

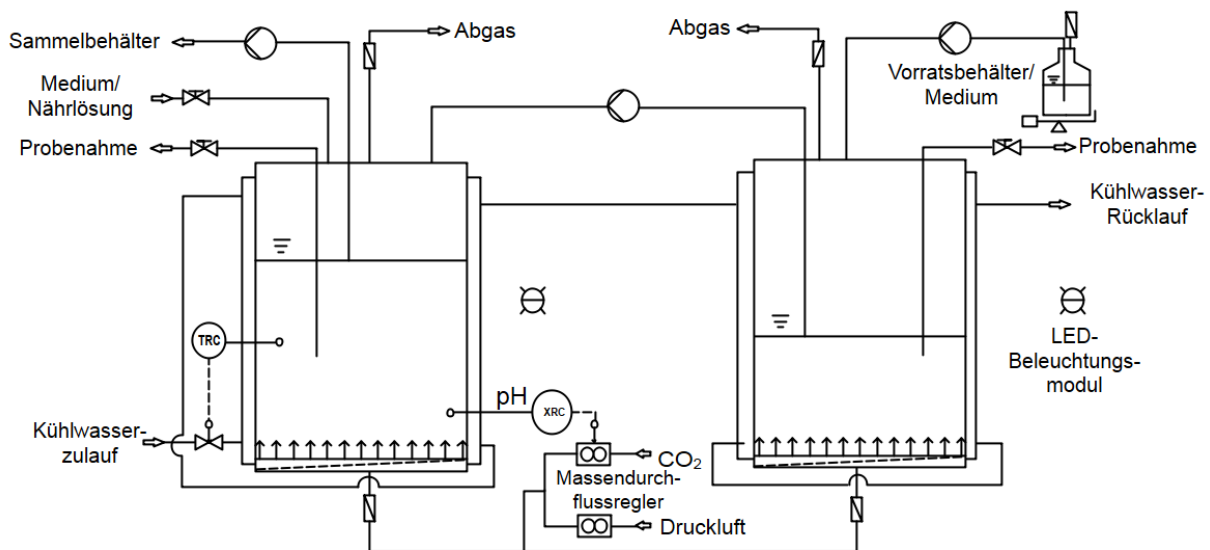


Abb. 3.4: Zweistufiger kontinuierlicher Prozess zur Kultivierung von *P. tricornutum*.

Beide Reaktoren wurden mit warmweißen LEDs mit einer PFD von anfänglich $200 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ und ab dem Start der kontinuierlichen Prozessführung mit $300 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ beleuchtet. Die Regelung des pH erfolgte über das automatisierte Einstellen des CO_2 -Volumenstroms, wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben. Allerdings konnte aufgrund der geringen Füllhöhe in der ersten Stufe nur der pH-Wert in der zweiten Stufe kontinuierlich gemessen werden. Darüber wurde der CO_2 -Volumenanteil in der Begasung beider Reaktoren geregelt. Die pH-Werte in beiden Reaktoren wurden zur Sicherheit mit den Messwerten von Proben aus der Zellsuspension verglichen. Letztere wurden im Anschluss an die Probenahme mit einem FE20 Five Easy pH-Meter (Mettler Toledo) gemessen. Dabei wurde eine maximale Abweichung von $\text{pH} \pm 0,15$ zwischen beiden Reaktoren festgestellt. Die Begasung erfolgte mit einem Volumenstrom von 333 ml/min , womit $0,33 \text{ vvm}$ im Reaktor mit 1 l Füllvolumen und mit $0,66 \text{ vvm}$ im Reaktor mit $0,5 \text{ l}$ Füllvolumen erreicht wurden. Die Temperatur wurde ebenfalls über die Messung im ersten Reaktor geregelt und der Kühlwasserstrom damit in beiden Reaktoren entsprechend des in Abb. 3.4 gezeigten Aufbaus eingestellt.

3.2.7 Kultivierung im Rührkesselreaktor

Im Modell-Photobioreaktor des Typs Kleinlaborfermenter KLF 2000 (Bioengineering) wurden ausschließlich Satzkultivierungen durchgeführt (Abb. 3.5). Der Reaktor war mit LED-Beleuchtungsmodulen ausgestattet, welche in zwei Halbschalen unterteilt waren und den Reaktor vollständig umfassten. Zur Verringerung des Abstrahlwinkels waren die LEDs mit Kollimatoren ausgestattet, welche den Winkel auf 6° reduzierten. Durch die zylindrische Geometrie des Reaktors waren die Lichtgradienten innerhalb der Suspension verringert, da sich die Fokussierung des Lichts zum Zentrum des Reaktors und die Abschattung der Algen zumindest teilweise kompensierten. Bei einer definierten optischen Dichte der Zellsuspension war ein annähernd homogenes Lichtfeld im Reaktor zu erwarten. Dies bestätigten Messungen der Lichtintensität an verschiedenen Positionen innerhalb des Reaktors mit einem sphärischen Lichtsensor (QSL-2101, Biospherical Instruments). Die PFD wurde über die Stromstärke des Beleuchtungsmoduls eingestellt. Entsprechende Kalibrierungen sind im Anhang zu finden. Während der Kultivierung konnte die optische Dichte innerhalb der Submerskultur mit einem Photometer (Avantes) online gemessen werden. Dieses bestand aus einem Sensorkopf mit einem 2,5 mm breiten Messspalt innerhalb des Reaktors, der über Glasfaserleiter mit einer Lichtquelle (AVALight-Hal-S, Avantes) mit einer 10 W Wolfram-Halogenlampe und einem Diodenarray Detektor (AvaSpec-3648, Avantes) verbunden war. Der Reaktor wurde mit einem Füllvolumen von 1,7 l betrieben. Die Sterilisation erfolgte in situ durch Autoklavieren des mit Medium gefüllten Reaktors. Der Gasvolumenstrom betrug 100 ml/min und damit 0,06 vvm. Der CO₂-Volumenstrom wurde - wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben - über das pH-Signal geregelt. Zusätzlich war es möglich, während der Kultivierung pH-Regelabweichungen durch Titration mit Lauge oder Säure zu kompensieren. Sofern nicht anders beschrieben wurde vor dem Inokulieren des Reaktors der CO₂-Grundvolumenstrom festgelegt und der gewünschte Sollwert des pH (pH 7,7 im Falle bei Kultivierung von *P. tricornutum* und 7,5 bei Kultivierung von *C. vulgaris*) durch Titration mit 1 M NaOH eingestellt. Unmittelbar vor der Inokulation wurde die pH-Regelung über den CO₂-Volumenstrom gestartet. Bei den Versuchen mit *C. vulgaris* wurde zusätzlich ein dCO₂-Sensor (dCO₂ = dissolved CO₂) InPro5000 (Mettler-Toledo) eingebaut, womit der Partialdruck des CO₂ in der Lösung gemessen werden konnte.

Blasendispergierung und homogene Durchmischung des Reaktors wurden durch Rühren mit zwei radial fördernden Scheibenrührern mit jeweils 6 Rührblättern und einer Rührerdrehzahl von 250 rpm sichergestellt.

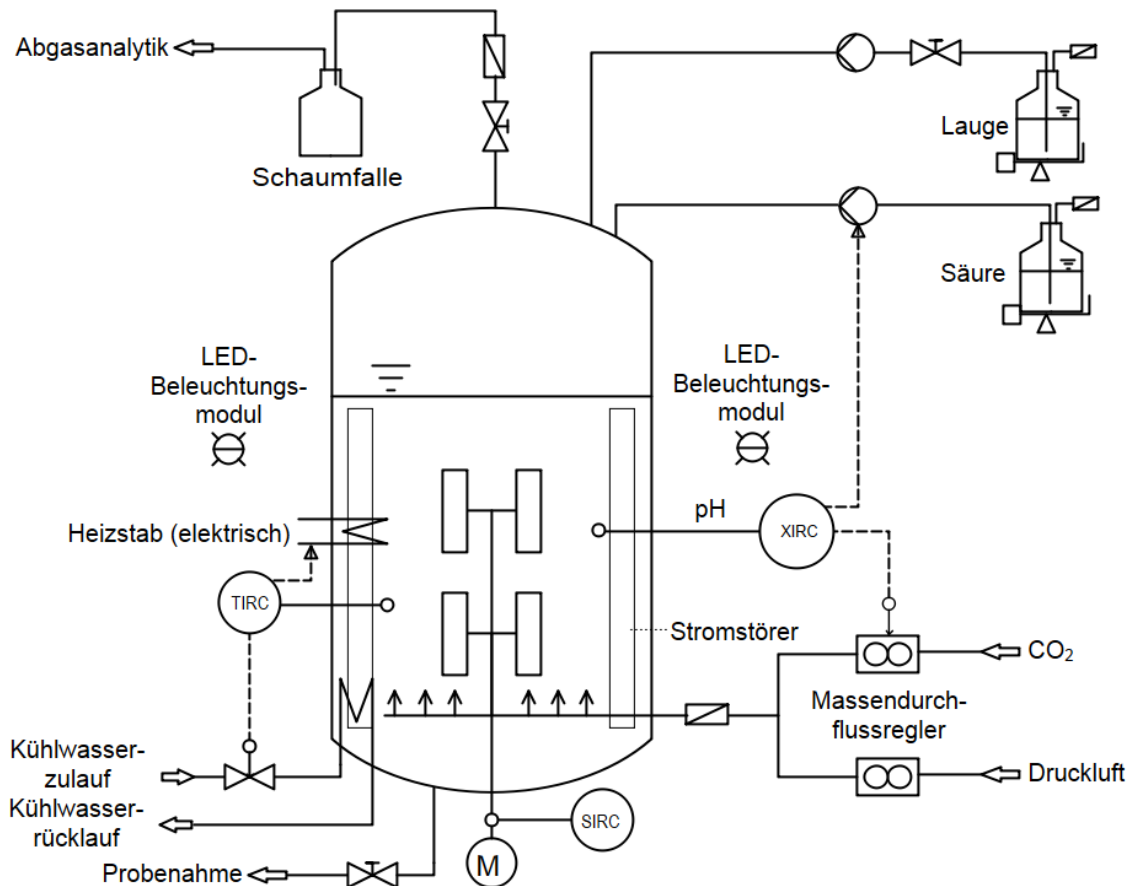


Abb. 3.5: Verfahrensfliesschema zur Satzkultivierung im Rührkesselreaktor.

Die Temperatur im Medium wurde bei Experimenten mit *P. tricornutum* und *N. salina* bei 21 °C und bei Experimenten mit *C. vulgaris* bei 25 °C gehalten. Stellgrößen des Regelkreises waren die Stromstärke eines in den Reaktor eingebauten Heizstabes und die Ventilstellung eines Magnetventils am Kühlwasserkreislauf. Das Abgas wurde in einem Polyethylen-Gassammelbeutel gesammelt und der CO₂- bzw. O₂-Volumenanteil wurde in Intervallen von ca. 10 min in einem Multor 610 System (Maihak) gemessen. Dazu wurde der Gasstrom über zwei kombinierte Magnetventile gesteuert. Die Datenaufzeichnung und Prozessregelung erfolgten über das in der Arbeitsgruppe entwickelte Prozessleitsystem BioProCon.

3.2.8 Kultivierung im Wellenreaktor zum Scale-up von Photobioprocessen

Der Prototyp des Wellenreaktors bestand wegen der Transparenz und der Materialbeständigkeit aus Polymethylmethacrylat mit 3 mm Materialstärke. Die Reaktorkammer wies zur Oberflächenvergrößerung eine wellenartige Struktur auf (Abb. 3.6). Die beleuchtete Grundfläche des Moduls mit einer Länge von 1380 mm und einer Breite von 725 mm betrug insgesamt 1 m². Die der Kultivierung dienende Hauptreaktorkammer hatte ein Füllvolumen von 20 l.

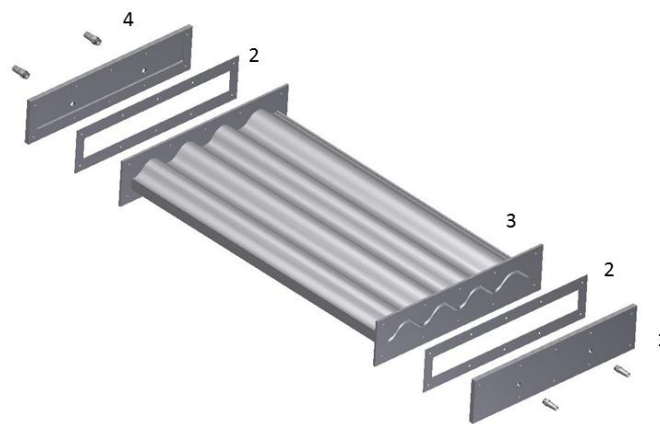


Abb. 3.6: Wellenreaktor – Explosionszeichnung. 1: vordere Stirnplatte mit ½“ Schlauchtülle; 2: 3 mm Silikondichtung; 3: Hauptreaktorkammer; 4: hintere Stirnplatte mit ¾“ Schlauchtülle.

Das Gesamtvolumen der Kultur betrug infolge der Verschlauchung, des in der Kreiselpumpe befindlichen Volumens und des Gastauschers 26,5 l. Das Verfahrensfließschema des experimentellen Aufbaus ist in Abb. 3.7 gezeigt. Eine obere Kammer mit 20 mm Schichtdicke diente der Kultivierung der Algensuspension. Die vier in Abb. 3.8 erkennbaren wellenförmigen Kanäle des Reaktorraums wurden laminar mit Hilfe einer Kreiselpumpe (Adapta, Hilge) bei einer Pumpfrequenz von 30 Hz mit einem Volumenstrom von $9,5 \pm 0,5$ l/min durchströmt. Die darunterliegende Kammer war mit Kühlwasser gefüllt und an einen Kühlkreislauf mit integriertem Kühlaggregat (Unichiller, Huber) angeschlossen. Der Wärmeübergang erfolgte über die gesamte Grundfläche der Reaktorkammern und war ausreichend, um die Temperatur im Falle der Kultivierung von *P. tricornutum* bei dem Sollwert von 21 °C und 25 °C bei der Kultivierung von *C. vulgaris* konstant zu halten. Vor und hinter der Hauptreaktorkammer befanden sich Messstrecken zur Messung von pO₂, pH, Temperatur und für Probenahmen. Der Partialdruck des im Medium gelösten Sauerstoffs (pO₂) und die Temperatur wurden mit einem Visiferm DO 160 Sensor (Hamilton) und einem

PT100-Element hinter der Hauptkammer des Reaktors gemessen. Der pH-Wert wurde im Medium mit Easyferm Plus Arc 225 Sensoren (Hamilton) sowohl vor Eintritt in die Reaktorkammer, als auch am Ausgang des Reaktors vor Eintritt in die Kreiselpumpe gemessen. Die Messung diente zur Überwachung von evtl. auftretenden Gradienten von gelöstem CO₂, da diese über die Gleichgewichtsreaktionen des gelösten CO₂, Hydrogencarbonat und Carbonat mit Gradienten des pH einhergehen. Die Begasung erfolgte in den vier Kanälen der Hauptreaktorkammer durch Blasenbegasung. Hierzu wurden 1/16“ PTFE Schläuche mit flanschlosen Anschlüssen (P-200X, IDEX) in der Stirnplatte der Reaktorkammer befestigt, so dass die Schläuche zur Begasung ca. 2 cm in die Reaktorkammer hineinragten. Der pH-Wert wurde bei pH 7,5 bzw. pH 7,7 bei Kultivierungen von *C. vulgaris* bzw. *P. tricornutum* mit Hilfe des CO₂-Volumenanteils geregelt. Der pH-Wert des Kultivierungsmediums wurde vor Einfüllen in den Reaktor auf pH 10,5 eingestellt. Durch CO₂-Sättigung vor Beginn der Kultivierungen konnte der Sollwert des pH bei einem ausreichend hohen CO₂-Grundvolumenstrom erreicht werden, so dass eine CO₂ Limitierung im Verlauf der Kultivierungen vermieden werden konnte. Zur Entgasung diente ein hinter der Kreiselpumpe eingebauter Gastauscher, der in der verwendeten Konfiguration lediglich aus einem Steigrohr für den Druckausgleich und das Ausgasen von O₂ bestand. Zudem war der Reaktor um 2,5° geneigt um eine Akkumulation von Gasblasen in der Reaktorkammer zu verhindern. In der frühen Phase der Reaktorentwicklung war die Begasung des Systems anders konfiguriert. In dieser Phase wurde Blasenbegasung in der Hauptreaktorkammer vermieden und eine Begasungsfritte in den Gastauscher eingebracht (Abb. 3.8). Somit konnten kleine Blasengrößen bei der Begasung mit dem Luft-CO₂-Gemisch erzielt werden. Zusätzlich wurde ein statischer Mischer in das Steigrohr des Gastauschers eingebracht um die Verweilzeit der Gasblasen zu erhöhen und damit den Gastransfer zu verbessern. In dieser Konfiguration fanden Be- und Entgasung im Gastauscher statt.

Beleuchtet wurde der Reaktor durch 3 Halogenscheinwerfer, einem 1000 W Halogenstrahler (Aurora) und zwei 500 W Halogenstrahlern (Philips). Die Bestimmung der auf die Reaktoroberfläche eingestrahnten PFD erfolgte durch Messungen in einem Raster aus 21 gleichmäßig über den Reaktor verteilten Punkten mit orthogonaler Ausrichtung des Sensorkopfes (LI-250, LI-Cor) zur Reaktoroberfläche. Die Linearität des PFD-Signals wurde in beiden Flächenrichtungen getestet und bestätigt, so dass die auf die Oberfläche einstrahlende PFD durch Durchschnittsbildung der an den Messpunkten ermittelten Datenpunkten erfolgen konnte. Das Abgas wurde im Multor 610 System (Maihak) analysiert.

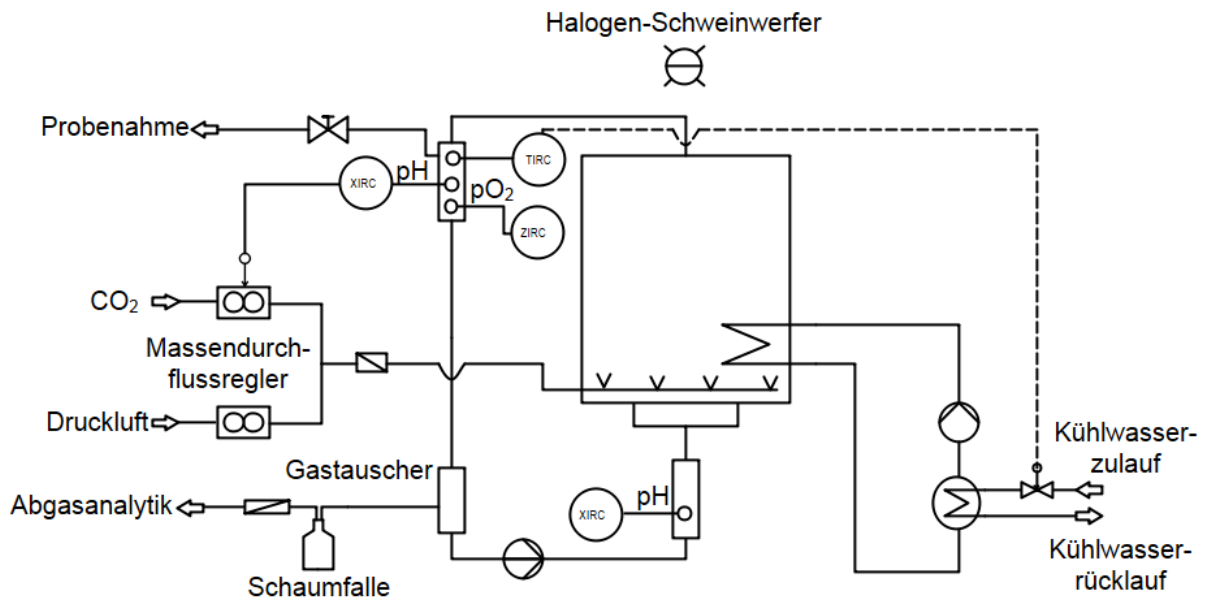


Abb. 3.7: Verfahrensfließschema zur Satzkultivierung im Wellenreaktor.

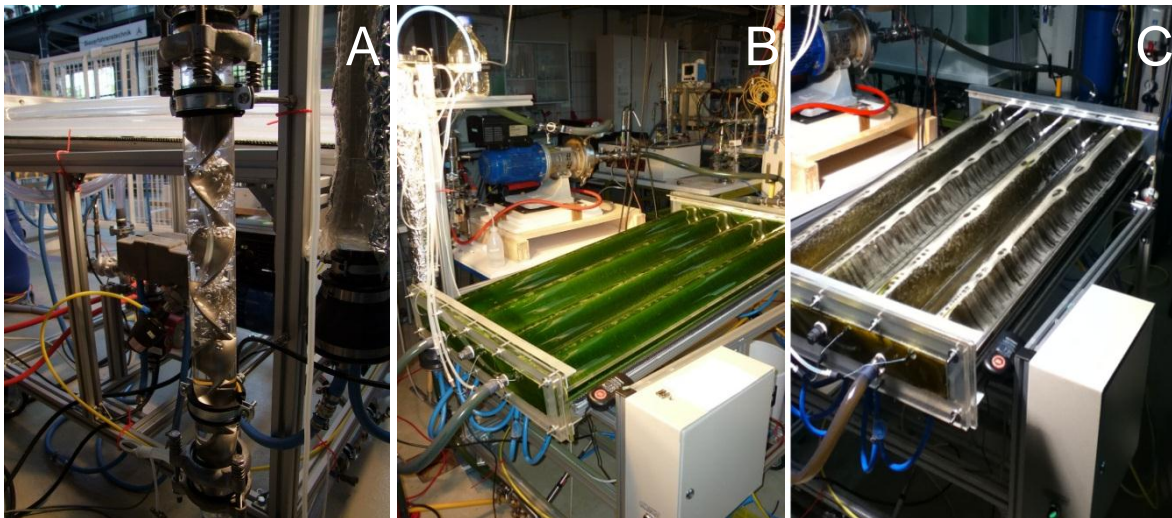


Abb. 3.8: Reaktorentwicklung und Kultivierung im Wellenreaktor. A: Gastauscher mit Begasungsfritte und statischem Mischer. B: Kultivierung von *C. vulgaris* mit Begasung in der Hauptreaktorkammer. Rechts: Satzkultivierung von *P. tricornutum*.

3.2.9 Kopplung heterotropher Hefekultivierung und phototropher Kultivierung von Algen

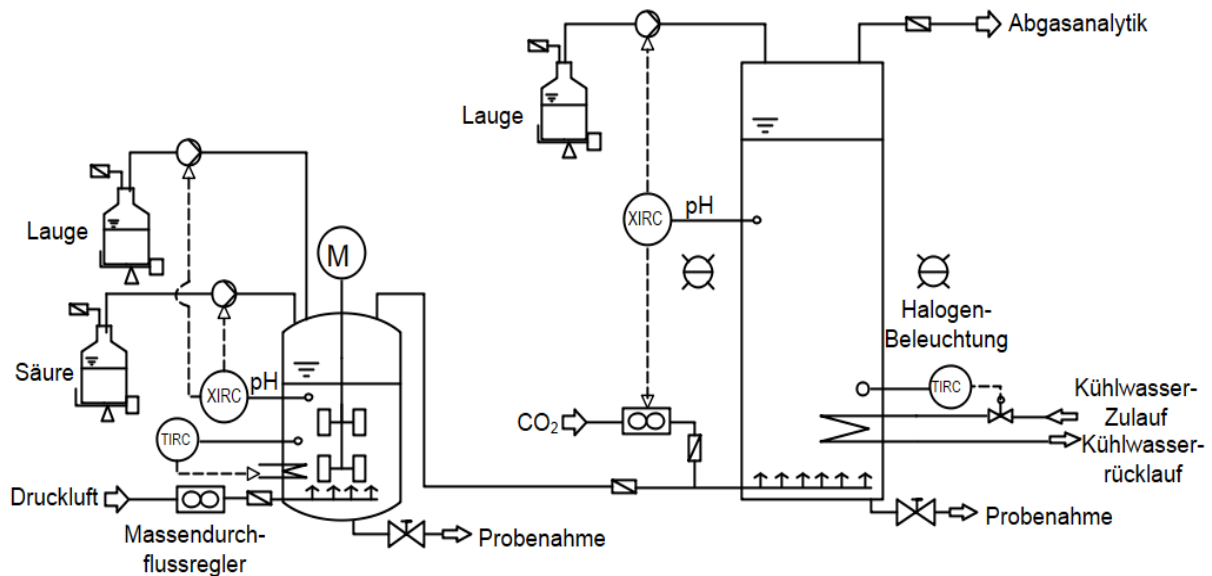


Abb. 3.9: Verfahrensfliessschema zur Kopplung heterotropher Hefefermentation und phototropher Algenkultivierung.

Zur Prozesskopplung von heterotropher Hefefermentation und phototropher Algenkultivierung zur Nutzung des im heterotrophen Prozessteil anfallenden CO_2 wurde der in Abb. 3.9 dargestellte Aufbau in Zusammenarbeit mit dem Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich II: Technische Biologie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) realisiert. Im linken Teil von Abb. 3.9 ist der Hefe-Fermenter (Minifors, Infors) mit einem Flüssigkeitsvolumen von 1,2 l zu sehen. Dieser wurde mit einem Volumenstrom von 1,2 l/min mit Druckluft begast. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von Säure und Lauge geregelt. Durch regelmäßiges Zufüttern von Glucose und zweimalig durchgeführtem Medientausch wurde die Prozessdauer der heterotrophen Kultivierung verlängert um ausreichende CO_2 -Versorgung der phototrophen Kultivierung während der gesamten Prozesslaufzeit sicherzustellen. Der Abgasstrom dieser Prozessstufe wurde durch einen Sterilfilter (Millex-FG, 0,2 μm , Millipore) geleitet und direkt zur Begasung eines Blasensäulenreaktors in einen Begasungsring des Photobioreaktors geleitet. Letzterer bestand aus einem 1300 mm langen Glaszylinder mit 300 mm Durchmesser. Der Reaktor wurde durch Kühlwasserzirkulation durch einen inneren Edelstahlzylinder gekühlt und so die Temperatur beim Sollwert von 21 °C konstant gehalten. Die Temperatur wurde dazu im Reaktorrinnen

durch ein PT100-Element gemessen. Das Kühlwasser wurde im Kreislauf durch ein Kühlaggregat (Unichiller, Huber) gekühlt. Der Reaktor wurde durch eine SIP-Anlage (Dampfgenerator DG 7/6, Zirbus) in situ autoklaviert und anschließend mit 21 l des separat in einem Kammerautoklaven (Vakulab, MMM Group) sterilisierten Mediums gefüllt. Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren auf pH 10,3 eingestellt. Er wurde während der Kultivierung mit einer Easyferm Plus 425 Sonde (Hamilton) gemessen und durch Zugabe von 4 M NaOH auf einen Sollwert von pH 7,7 geregelt. Um einem stärker schwankenden CO₂-Volumenanteil in der Begasung und den damit verbundenen Auswirkungen auf den pH-Wert im Kultivierungsmedium Rechnung zu tragen wurden durch den Regelalgorithmus Abweichungen von + 0,5 bzw. - 0,3 pH Stufen zugelassen. Zusätzlich war die Möglichkeit gegeben, zusätzliches CO₂ durch einen Massendurchflussregler in das System einzuspeisen. Die Regelung erfolgte ebenfalls über den pH-Wert, wobei eine positive Abweichungen des pH-Werts von pH 0,5 durch die Totzone des Reglers toleriert wurden. Das Abgas wurde durch einen Sterilfilter geleitet und die Volumenanteile von CO₂ und O₂ wurden im Multor 610 System (Maihak) bestimmt. Beleuchtet wurde der Blasensäulenreaktor durch 76 Halogenstrahler (Decostar 20 W, Osram). Diese waren ringförmig um den Reaktor angebracht, so dass eine möglichst gleichmäßige Ausleuchtung des Reaktionsvolumens gegeben war. Die Photonenflussdichte betrug 250 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. Um eine frühzeitige Stickstofflimitierung zu erreichen wurde das NaNO₃ im Kulturmedium auf 0,4 g/l reduziert.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Zur Ermittlung der Biotrockenmassekonzentration wurde die optische Dichte der Zellsuspension bei der Wellenlänge 750 nm in einem T60 U Spektralphotometer (PG Instruments) gemessen. In diesem Bereich ist keine spezifische Lichtabsorption durch Pigmente der Mikroorganismen zu erwarten. Demnach gibt das Signal hauptsächlich die Streuung der Zellsuspension wieder. Diese ist im Messbereich linear korreliert mit der Biomassekonzentration. Die Linearität des Messbereichs wurde experimentell überprüft und beschränkte sich auf einen Bereich bis maximal $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,5$. Traten höhere optische Dichten auf, wurden die Suspensionen verdünnt. Aus den linearen Korrelationen ergaben sich

folgende Beziehungen zur Berechnung der Biotrockenmassekonzentration c_X [g/l] aus der optischen Dichte für die verschiedenen Mikroorganismen:

$$c_X = b \cdot OD_{750nm} \quad (3.1)$$

mit $b = 0,376$ [g/l] für *P. tricornutum* (SAG 1090-1a), $b = 0,434$ [g/l] für *P. tricornutum* (SAG 1090-1b), $b = 0,305$ [g/l] für *N. salina* (SAG 40.85) und $b = 0,203$ [g/l] für *C. vulgaris* (SAG 211-12). Im Anhang (Abb. A1) sind beispielhaft Korrelationen graphisch veranschaulicht.

Zur Kalibrierung wurden die Biotrockenmassekonzentrationen von Proben unterschiedlicher optischer Dichte aus verschiedenen Wachstumsphasen bestimmt. Dazu wurden jeweils 30 ml Proben 20 min bei 7000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das jeweilige Zellsediment mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Suspension erneut zentrifugiert und das Zellsediment nach Verwerfen des Überstandes bei 80 °C zwei Tage lang getrocknet. Nach Abkühlung im Exsikkator wurde die Masse mit einer Analysewaage (ABJ 320-4, Kern) bestimmt. In weiteren Versuchen wurden kleinere Probenvolumina (jeweils 10 ml) der Zellsedimente nach gleicher Vorbereitung bei -20 °C eingefroren und gefriergetrocknet (ALPHA 1-2 LDplus, Christ). Anschließend wurde die Biomasse gravimetrisch bestimmt. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Beide angewandten Methoden waren gleichwertig und die Ergebnisse beider Methoden stimmten überein.

3.3.2 Berechnung der Wachstumsrate und der volumetrischen Produktivität

Die Wachstumsrate μ [d⁻¹] in der exponentiellen Wachstumsphase kann prinzipiell berechnet werden nach

$$\mu = \frac{\ln(c_X(t_2)) - \ln(c_X(t_1))}{t_2 - t_1} \quad (3.2)$$

$c_X(t)$ [g/l] bezeichnen die Biomassekonzentrationen zu den Zeitpunkten t [d]. Experimentell wurde die Wachstumsrate durch lineare Regression als Steigung der zeitlichen Änderung des Logarithmus naturalis der Biomassekonzentration ermittelt.

Die volumetrische Biomasse-Produktivität P_X [g/(l·d)] und die volumetrische Lipid-Produktivität P_L [g/(l·d)] im Satzbetrieb ergaben sich aus den zeitlichen Änderungen der Biomasse- bzw. Lipidkonzentration gemäß:

$$P_x = \frac{c_x(t_2) - c_x(t_1)}{t_2 - t_1} \quad (3.3)$$

und

$$P_L = \frac{c_L(t_2) - c_L(t_1)}{t_2 - t_1} \quad (3.4)$$

Die Konzentrationen der Biomasse und Lipide zu den Zeitpunkten t sind gegeben durch $c_X(t)$ [g/l] und $c_L(t)$ [g/l]. Sie wurden ebenfalls durch lineare Regression aus experimentellen Daten bestimmt.

Bei kontinuierlicher Kultivierung wurden die Biomasse- bzw. Lipid-Produktivität im Fließgleichgewicht anhand folgender Gleichungen bestimmt.

$$P_X = \frac{q}{V} (c_{X,aus} - c_{X,ein}) = D (c_{X,aus} - c_{X,ein}) \quad (3.5)$$

$$P_L = \frac{q}{V} (c_{L,aus} - c_{L,ein}) = D (c_{L,aus} - c_{L,ein}) \quad (3.6)$$

Dabei bezeichnet q [l/d] die volumetrische Flussrate und V [l] das Reaktorvolumen. Der Quotient aus beiden Größen gibt die Verdünnungsrate D [d⁻¹] des Prozesses an. $c_{X,ein}$ [g/l] und $c_{X,aus}$ [g/l] bezeichnen die Biomassekonzentration des in den Reaktor einfließenden Stromes bzw. aus dem Reaktor abfließenden Stromes. Im Fließgleichgewicht entsprechen diese Konzentrationen der Biomassekonzentration in der jeweils vorgeschalteten kontinuierlichen Prozessführungsstufe und der Biomassekonzentration in der betrachteten Reaktorstufe. Entsprechendes gilt für die Konzentrationen von Lipiden ($c_{L,ein}$ und $c_{L,aus}$). Diese Werte können aus der Biomassekonzentration und dem spezifischen Lipidanteil der Biomasse berechnet werden. Bei einem einstufigen kontinuierlichen Prozess und für die erste Stufe der kontinuierlichen Reaktorkaskade entfällt die Subtraktion von $c_{X,ein}$ und $c_{L,ein}$ in Gleichungen (3.5) und (3.6). Alle Konzentrationen in Gleichungen (3.5) und (3.6) sind Durchschnittswerte im Fließgleichgewicht. Sie wurden durch Messungen an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen ermittelt wurden.

3.3.3 Bestimmung der Pigmentkonzentrationen

Zur Quantifizierung des spezifischen Pigmentgehalts der Biomasse und der Konzentration von Chlorophyll a, Chlorophyll c und Karotinoiden wurden jeweils 2 ml Zellsuspension 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Falle von *P. tricornutum* wurde das Zellsediment eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet.

N. salina wurde nicht gesondert gefriertrocknet. Die Proben wurden in 90 % (v/v) Aceton resuspendiert und im Kugel-Homogenisator MM 300 (Retsch) nach Zugabe von vier Edelstahlkugeln (mit einem Durchmesser von 3 mm) 3 min bei 30 Hz Schüttelfrequenz aufgeschlossen. Anschließend wurden die Probengefäße 5 min auf Eis abgekühlt. Um den Zellaufschluss zu vervollständigen wurden die Proben anschließend 10 min im Ultraschallbad Sonorex RK 52 (Bandelin) inkubiert und im Anschluss direkt auf Eis abgekühlt. Durch Zentrifugieren wurde die Zelldebris vom Überstand abgetrennt. Danach wurde die Absorption des Überstands bei den Wellenlängen 664 nm und 630 nm gemessen. Als Referenz diente 90 % Aceton. Die Berechnung der Chlorophyll-Konzentrationen von *N. salina* erfolgte nach Ritchie [169]:

$$c(\text{Chl } a) = 11,4062 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot A_{664 \text{ nm}} \quad (3.7)$$

$c(\text{Chl } a)$ [g/l] ist dabei die Konzentration von Chlorophyll a in der Lösung. $A_{664 \text{ nm}}$ [-] ist die Absorption bei der Wellenlänge 664 nm. *P. tricornutum* ist gekennzeichnet durch Pigmentierung mit den Chlorophyllen a und c. Daher wurde folgende Gleichung zur Berechnung der beiden Pigmentkonzentrationen angewandt [169].

$$c(\text{Chl } a) = 11,4902 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot A_{664 \text{ nm}} - 0,4504 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot A_{630 \text{ nm}} \quad (3.8)$$

$$c(\text{Chl } c) = 22,6792 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot A_{630 \text{ nm}} - 3,4041 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot A_{664 \text{ nm}} \quad (3.9)$$

Formel (3.9) gibt die Summe der Konzentration der beiden Chlorophylle c_1 und c_2 an.

Zur Bestimmung der Konzentration von Karotinoiden, genauer Xanthophyllen und Karotenen, wurden die durch Lichtenthaler und Buschmann veröffentlichten Korrelationen angewandt [170]. Dazu wurde als Lösungsmittel 80 % (v/v) wässriges Aceton verwendet. Als Referenz diente eine klare Probe von 80 % (v/v) wässrigen Acetons. Die Absorption wurde bei 470 nm gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach der Formel

$$c(\text{Car}) = 5,0505 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot A_{470 \text{ nm}} - 0,0092 \cdot c(\text{Chl } a) \quad (3.10)$$

Es muss beachtet werden, dass die Überlappung der spektralen Absorptionsbanden von Chlorophyll c und denjenigen der Karotinoide in der Berechnung nicht berücksichtigt wird und dementsprechend die quantitativen Ergebnisse für den Karotinoidgehalt im Falle von Experimenten mit *P. tricornutum* mit geringen Fehlern behaftet sind. Auch die qualitativen Ergebnisse können durch stark schwankende Konzentrationen an Chlorophyll c beeinträchtigt

sein. Eine Korrektur ist bei *N. salina* nicht erforderlich, da diese Spezies kein Chlorophyll c aufweist.

Alle Messergebnisse sind als Durchschnittswerte von Doppelbestimmungen angegeben.

3.3.4 Bestimmung der Kohlenhydratkonzentrationen

Zur Bestimmung der Kohlenhydratkonzentration biologischer Proben wurde eine kolorimetrische Bestimmung mit dem Farbstoff 10*H*-Anthracen-9-on (Anthron) durchgeführt [171]. Dazu wurden 2 ml Proben 10 min bei 10.000 U/min zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Sedimente mit Reinstwasser (Maxima Reinstwasseranlage, Elga) verdünnt. Die Verdünnung wurde derart durchgeführt, dass die Biomassekonzentration in der Verdünnung maximal 200 mg/l betrug und damit sichergestellt wurde, dass der Kalibrierbereich nicht überschritten wurde. 400 µl der Zellsuspension wurden mit 800 µl Anthron Farbreagenz [0,1% w/v Anthron (Merck) in H₂SO₄ 96 %] gemischt und die Suspension wurde 16 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 5-minütiges Abkühlen auf Eis gestoppt. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 10.000 U/min zur Abtrennung der Zellfragmente wurde die Absorption des Überstandes bei 625nm gemessen. Die Methode wurde im Konzentrationsbereich von 20 mg/l bis 200 mg/l mit Stärke nach Zulkowsky (Merck) [172] kalibriert.

3.3.5 Messung der Anionenkonzentrationen

Die Konzentrationen der Anionen Phosphat, Sulfat und Nitrat wurden ionenchromatographisch bestimmt. Dazu wurden 2 ml Zellsuspension bei 10.000 U/min zentrifugiert und die Überstände in einer 1:10 Verdünnung in einem Ionenchromatographen (882 Compact IC plus, Metrohm), ausgestattet mit einer Metrosep A Supp 5 Säule (Metrohm) und einem Leitfähigkeitssensor, analysiert. Die Verdünnung der Proben und deren Injektion war durch die Professional Sample Processor 858 Einheit (Metrohm) automatisiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte an der stationären Phase, deren Funktionalität auf Polyvinyl-Alkohol mit quartären Ammoniumbasen zurückzuführen ist. Der Elutionspuffer war aus 3,2 mM Na₂CO₃, 1,0 mM NaHCO₃ und 12,5% (v/v) Acetonitril und Wasser zusammengesetzt.

3.3.6 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie wurde zur Identifikation und zur Quantifizierung der Fettsäuren in Extrakten aus Algenbiomasse herangezogen. Duplikate von jeweils 20 mg gefriergetrockneter (ALPHA 1-2 LDplus, Christ) Biomasseproben wurden nach dem Protokoll von Meesters et al. [173] mit Methanol verestert. Dabei wurde die Biomasse in einer Mischung aus 2 ml 15 % H₂SO₄ (v/v) in Methanol und 2 ml Hexan suspendiert. Zusätzlich wurde Methylbenzoat (FLUKA) als interner Standard in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugesetzt. Die Suspension wurde 2 h in einem Wasserbad bei einer Wasserbadtemperatur von 100 °C erhitzt und zwischenzeitlich intensiv durchmischt. Nach 5-minütigem Abkühlen im Eisbad wurde 1 ml H₂O zur Phasenseparation zugegeben und die Mischung intensiv geschüttelt. Nach Phasentrennung wurde die obere Hexan-Phase mit einer Pipette entnommen und der Analyse der Fettsäurezusammensetzung im Agilent 6890N Gaschromatographen (Agilent Technologies) zugeführt. Der Chromatograph war ausgestattet mit einer 30 m langen FAMEWAX Trennsäule (Restek) und einem Flammenionisationsdetektor. Das Temperaturprogramm startete bei 40 °C und heizte mit einer Rate von 8 °C/min bis zu einer Endtemperatur von 250 °C auf, welche bis zum Ende der Messung gehalten wurde. Zur Kalibrierung und Quantifizierung der Fettsäuren dienten die beiden Standards Marine Oil FAME Mix (Restek) und AOCS No. 3 (RM-3, Supelco).

3.3.7 Bestimmung der Gesamtlipidkonzentration

3.3.7.1 Sulpho-Phospho-Vanillin Methode

Die quantitative Lipidanalytik mittels Sulpho-Phospho-Vanillin Methode wurde nach einem modifizierten Protokoll von Gessner und Neumann [174] durchgeführt. Zur Bestimmung der Lipidkonzentration in der Lösung wurde zunächst 1 ml einer verdünnten Zellsuspension 10 min bei 11.000U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Proben wurden zuvor derart verdünnt, dass in der Suspension eine Lipidkonzentration im Kalibrierbereich von 10 µg/ml bis 120 µg/ml zu erwarten war. Die Abschätzung erfolgte auf Basis der bekannten Biomassekonzentration. Die Extraktion der Lipide in der Probe erfolgte nach der von Folch [175] beschriebenen Methode. Dabei wurde zu den Zellsedimenten 1 ml einer 1:2 (v/v) Mischung aus Chloroform und Methanol pipettiert. Zum intensiven Durchmischen unter definierten Bedingungen wurden die Proben in einem Kugel-Homogenisator MM 300

(Retsch) 1 min bei 30 Hz geschüttelt. Zur Vervollständigung der Extraktion wurden die Proben anschließend in Ultraschallbad Sonorex RK 52 (Bandelin electronic) 15 min lang inkubiert und anschließend erneut 1 min im Kugel-Homogenisator 1 min bei 30 Hz geschüttelt. Zur Unterstützung der späteren Phasentrennung wurden anschließend 0,3 ml H₂O hinzugegeben und die Proben erneut unter identischen Bedingungen im Kugel-Homogenisator durchmischt. Die vollständige Phasentrennung selbst wurde durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 11.000 U/min erreicht. Die obere Phase wurde verworfen und ein definiertes Volumen (zwischen 300 und 660 µl) der lipidhaltigen unteren Phase bei 65 °C im Wasserbad bei offenem Verschluss des Probengefäßes inkubiert bis das Lösungsmittel vollständig verdampft war. Die verbleibenden Lipide wurden nach Zugabe von 200 µl H₂SO₄ im Wasserbad bei 95 °C erhitzt. Nach exakt 15 min wurden die Proben im Wasserbad (bei Raumtemperatur) abgekühlt um die Reaktion zu stoppen. Dann wurden 2,5 ml einer Lösung aus 68 % (v/v) H₃PO₄ mit 0,12 % (w/v) Vanillin (Roth) zugegeben und. Nach exakt 65-minütiger Inkubationsdauer wurde die Absorption bei 528 nm gemessen. Die Kalibrierung der Methode wurde mit Sonnenblumenöl bzw. Rapsöl durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden als Durchschnittswerte nach Doppelbestimmung ermittelt.

3.1.7.2 Lipidquantifizierung mit Nilrot

Zur Bestimmung des Massenanteils von Lipiden an der Gesamtbiomasse wurden die Zellen - wie von Chen et al. [176] publiziert - mit Nilrot (9-Diethylamino-5-benzophenoxazinon, Sigma-Aldrich) angefärbt und anschließend wurde die Fluoreszenzemission gemessen. Stets wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Biomasseproben wurden so verdünnt, dass sie eine optische Dichte von $OD_{750nm} = 0,06$ in einer Lösung aus 25 % (v/v) wässrigem Dimethylsulfoxid (Roth) mit einer Nilrot-Konzentration von 1 µg/ml aufwiesen. Die Fluoreszenz wurde nach 10-minütiger Wartezeit bei 580 nm nach Anregung bei 490 nm in einem Aminco Bauman Series 2 Fluoreszenzspektralphotometer (Thermo Electron Corporation) gemessen. Die Quantifizierung des Lipid-Massenanteils erfolgte mittels linearer Regression aus dem auf die optische Dichte (OD_{750nm}) bezogenen spezifischen Fluoreszenzsignal und der durch Gaschromatographie ermittelten Massenanteile von Lipiden in den Biomasseproben. Für jede Messreihe wurde eine Kalibriergerade aus jeweils vier oder teilweise auch fünf Proben angefertigt. Die Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden betragen in allen Fällen $R^2 > 0,98$. Beispielhaft ist eine Kalibriergerade im Anhang (Abb. A2)

gezeigt. Schließlich wurde die Biomassekonzentration in der Zellsuspension als Produkt aus Lipid-Massenanteil und der Biomassekonzentration ermittelt.

Diese Methode erwies sich im Vergleich zur Bestimmung der Lipidkonzentration mit Sulpho-Phospho-Vanillin als geeigneter. Alle in der Arbeit ausgewiesenen Lipidkonzentrationen und Lipid-Massenanteile - soweit im Folgenden nicht anders vermerkt - wurden mit dieser Methode ermittelt.

3.3.8 Bombenkalorimetrie

Zur Bestimmung der Verbrennungsenthalpie der Algenbiotrockenmasse wurden Duplikate von jeweils 1 g Biomasse im Bombenkalorimeter vollständig oxidiert und die freigesetzte Wärmemenge gemessen. Die Analyse wurde von der DVGW Forschungsstelle, lokalisiert am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), durchgeführt.

3.4 Bestimmung des CO₂-Transportkoeffizienten

Die Bestimmung des CO₂-Transportkoeffizienten k_{1a} wurde mit Hilfe einer dynamischen Methode durchgeführt. Dazu wurde der Reaktor mit entionisiertem Wasser gefüllt und mit einem definierten Gemisch aus Luft und CO₂ und definiertem Volumenstrom begast. Nach Erreichen des Gleichgewichts wurde der CO₂-Volumenanteil sprunghaft durch Variation des CO₂-Volumenstroms verändert und die Übergangsdynamik des pH-Wertes aufgezeichnet. Aufgrund der langsameren Ansprechzeit der CO₂-Sonde wurde dabei das Signal der pH-Sonde zugrunde gelegt, um daraus die Änderung der Konzentration des gelösten CO₂ zu berechnen. Das Experiment wurde beendet sobald die neue Gleichgewichtslage erreicht bzw. das pH-Signal über einen längeren Zeitraum konstant war. Zusätzlich wurde die Zusammensetzung des Abgasvolumenstroms mit einem Multor 610 System (Maihak) gemessen um durch Konstanz der Abgaszusammensetzung das Erreichen der Gleichgewichtslage zu bestätigen. Außerdem wurde anhand der Abgaszusammensetzung der durch die Massendurchflussregler (Mass-Flo, MKS Instruments) eingestellte Volumenanteil des CO₂ im Gasstrom im Gleichgewicht überprüft. Der Übergang von CO₂ aus der Gasphase in die Flüssigphase wird durch die auf dem Zweifilmmodell [177] basierende Gleichung (3.11) beschrieben.

$$\frac{dc_{CO_2}}{dt} = k_{l,a} \cdot (c_{CO_2}^* - c_{CO_2}) \quad (3.11)$$

Dabei bezeichnet $k_{l,a}$ [s^{-1}] den Transportkoeffizienten für CO_2 , c_{CO_2} [g/l] die CO_2 -Konzentration in der Lösung und $c_{CO_2}^*$ [g/l] die Konzentration von CO_2 an der Grenzfläche zwischen Gasphase und Flüssigphase. Letztere kann durch das Henrysche Gesetz (3.12) berechnet werden.

$$c_{CO_2}^* = K_H \cdot p \cdot M_{CO_2} \cdot \frac{q_{CO_2}}{(q_{CO_2} + q_L)} \quad (3.12)$$

K_H [mol/(l·Pa)] ist der Henry-Koeffizient für CO_2 im wässrigen System bei 25 °C und beträgt $3,36 \cdot 10^{-7}$ mol/(l·Pa). p [Pa] ist der Systemdruck, der im offenen Reaktorsystem mit $1,013 \cdot 10^5$ Pa angenommen wurde, und M_{CO_2} [g/mol] die molare Masse von CO_2 . Die Volumenströme von Luft und CO_2 sind gegeben durch q_L [l/s] und q_{CO_2} [l/s].

Durch Lösen obiger Differentialgleichung (3.11) ergibt sich (3.13).

$$c_{CO_2,t+\Delta t} = \Delta c_{CO_2} \cdot (1 - e^{-k_{l,a} \cdot \Delta t}) + c_{CO_2,t} \quad (3.13)$$

Damit kann zu jedem aufgezeichneten Zeitpunkt $t + \Delta t$ die CO_2 -Konzentration $c_{CO_2,t+\Delta t}$ [g/l] aus der zuvor berechneten Konzentration $c_{CO_2,t}$ [g/l] und der Konzentrationsdifferenz Δc_{CO_2} [g/l] zwischen der Lösung und der Phasengrenzfläche (zum Zeitpunkt der sprunghaften Änderung des CO_2 -Volumenanteils) berechnet werden. Die daraus resultierende Änderung des pH-Wertes, des eigentlichen Messwertes, konnte durch die von Rubio et al. publizierte Gleichung (3.14) ermittelt werden [48]:

$$\frac{d[H^+]}{d[CO_2]} = \frac{\frac{K_1}{[H^+]} + 2 \frac{K_1 \cdot K_2}{[H^+]^2}}{1 + \frac{K_w}{[H^+]^2} + \frac{K_1 \cdot [CO_2]}{[H^+]^2} + 8 \frac{K_1 \cdot K_2 \cdot [CO_2]}{[H^+]^3}} \quad (3.14)$$

Die Gleichgewichtskonstante $K_1 = 10^{-6,381}$ [mol/l] gilt für das chemische Gleichgewicht zwischen gelöstem CO_2 (über die Zwischenstufe der Kohlensäure) und Hydrogencarbonat. $K_2 = 10^{-10,377}$ [mol/l] und $K_w = 10^{-14}$ [mol/l] beschreiben das Gleichgewicht der Dissoziation von Hydrogencarbonat zu Carbonat und einem freigesetzten Proton bzw. die Autodissoziation von Wasser. $[H^+]$ [mol/l] und $[CO_2]$ [mol/l] repräsentieren die molaren Konzentrationen von Protonen und gelöstem CO_2 .

Mit Hilfe der Modellgleichungen (3.13) und (3.14) wurde der Stoffübergang von CO_2 von der Gasphase in die Flüssigphase und die damit einhergehende Änderung des pH-Werts simuliert.

Im Zuge der Parameterkalibrierung wurden die simulierten mit experimentell ermittelten Daten verglichen. Durch Minimierung der Fehlerquadrate zwischen simulierten und experimentellen Daten nach der GRG Nonlinear Solving Method [178] wurde der Transportkoeffizient k_{ja} bestimmt.

3.5 Berechnung der Photokonversionseffizienz (PCE)

Das Wellenlängenspektrum der warmweißen LEDs der Beleuchtungseinheiten wurde durch das Lichttechnische Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) vermessen (vgl. Abb. 3.10).

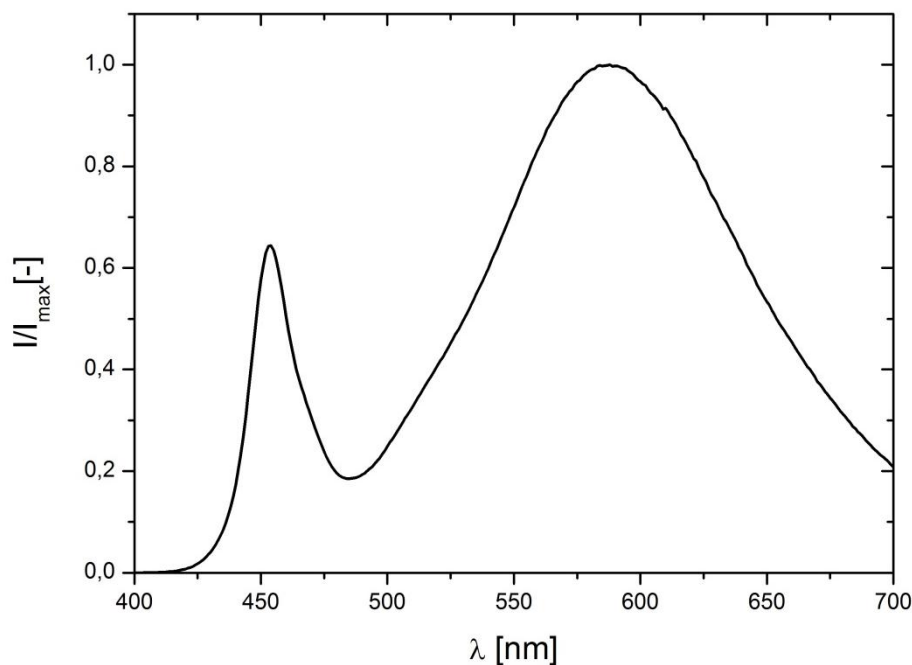


Abb. 3.10: Wellenlängenspektrum warmweißer LEDs.

Auf Grundlage dieses Spektrums konnte der durchschnittliche Energiegehalt der Photonen E_{Photon} [kJ/mol] im photosynthetisch aktiven Bereich mit

$$E_{\text{Photon}} = \frac{1}{I} \cdot \int_{400\text{nm}}^{700\text{nm}} \Phi(\lambda) d\lambda = 210,48 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \quad (3.15)$$

berechnet werden. Dabei kennzeichnet I [mol/(m²·s)] die Photonenflussdichte. $\Phi(\lambda)$ [J/(m²·s)] ist die Strahlungsleistung bei verschiedenen Wellenlängen λ [nm]. Mit 210,48 kJ/mol ist der durchschnittliche Energiegehalt der von den LEDs emittierten Photonen vergleichbar mit

demjenigen der PAR Photonen des Sonnenlichtspektrums. Letztere weisen einen durchschnittlichen Energiegehalt von 217 kJ/mol auf [34].

Die durch die Algenkulturen absorbierte Gesamtlichtenergie $E_{\text{Licht,abs}}$ [J/l] betrug

$$E_{\text{Licht,abs}} = E_{\text{Photon}} \cdot \frac{A}{V} \cdot \int_{t_0}^{t_e} (I_0(t) - I_{\text{trans}}(t)) dt \quad (3.16)$$

Dabei kennzeichnet A [m²] die beleuchtete Oberfläche des Reaktors und V [l] das Volumen der Zellsuspension. Die eingestrahlte und transmittierte Photonenflussdichten sind mit I_0 [mol/(m²·d)] und I_{trans} [mol/(m²·d)] gegeben. t_0 [d] und t_e [d] grenzen das Intervall ein, in welchem die PCE bestimmt wurde. I_0 [$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] wurde vor der Kultivierung in Midi-Plattenreaktoren im Inneren des Reaktors hinter der Frontglasscheibe gemessen. Dagegen wurde die PFD des transmittierten Lichts I_{trans} [$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] während der Kultivierung zu den Zeitpunkten der Probenahme an der Rückseite des Reaktors gemessen. Zur Berechnung der PCE im Rührkesselreaktor wurde vollständige Lichtabsorption angenommen. I_0 ergab sich aus der Kalibrierung der Lichtintensität des Reaktors.

Da I_0 während der gesamten Kultivierungsdauer konstant war und die zeitlichen Änderungen von $I_{\text{trans}}(t)$ vernachlässigbar waren, konnte Gleichung (3.16) vereinfacht werden zu

$$E_{\text{Licht,abs}} = E_{\text{Photon}} \cdot \frac{A}{V} \cdot (I_0 - I_{\text{trans}}) \cdot \Delta t \quad (3.17)$$

Die Reflektion an den Oberflächen der Reaktoren wurde durch die Methode der Messung von I_0 bereits berücksichtigt. Dagegen wurde die Reflektion der Algenkulturen selbst aufgrund ihres geringen Effektes vernachlässigt. Auch die Änderungen des durchschnittlichen Energiegehalts der einfallenden und transmittierten Photonen wurden betrachtet, jedoch ergaben Berechnungen eine Änderung von weniger als 1 %; daher wurde dieser Effekt in den Bestimmungen der PCE vernachlässigt.

Der Energiegehalt bzw. die Verbrennungsenthalpie neu synthetisierter Biomasse E_x [J/l] wurde mit

$$E_x = \int_{t_0}^{t_e} [P_L(t) \cdot \Delta H_{c,L}^0 + (P_x(t) - P_L(t)) \cdot \Delta H_{c,x'}^0] dt \quad (3.18)$$

berechnet. $\Delta H_{c,L}^0$ [J/g] und $\Delta H_{c,x'}^0$ [J/g] sind die Verbrennungsenthalpien von Lipiden und der verbleibenden lipidfreien Biomasse.

Aufgrund der Tatsache, dass P_L und P_x im Zeitintervall der PCE-Berechnung konstant waren, konnte das Integral gelöst werden:

$$E_x = [P_L \cdot \Delta H_{c,L}^0 + (P_x - P_L) \cdot \Delta H_{c,x'}^0] \cdot \Delta t \quad (3.19)$$

Letztendlich konnte die PCE berechnet werden mit:

$$PCE = \frac{E_x}{E_{Licht,abs}} \cdot 100\% \quad (3.20)$$

3.6 Simulation mit Matlab

Die Simulation des Metabolismus von *P. tricornutum* und der CO₂-Regelalgorithmus wurden in Matlab R2012a (MathWorks Inc., USA) programmiert. Die Minimierung der Fehlerquadrate zur Parameteranpassung beim Vergleich von simulierten und experimentellen Daten wurde mit dem in der Matlab-Funktion „fminsearch“ integrierten Nelder-Mead Algorithmus [179] durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Effizienz der Lipidsynthese durch Mikroalgen

4.1.1 Lipidakkumulation von *P. tricornutum* unter Nährstoffmangel

Satzkultivierungen mit der Alge *P. tricornutum* wurden im Modell-Photobioreaktor bei einer PFD von $168 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ durchgeführt um die Effekte von Stickstofflimitierung und Phosphorlimitierung auf die Speicherlipidakkumulation zu vergleichen. Ferner wurde der Einfluss der Limitierung auf die Zusammensetzung der Lipide untersucht. Die Kultivierungsbedingungen sind in Kapitel 3.2.7 beschrieben. Die Medienkomposition unterschied sich in den durchgeführten Experimenten lediglich in Bezug auf die Konzentrationen der Salze NaNO_3 und K_2HPO_4 . Als Vergleichsbasis wurde versucht gleiche Biomassekonzentrationen zu Beginn der Nährstofflimitierung in den zwei Experimenten mit $0,65 \text{ g/l NaNO}_3$ und $0,20 \text{ g/l K}_2\text{HPO}_4$ (Abb. 4.1 b) bzw. $1,54 \text{ g/l NaNO}_3$ und $0,05 \text{ g/l K}_2\text{HPO}_4$ (Abb. 4.1 c) einzustellen. Zur Berechnung wurden Literaturdaten für die Ausbeutekoeffizienten bzw. den Stickstoff- und Phosphatanteil (8,7 % bzw. 0,7 %) von Biomasse zugrunde gelegt [180]. In beiden Experimenten sollte eine Biomassekonzentration von ca. $1,2 \text{ g/l}$ vor Eintritt in die Nährstofflimitierung erreicht werden. Zudem wurde eine dritte Kultivierung mit $0,40 \text{ g/l NaNO}_3$ und $0,20 \text{ g/l K}_2\text{HPO}_4$ durchgeführt (Abb. 4.1 a) um den Einfluss der Stickstoffkonzentration auf die Speicherlipidakkumulation im direkten Vergleich der beiden stickstofflimitierten Experimente zu untersuchen.

Zunächst wurde in allen Experimenten exponentielles Wachstum beobachtet. Durch ionenchromatographische Bestimmung von Nitrat konnte in beiden stickstofflimitierten Experimenten gezeigt werden, dass die Limitierung zwischen Tag 6 und 7 eintrat (Abb. 4.1 a bzw. b). Eine Phosphorlimitierung konnte ausgeschlossen werden, da Phosphat im Überschuss vorhanden war. Dies wurde aus dem von Williams und Laurens publizierten Phosphatgehalt von Biomasse [180] berechnet. Beim Übergang in die nährstofflimitierte Wachstumsphase war erkennbar, dass das weitere Wachstum linear verlief und die Lipidkonzentration schneller zunahm als in der vorangehenden exponentiellen Wachstumsphase. Im Falle der Phosphorlimitierung war der Übergang in die Nährstofflimitierung insbesondere am plötzlichen Anstieg der volumetrischen Lipid-

Produktivität an Tag 7,5 (Abb. 4.1 c) erkennbar. Weil *P. tricornutum* Phosphat intrazellulär speichern kann [181], konnte die ionenchromatographische Bestimmung von Phosphat im Medium nicht zur Verifizierung der Phosphorlimitierung herangezogen werden. Es war erkennbar, dass keine Stickstofflimitierung eingetreten war, da bis zum Ende der Kultivierung die Nitratkonzentration im Medium größer als 0,1 g/l war.

Bei Eintritt der jeweiligen Nährstofflimitierung betragen die Biomassekonzentrationen ca. 0,7 g/l in Experiment a (Abb. 4.1 a), ca. 1,2 g/l in Experiment b (Abb. 4.1 b) und ebenfalls ca. 1,2 g/l in Experiment c (Abb. 4.1 c). Damit war es möglich die Limitierung von Stickstoff und Phosphor in den Experimenten b und c direkt zu vergleichen. Zudem war die Untersuchung des Einflusses der Stickstoffkonzentration auf die Lipidakkumulation durch Vergleich der Experimente a und b möglich. Zur Beurteilung der Effektivität der Limitierungs-Strategie wurde die volumetrische Biomasse-Produktivität P_X und die volumetrische Lipid-Produktivität P_L herangezogen. Die volumetrische Produktivität wurde dabei - wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben - jeweils in der linearen Wachstumsphase bestimmt. Durch die Weiterentwicklung der Lipidanalytik im Vorfeld des Experimentes ist es dabei gelungen die volumetrische Lipid-Produktivität durch viele Einzelmessungen mit hoher Genauigkeit zu bestimmen. Dazu wurde zunächst die Fluoreszenzintensität der mit Nilrot angefärbten Proben in geringen Probenvolumina gemessen. Messungen des Lipid-Massenanteils, im Folgenden auch als spezifischer Lipidgehalt (w/w) bezeichnet, mittels Gaschromatographie wurden zudem mit den Fluoreszenzmessungen korreliert. Mit Hilfe der Kalibriergeraden konnte der spezifische Lipidgehalt der angefärbten Proben berechnet werden. Die Methode ist in Abschnitt 3.1.7.2 detailliert beschrieben.

Die volumetrische Biomasse-Produktivität war im Falle der Stickstofflimitierung mit 186 mg/(l·d) höher als bei der Phosphorlimitierung mit 107 mg/(l·d). Auch die Lipid-Produktivität war mit 162 mg/(l·d) bei der Limitierung von Stickstoff höher als diejenige bei Limitierung von Phosphor mit 98 mg/(l·d).

Beim direkten Vergleich der Experimente a und b zeigte sich, dass bei geringerer Nitrat-Einwaage auch eine geringere volumetrische Biomasse-Produktivität mit 176 mg/(l·d) erzielt wurde. Die volumetrische Lipid-Produktivität war mit 149 mg/(l·d) ebenfalls geringer. Tabelle 4-1 fasst die Ergebnisse zusammen.

Insgesamt zeigte sich anhand der volumetrischen Produktivitäten die Vorteilhaftigkeit der Stickstofflimitierung zur Induktion der Speicherlipidakkumulation. Daher wurde diese Strategie weiterverfolgt.

Tabelle 4-1: Volumetrische Biomasse- bzw. Lipid-Produktivität (P_X bzw. P_L) bei Stickstoff- und Phosphorlimitierung.

Experiment	C_{NaNO_3} [g/l]	$C_{K_2HPO_4}$ [g/l]	P_X [mg/(l·d)]	P_L [mg/(l·d)]	$C_{Chla,max}$ [mg/l]
a (Abb. 4.1 a)	0,40	0,20	176	149	13
b (Abb. 4.1 b)	0,64	0,20	186	162	14
c (Abb. 4.1 c)	1,54	0,05	107	98	26

Die spezifischen Massenanteile der Lipide stiegen in allen Experimenten auf Werte um 61 % bis 63 %. Die maximal gemessenen Konzentrationen von Chlorophyll a waren in den beiden stickstofflimitierten Versuchen vergleichbar mit 13 bis 14 mg/l, jedoch mit 26 mg/l in dem phosphorlimitierten Experiment deutlich höher (Tabelle 4-1).

Zur Untersuchung des Einflusses der Nährstofflimitierung auf die Fettsäurezusammensetzung wurden Lipide aus Biomasseproben extrahiert, die Fettsäuren mit Methanol verestert und anschließend gaschromatographisch quantifiziert. Die Proben wurden jeweils vor bzw. zu Beginn der Nährstofflimitierung und mehrfach im Laufe der weiteren Kultivierung, d. h. während der Speicherlipidakkumulation, aus dem Kulturvolumen entnommen. Es zeigte sich, dass die Fettsäuren Myristinsäure (C14:0), Palmitinsäure (C16:0), Palmitoleinsäure (C16:1), Ölsäure (C18:1), Linolsäure (C18:2), Arachidonsäure (C20:4) und Eicosapentaensäure (C20:5 ($\omega-3$), hier kurz als C20:5 bezeichnet) zusammen etwa 90 % der gesamten Fettsäuren repräsentierten. Die prozentualen Anteile der Fettsäuren C14:0, C18:1, C18:2 und C20:4 änderten sich im Verlaufe der Lipidakkumulation lediglich wenig. C16:1 war die häufigste Fettsäure im Fettsäureprofil von *P. tricornutum* und deren Gehalt nahm im Verlauf der Nährstofflimitierung deutlich zu. Er steigerte sich von ca. 30 % auf über 45 %. Ebenfalls nahm der Anteil an C16:0 weiter zu. Dagegen reduzierte sich der Anteil der kommerziell interessanten Eicosapentaensäure (C20:5) [132] von anfänglich ca. 24 % auf Werte unter 15 %. Trotz der sinkenden Massenanteile der Eicosapentaensäure fand in allen Experimenten eine weitere Synthese dieser Fettsäure mit einer volumetrischen Produktivität von ca. 10 mg/(l·d) statt.

Die Experimente zeigten, dass der generelle Trend der Veränderungen des Fettsäurespektrums unabhängig von der Art der Nährstofflimitierung war.

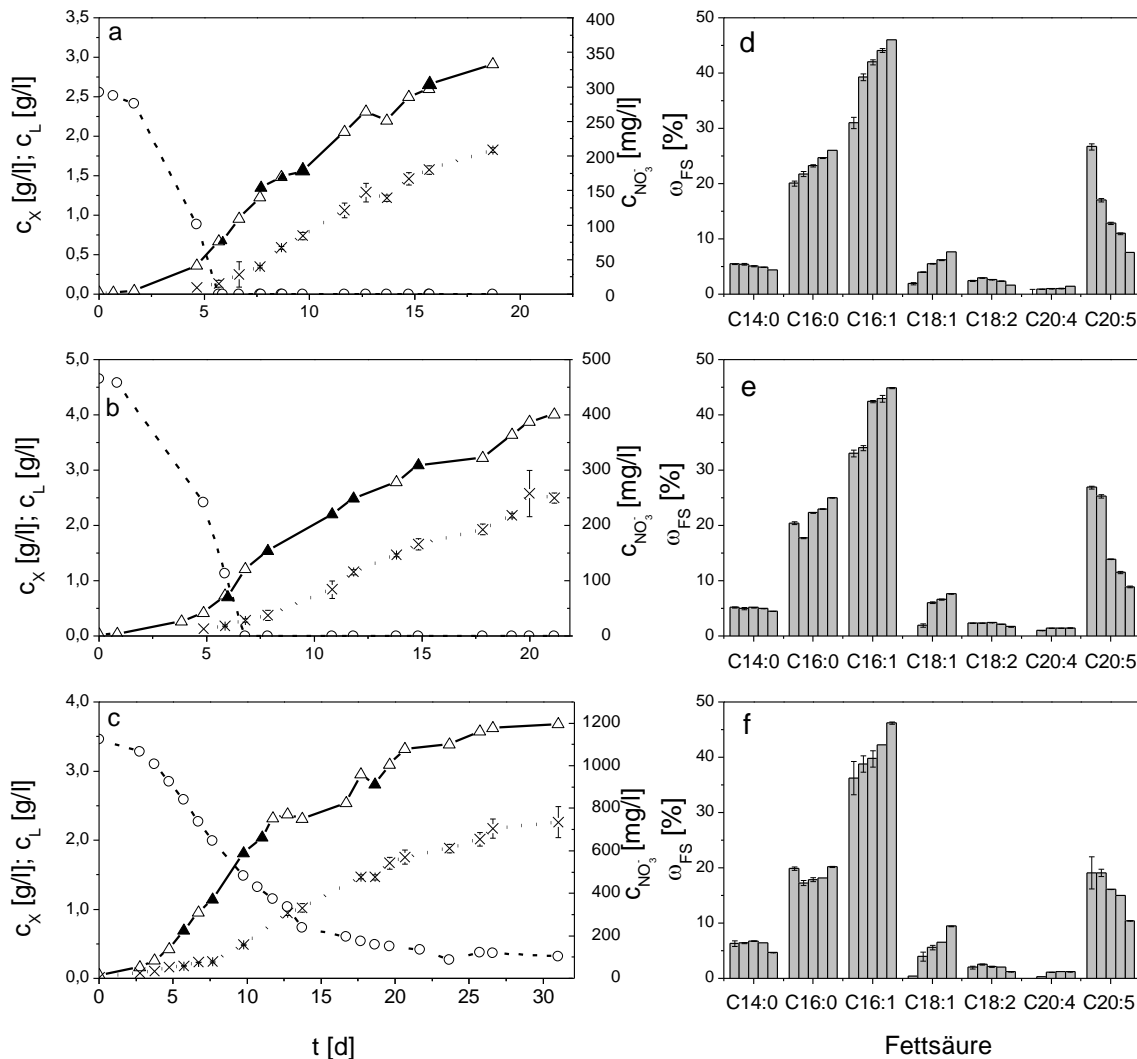


Abb. 4.1: Vergleich des Einflusses von Phosphor- und Stickstofflimitierung auf die Speicherlipidakkumulation und Fettsäurezusammensetzung von *P. tricornutum*. Δ : Biomassekonzentration c_X ; \times : Lipidkonzentration c_L ; \circ : Nitratkonzentration $c_{NO_3^-}$; ω_{FS} : Massenanteil der gegebenen Fettsäure am Gesamtlipidgehalt. a+d: Experiment mit 0,40 g/l $NaNO_3$ Einwaage; b+e: 0,64 g/l $NaNO_3$ Einwaage; c+f: Phosphorlimitierung mit 1,54 g/l $NaNO_3$ und 0,05 g/l K_2HPO_4 Einwaage. Die Fettsäureprofile zeigen die zeitliche Variation der Lipidzusammensetzung. Die Zeitpunkte der Probenahme sind durch ausgefüllte Symbole in den zugehörigen Wachstumskurven (\blacktriangle) markiert.

4.1.2 Einfluss der Lipidakkumulation auf die Verbrennungsenthalpie von Biomasse

Im Zuge der Akkumulation von Speicherlipiden mit hoher Energiedichte war zu erwarten, dass sich die Verbrennungsenthalpie der Biomasse durch Veränderung der makromolekularen Zusammensetzung der Biomasse erhöht. Zur Bestimmung der Effizienz war es erforderlich die Veränderung der Verbrennungsenthalpie als Folge der Nährstofflimitierung und der damit verbundenen Anreicherung von TAGs zu quantifizieren. Zur experimentellen Bestimmung wurden zwei phototrophe Kultivierungen im Rührkesselreaktor durchgeführt, wobei eine der Kulturen stickstofflimitiert war. Bei der anderen Kultur konnte durch Nachfütterung von Nitrat, Sulfat und Phosphat eine Nährstofflimitierung ausgeschlossen werden. Die Biomassen beider Experimente wurden geerntet und der Massenanteil der Lipide wurde mittels Gaschromatographie ermittelt. Außerdem wurde die Verbrennungsenthalpie beider Proben im Bombenkalorimeter gemessen. Die stickstofflimitierte Kultur wies zum Erntezeitpunkt einen Lipidgehalt von 54,7 % mit einer Verbrennungsenthalpie von 26,70 kJ/g auf. Die unlimitierte Kultur zeigte einen Lipidgehalt von 18,1 % und eine Verbrennungsenthalpie von 20,60 kJ/g. Anhand beider Messungen konnte die Verbrennungsenthalpie der Lipide $\Delta H_{c,L}^0$ [J/g] und der lipidfreien Restbiomasse $\Delta H_{c,x'}^0$ [J/g] mit den Gleichungen (4.1) und (4.2) bestimmt werden.

$$\Delta H_c^0 = w_L \cdot \Delta H_{c,L}^0 + (1 - w_L) \cdot \Delta H_{c,x'}^0 \quad (4.1)$$

$$\Delta H_{c,L}^0 = \frac{\Delta H_{c,1}^0 \cdot (1 - w_{L,2}) - \Delta H_{c,2}^0 \cdot (1 - w_{L,1})}{w_{L,1}(1 - w_{L,2}) - w_{L,2}(1 - w_{L,1})} \quad (4.2)$$

Dabei bezeichnet ΔH_c^0 [J/g] die Verbrennungsenthalpie der Biomasse. w_L [g/g] ist der Massenanteil von Lipiden in Biomasse. Die Indizes in Gleichung (4.2) repräsentieren Messwerte aus den beiden Experimenten.

Mit Gleichung (4.2) konnte eine Verbrennungsenthalpie von $\Delta H_{c,L}^0 = 34,24$ kJ/g für Lipide und durch Lösen von Gleichung (4.1) eine Verbrennungsenthalpie von $\Delta H_{c,x'}^0 = 17,58$ kJ/g für die lipidfreie Restbiomasse ermittelt werden.

Obwohl grundsätzlich eine Veränderung der Fettsäurezusammensetzung und der makromolekularen Zusammensetzung der lipidfreien Restbiomasse Einfluss auf die

Verbrennungsenthalpie nehmen kann, konnte angenommen werden, dass die Effekte für die Berechnung der PCE (siehe Kapitel 3.5) vernachlässigbar waren.

4.1.3 Entwicklung einer Methodik zur Bestimmung der PCE auf Basis der Energiebilanzierung

Zur Ermittlung der PCE der Lipidbildung bei Kultivierungen von Mikroalgen unter Nährstofflimitierung wurde eine Methodik entwickelt, die auf der Bilanzierung der von den Kulturen absorbierten Lichtenergie und der Verbrennungsenthalpie neu gebildeter Biomasse basiert. Die Berechnungsgrundlage zur Bestimmung der PCE ist in Kapitel 3.5 erläutert und basiert insbesondere auf den Gleichungen (3.15) bis (3.20). Zur Erläuterung ist in Abb. 4.2 die Satzkultivierung von *P. tricornutum* in einem Midi-Plattenreaktor dargestellt. Vorteilhaft war dieses Reaktorsystem durch die Möglichkeit nicht nur die PFD des eingestrahlten Lichts genau zu messen, sondern auch zu Zeitpunkten der Probenahme die PFD des transmittierten Lichts messen zu können. Unter Berücksichtigung der spektralen Eigenschaften der Lichtquelle (siehe Gleichung (3.15)) konnte somit die durch die Zellsuspension absorbierte Energiemenge exakt bilanziert werden. In dem dargestellten Experiment wurde eine NaNO_3 -Konzentration von 1,2 g/l im Medium vorgelegt. Die PFD des eingestrahlten Lichts betrug $201 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$.

Die Biomasse wuchs nach einer ca. eintägigen lag-Phase in den ersten 10,5 Tagen exponentiell. Dabei wurde eine kontinuierliche Abnahme der Nitratkonzentration gemessen, bis das Nitrat vollständig durch die Zellen aufgenommen war. In dieser Phase reduzierte sich auch die PFD des transmittierten Lichts signifikant. Nach dem Einsetzen der Lipidakkumulation betrug die durchschnittliche PFD des transmittierten Lichts weniger als $5 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. Während der exponentiellen Wachstumsphase waren die Massenanteile von Lipiden und Kohlenhydraten niedrig. Diese betragen ca. 13 % bzw. 24 %. Mit den eingesetzten analytischen Methoden zur Quantifizierung des Lipid- bzw. Kohlenhydratgehalts konnte keine Unterscheidung zwischen Membranlipiden und Speicherlipiden bzw. zwischen funktionellen/strukturellen Kohlenhydraten und dem Kohlenhydratspeicher getroffen werden. Dennoch kann angenommen werden, dass in der exponentiellen Phase keine Speicherstoffe in der Biomasse vorhanden waren. Ab Tag 11 der Kultivierung waren die Zellen stickstofflimitiert. Dies wurde durch Messungen der Konzentrationen der Nitrat-Anionen im Medium bestätigt. Ab diesem Zeitpunkt wuchs die Biomasse linear weiter. Auch die

Lipidkonzentration zeigte einen linearen Anstieg in den Folgetagen. Ab Tag 21 ist anhand des stagnierenden Biomassewachstums die stationäre Phase zu erkennen. Während der Kohlenhydratgehalt in der exponentiellen Phase ein Minimum von 13 % zeigte, stieg dieser in der Limitierung bis auf 36 % an. Ebenso stieg der Lipidgehalt von ca. 24 % auf 52 % zum Ende der Kultivierung an. Die Kohlenhydrat-Konzentration wuchs von 0,3 g/l auf 1,7 g/l an. Damit stieg diese um den Faktor 6. Die Konzentration von Lipiden stieg während der Limitierung von ursprünglich 0,4 g/l um den Faktor 8 bis auf eine Endkonzentration von 3,2 g/l.

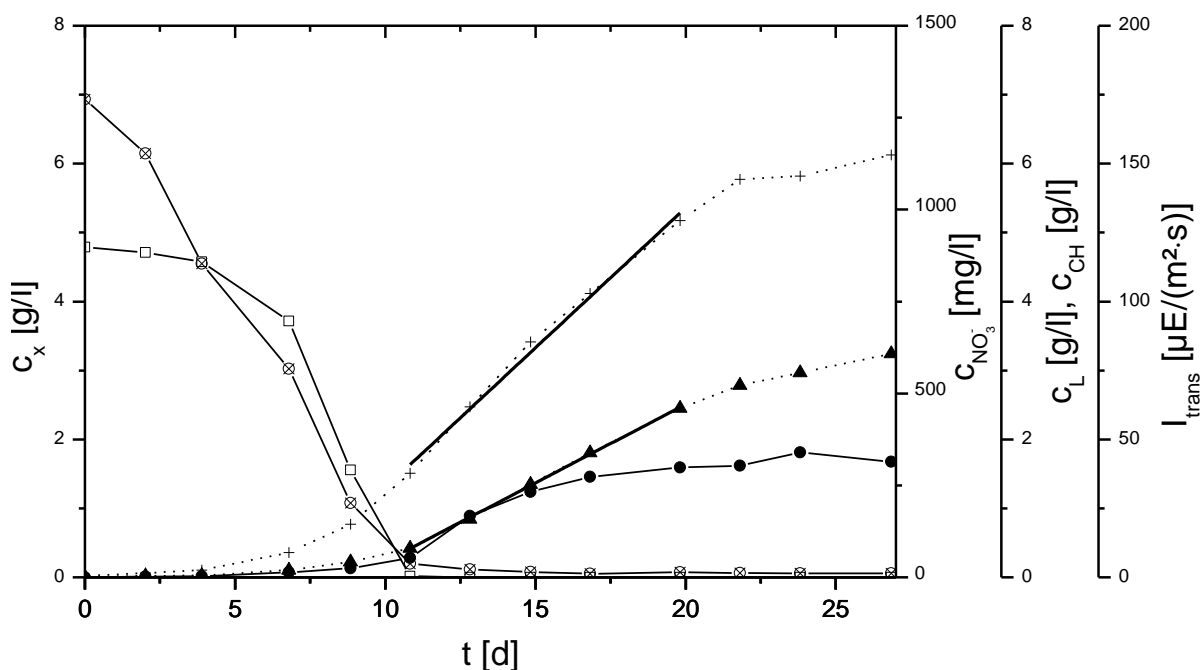


Abb. 4.2: Bestimmung der volumetrischen Produktivität von Biomasse und Lipiden zur Berechnung der PCE bei Speicherlipidakkumulation. +: Biomassekonzentration c_x ; ●: Kohlenhydratkonzentration c_{CH} ; ▲: Lipidkonzentration c_L ; ⊕: PFD des transmittierten Lichts I_{trans} ; □: Nitratkonzentration $c_{NO_3^-}$. Die linearen Korrelationen zur Bestimmung der Produktivität sind von Tag 10,5 bis Tag 20 gezeigt.

Die PCE wurde zwischen Tag 10,5 und Tag 20 bestimmt. In diesem Bereich war die volumetrische Lipid-Produktivität konstant und betrug 199 mg/(l·d). Die volumetrische Biomasse-Produktivität war 377 mg/(l·d) und ebenfalls konstant. Nach dem 20. Tag sanken beide Werte und damit auch die PCE. Die Berechnung der PCE wurde auf die vorhergehende Periode beschränkt, in der auch die Produktivitäten maximal waren. Auch ein technischer Prozess würde bei sinkender Effizienz bzw. kurz nach Überschreiten der maximalen Raum-Zeit-Ausbeute beendet. Die PFD des eingestrahlt Lichts war 201 $\mu E/(m^2 \cdot s)$. Wie die

durchschnittliche PFD des transmittierten Lichts von $2 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ im betrachteten Zeitraum anzeigte, absorbierte die Kultur somit $199 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ des einfallenden Lichts. Mit einem Energiegehalt der Photonen der LED Lichtquelle von $E_{\text{photon}} = 210,48 \text{ kJ/mol}$ und einer beleuchteten Oberfläche von $0,05 \text{ m}^2$ betrug die täglich absorbierte Lichtenergie $E_{\text{Licht,abs}} = 180,1 \text{ kJ/l}$. Mit Gleichung (3.19) und den Messwerten der volumetrischen Produktivitäten wurde die Verbrennungsenthalpie der täglich neu gebildeten Biomasse im betrachteten Zeitraum berechnet. Diese betrug $E_x = 9,94 \text{ kJ/l}$. Die PCE war damit $5,4 \%$.

4.1.4 Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf die Effizienz der Lipidbildung

Zur Untersuchung des Einflusses der Nitratkonzentration auf die Effizienz der Lipidbildung wurden sechs Experimente in Midi-Plattenreaktoren durchgeführt. Der Fokus der Experimente lag auf der physiologischen Kapazität der Zellen Lichtenergie zum Aufbau organischer Verbindungen - also zur Synthese von Lipiden und Biomasse - zu nutzen. Erwartungsgemäß wird die Biomassekonzentration zu Beginn der Nährstofflimitierung durch die Verfügbarkeit des limitierenden Elements im Medium bestimmt. Demnach sollte durch Variation der Stickstoffverfügbarkeit überprüft werden, inwiefern die Effizienz der Lipidsynthese durch die Absorptionseigenschaften bestimmt wird und ob weitere physiologische Restriktionen diese beeinflussen.

Es wurden Experimente im Satzbetrieb durchgeführt, wobei die Konzentration von NaNO_3 im Kulturmedium in einem Bereich von $0,2 \text{ g/l}$ bis $1,7 \text{ g/l}$ variiert wurde. Die PFD des eingestrahnten Lichts I_0 wurde über die Stromstärke auf einen Wert von $200 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ eingestellt. Die tatsächlichen Werte für I_0 wichen leicht von dieser Vorgabe ab und wurden durch exakte Messung bestimmt. Die genauen Werte für alle Einzelexperimente und die zugehörigen Nitrat-Einwaagen sind in Tabelle 4-2 angegeben. Um die Limitierung infolge des Mangels an Phosphor oder Schwefel zu verhindern wurde nach 9 Tagen zusätzlich 5 ml einer Lösung aus $35 \text{ g/l K}_2\text{HPO}_4$ und $144 \text{ g/l MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ zugegeben, sofern die NaNO_3 -Startkonzentration höher als $1,5 \text{ g/l}$ war. Sowohl die volumetrische Biomasse- und Lipid-Produktivität als auch die PCE wurden wie zuvor beschrieben ermittelt. Außerdem wurde zu allen Zeitpunkten der Probenahme die PFD des transmittierten Lichts gemessen. Während der Speicherlipidakkumulation war die Intensität des transmittierten Lichts annähernd konstant und es wurden Durchschnittswerte berechnet. Die Wachstumskurven der einzelnen Experimente sind in Anhang A 3 abgebildet.

Tabelle 4-2: Volumetrische Produktivitäten, spezifische Syntheseraten und Effizienz bei Variation der NaNO_3 -Konzentration im Nährmedium. P_X , P_L : Biomasse- bzw. Lipid-Produktivität; r_X , r_L : spezifische Biomasse- bzw. Lipidbildungsrate; c_{NaNO_3} : NaNO_3 -Startkonzentration; I_0 : PFD des eingestrahlt Lichts.

I_0	c_{NaNO_3}	P_L	r_X	P_L	r_L	PCE [PAR]
[$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]	[g/l]	[mg/(l·d)]	[mg/(g·d)]	[mg/(l·d)]	[mg/(g·d)]	[%]
185	0,24	112	370	59	193	2,48
193	0,56	235	331	129	182	3,77
201	0,83	310	374	183	220	4,38
201	1,23	377	331	199	174	5,48
193	1,56	397	214	175	94	5,65
201	1,72	393	178	167	75	5,32

Sowohl die volumetrische Biomasse-Produktivität als auch die volumetrische Lipid-Produktivität stiegen mit steigender NaNO_3 -Konzentration an (Abb. 4.3). Dabei wurde eine Steigerung um einen Faktor 3,5 zwischen der höchsten Biomasse-Produktivität von 397 mg/(l·d) bei 1,59 g/l NaNO_3 und der geringsten Produktivität von 112 mg/(l·d) bei 0,24 g/l NaNO_3 gemessen. Auch die Lipid-Produktivität ist mit dem Maximalwert von 199 mg/(l·d) um einen Faktor von 3,4 höher als bei der geringsten NaNO_3 -Startkonzentration im Medium mit einem Wert von 59 mg/(l·d). In den beiden Experimenten mit der höchsten Stickstoffverfügbarkeit sank die Lipid-Produktivität im Vergleich zum Maximalwert von 199 mg/(l·d) wieder leicht ab. Die durchschnittliche Transmission sank von ca. 66 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ mit steigender NaNO_3 -Konzentration stetig ab. Bei den drei Experimenten mit den höchsten NaNO_3 -Konzentrationen wurde das eingestrahlt Licht fast vollständig absorbiert. Die PCE stieg mit der NaNO_3 -Konzentration im Medium an und zeigte eine Steigerung um einen Faktor 2,3 beim Vergleich der höchsten PCE mit 5,56 % bei 1,56 g/l NaNO_3 im Vergleich zur geringsten PCE von 2,48 % bei 0,24 g/l NaNO_3 . Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

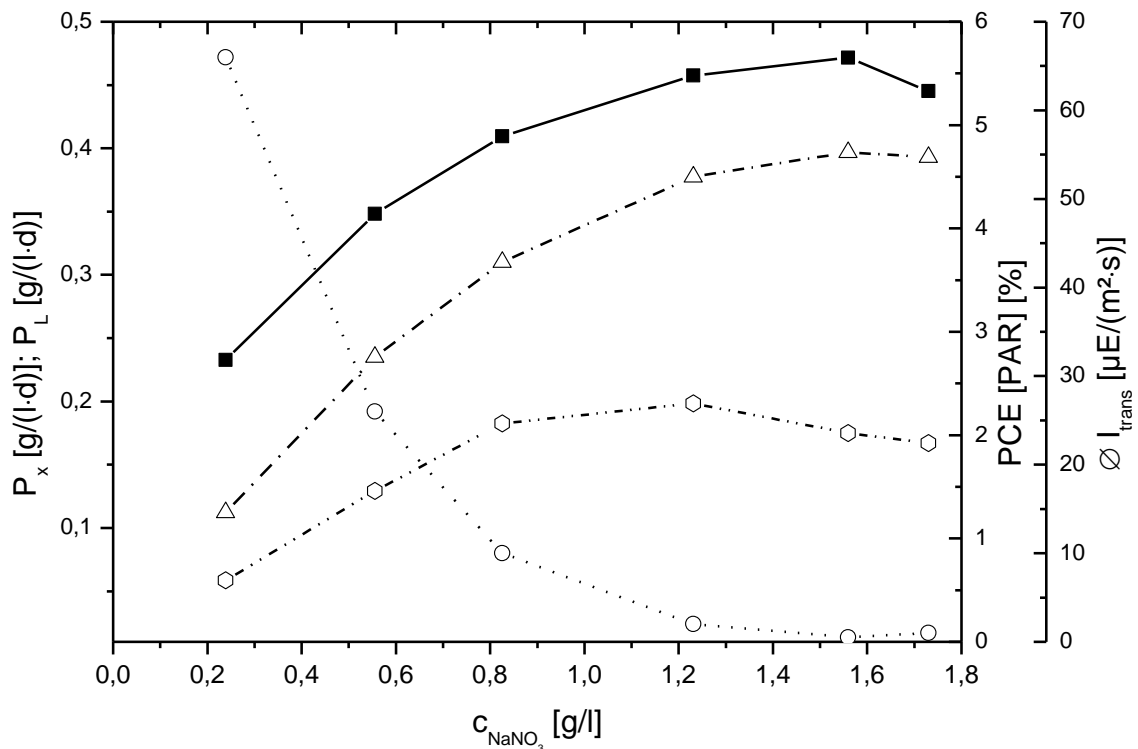


Abb. 4.3: Einfluss der NaNO_3 -Konzentration auf die volumetrische Produktivität und PCE bei Speicherlipidakkumulation. \circ : durchschnittliche Transmission $\text{Ø}I_{\text{trans}}$; Δ : volumetrische Biomasse-Produktivität P_x ; \diamond : volumetrische Lipid-Produktivität P_L ; \blacksquare : PCE [PAR]; c_{NaNO_3} : NaNO_3 -Startkonzentration zu Beginn der Kultivierung.

4.1.5 Untersuchung der Ursachen steigender Produktivität und Effizienz bei höherer Verfügbarkeit von Stickstoff im Kulturmedium

Zur Untersuchung der Ursachen steigender Produktivität und Effizienz der Lipidbildung bei Stickstofflimitierung mit steigender Verfügbarkeit des limitierenden Elements wurde sowohl der Einfluss auf die Konzentration der speicherstofffreien Biomasse als auch die Produktbildungskinetik in Betracht gezogen. Ähnlich der Zuordnung des kompletten Zellkohlenstoffs zu einem Pool aus funktionellen Molekülen oder Speichermolekülen durch Ross und Geider [182] wurde die Biomasse, die weder Speicherlipide noch Reservekohlenhydrate enthält, im Folgenden als aktive Biomasse bezeichnet. Während die Konzentration aktiver Biomasse $c_{x,a}$ in der Phase des nicht-nährstofflimitierten Wachstums zunimmt, stagniert das Wachstum bei Nährstofflimitierung. Dennoch steigt die

Biotrockenmassekonzentration weiter an, da Kohlenhydrate und Lipide gebildet werden und zur Erhöhung der Biomassekonzentration c_X beitragen. Die letztere wurde in den Experimenten direkt gemessen und ist in den entsprechenden Abbildungen gezeigt. Zugleich sinkt in dieser Phase bei Stickstofflimitierung der spezifische Proteingehalt der Biomasse [80], da die Synthese dieser molekularen Klasse durch die Restriktion mangelnder Nährstoffverfügbarkeit direkt betroffen ist.

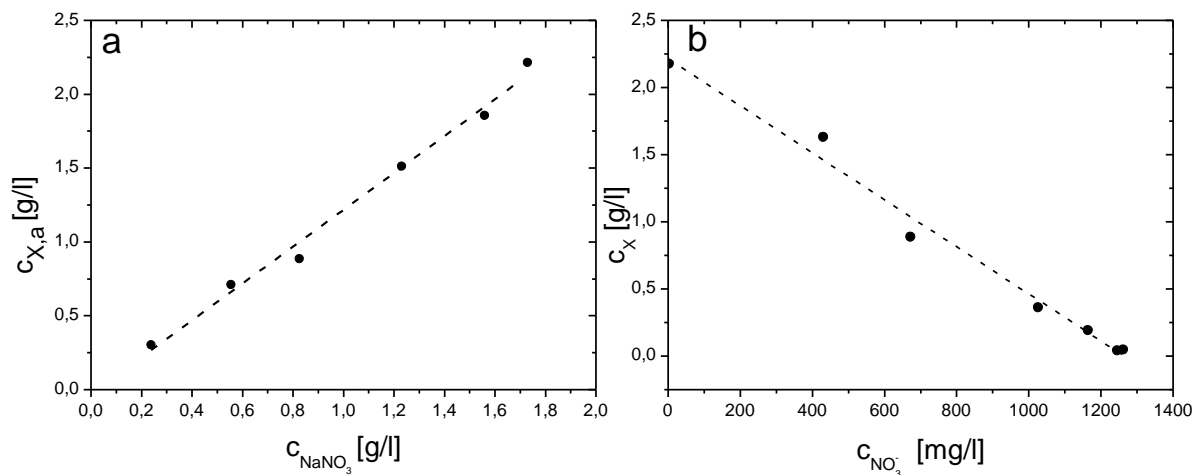


Abb. 4.4: Einfluss der NaNO_3 -Konzentration auf die Konzentration der aktiven Biomasse zu Beginn der Stickstofflimitierung. a: Einfluss der NaNO_3 -Startkonzentration auf die Konzentration aktiver Biomasse ($c_{X,a}$) in allen Satzkultivierungen. b: Chromatographische Bestimmung der Nitratkonzentration im Einzelexperiment. Der Ordinatenschnittpunkt gibt die Konzentration aktiver Biomasse während der Nährstofflimitierung wieder.

Die Konzentration aktiver Biomasse konnte experimentell nicht direkt durch gravimetrische Messung oder Korrelation mit der optischen Dichte bestimmt werden. Daher wurde sie mittels Ionenchromatographie bestimmt. Im Einzelexperiment zeigte sich, dass sich die Biomassekonzentration proportional zum Verbrauch von Nitrat im Medium entwickelte (Abb. 4.4 b), solange Nitrat im Medium verfügbar war. Damit zeigte sich, dass der Stickstoff-Ausbeutekoeffizient $Y_{X/N}$ konstant war. Folglich konnte die Biomassekonzentration beim Übergang in die Limitierungsphase durch den Ordinatenschnittpunkt in der gezeigten Auftragung (Abb. 4.4 b) ermittelt werden. Hier betrug die Nitratkonzentration 0 mg/l. An diesem Punkt war die Konzentration der aktiven Biomasse identisch mit derjenigen der gesamten Biomasse, da noch keine Speichermoleküle akkumuliert wurden. Im hier gezeigten Experiment waren die Zeitpunkte der Probenahme und des Eintritts in die Limitierung identisch. Insgesamt wurde jedoch durch die ionenchromatographische Messung eine

Methode gefunden, um unabhängig vom Probenahme-Zeitpunkt die Konzentration aktiver Biomasse auch nach Beginn der Akkumulation von Reservestoffen zu bestimmen. Auf diese Weise wurden die maximalen Konzentrationen von $c_{X,a}$ für alle Einzelexperimente bestimmt. Die maximalen Konzentrationen der aktiven Biomasse stiegen linear mit der Startkonzentration von NaNO_3 im Medium an (Abb. 4.4 a). Zugleich lässt die Proportionalität des Anstiegs wiederum auf einen konstanten Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/N}$ schließen. Die Geradensteigung betrug 1,22 g/g. Unter Berücksichtigung des Stickstoff-Massenanteils in NaNO_3 wurde mit Gleichung (4.3) ein Stickstoffgehalt der aktiven Biomasse von $\omega_{N,X} = 13,4 \%$ berechnet.

$$\omega_{N,X} = \frac{\Delta c_{\text{NaNO}_3}}{\Delta c_X} \cdot \frac{M_N}{M_{\text{NaNO}_3}} \quad (4.3)$$

Δc_{NaNO_3} [g/l] und Δc_X [g/l] bezeichnen dabei die Konzentrationsänderungen von Natriumnitrat und Biomasse. M_N [g/mol] und M_{NaNO_3} [g/mol] sind die molaren Massen von Stickstoff und Natriumnitrat.

Erwartungsgemäß beeinflusst die NaNO_3 -Startkonzentration nicht nur die maximale aktive Biomassekonzentration, sondern darüber auch die Kapazität der Kultur, Licht zu absorbieren. Die Chlorophyllkonzentration wurde über den gesamten Kultivierungsverlauf gemessen. Die gemessene maximale Chlorophyllkonzentration, welche aus der Summe der Konzentration von Chlorophyll a und Chlorophyll c berechnet wurde, nahm mit steigender Stickstoffverfügbarkeit zu. Ein Maximum wurde allerdings bei Experimenten beobachtet, bei welchen die NaNO_3 -Konzentrationen zu Beginn der Kultivierung größer als 1,5 g/l waren. Hier wurde keine weitere Steigerung der maximalen Chlorophyllkonzentration beobachtet. In diesem Fall betrug der maximale Messwert ca. 40 mg/l erreicht. Demnach sank auch die durchschnittliche PFD des transmittierten Lichts (Abb. 4.3), wenn die Limitierung bei höherer Biomassekonzentration eintrat. Insgesamt stieg somit mit der Stickstoffverfügbarkeit die Kapazität der Kulturen Licht zu absorbieren. Lediglich in beiden Experimenten, die vollständige Lichtabsorption aufwiesen, war kein Unterschied in Bezug auf die Konzentration des Chlorophylls zu erkennen.

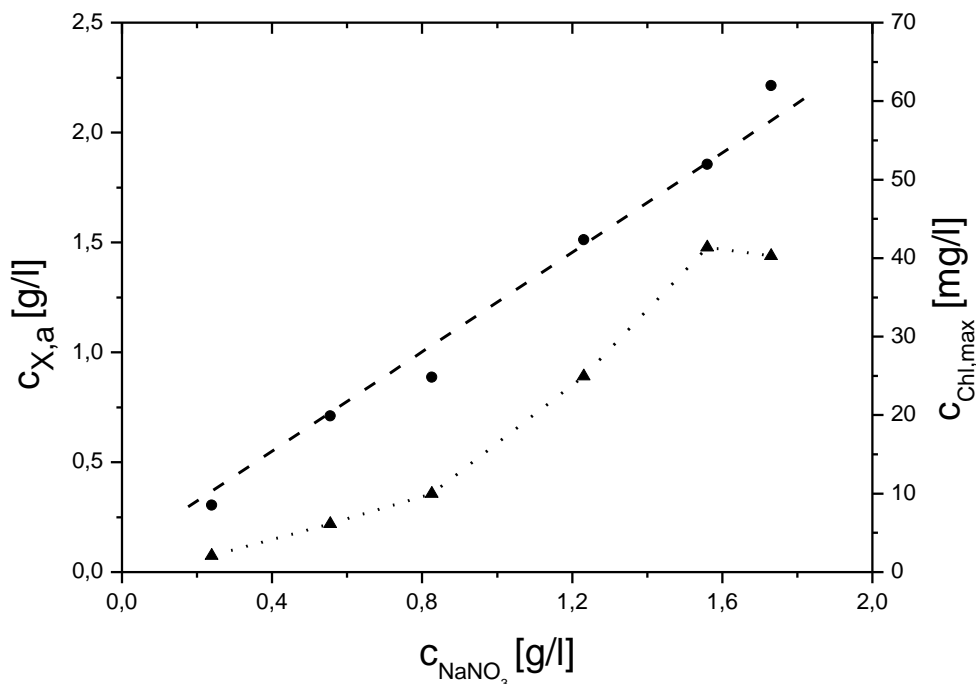


Abb. 4.5: Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf die maximale Chlorophyllkonzentration. ●: maximale aktive Biomassekonzentration $c_{X,a}$; ▲: maximale Chlorophyllkonzentration $c_{\text{ChI,max}}$ als Summe aus Chlorophyll a und Chlorophyll c.

Neben der Fähigkeit der limitierten Kulturen Licht zu absorbieren wurde die physiologische Kapazität der Produktbildung der Mikroalgen untersucht. Dazu wurden die Biomasse- und Speicherlipid-Produktivitäten in den stickstofflimitierten Kulturen auf die aktive Biomassekonzentration $c_{X,a}$ bezogen. Dadurch konnten spezifische Raten der Biomassebildung r_X [g/(g·d)] und der Lipidsynthese r_L [(g/(g·d)], also die pro Zeitintervall von 1 g aktiver Biomasse gebildete Masse des jeweiligen Produktes, nach Gleichungen (4.4) und (4.5) berechnet werden.

$$r_X = \frac{P_X}{c_{X,a}} \quad (4.4)$$

$$r_L = \frac{P_L}{c_{X,a}} \quad (4.5)$$

P_X [g/(l·d)] bezeichnet die Biomasse-Produktivität, P_L [g/(l·d)] ist die Lipid-Produktivität und $c_{X,a}$ [g/l] die Konzentration aktiver Biomasse. Die spezifischen Produktbildungsraten können prinzipiell als Maß für die Produktivität einzelner Zellen betrachtet werden. Um das physiologische Potential der Zellen zur Produktbildung zu verstehen wurde das durch die einzelnen Zellen bzw. 1 g aktive Biomasse im Zeitintervall absorbierte Licht

$I_{\text{abs}}/c_{X,a}$ [$\mu\text{E}/(\text{g}\cdot\text{s})$] berechnet. Betrachtet man die Abhängigkeit der spezifischen Syntheseraten vom absorbierten Licht, so ergeben sich sowohl für die Biomassebildung als auch für die Lipidsynthese zwei deutlich abgrenzbare Bereiche (Abb. 4.6). Werden pro Zeiteinheit weniger als $8,5 \mu\text{E}/(\text{g}\cdot\text{s})$ absorbiert, so zeigt sich ein proportionaler Anstieg beider spezifischer Raten mit steigender Anzahl absorbierter Photonen. Zwischen $8,5 \mu\text{E}/(\text{g}\cdot\text{s})$ und $9,0 \mu\text{E}/(\text{g}\cdot\text{s})$ allerdings ist allerdings der Übergang in einen Sättigungsbereich zu erkennen. Eine weitere Steigerung der absorbierten Lichtenergie führt nicht zu einer weiteren Zunahme der Syntheseleistung der Mikroalgen. Die maximalen gemessenen Raten waren $r_L = 0,2 \text{ g}/(\text{g}\cdot\text{d})$ für die Lipidbildung und $r_X = 0,35 \text{ g}/(\text{g}\cdot\text{d})$ für die Biomassebildung.

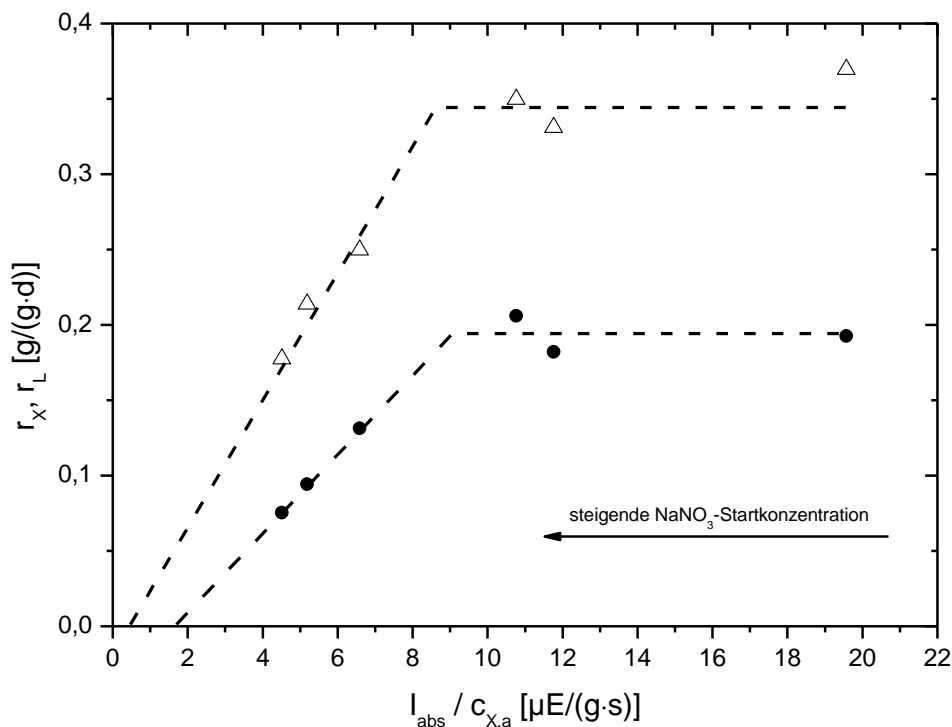


Abb. 4.6: Physiologische Effizienz der Produktbildung von *P. tricornutum* in stickstofflimitierten Kulturen. Δ : spezifische Rate der Biomassebildung r_X ; \bullet : spezifische Rate der Speicherlipidsynthese r_L . Alle Daten repräsentieren Einzelexperimente. Die Berechnung der spezifischen Raten basiert auf der Konzentration aktiver Biomasse $c_{X,a}$.

Durch den positiven Abszissenabschnitt (Abb. 4.6) kann man den Energiebedarf für den Erhaltungsstoffwechsel erkennen. Dieser Bedarf kann nach den vorliegenden Daten auf Werte zwischen $0,5 \mu\text{E}/(\text{g}\cdot\text{s})$ und $2 \mu\text{E}/(\text{g}\cdot\text{s})$ beziffert werden. Damit kann die in Dunkelheit durch Atmung mindestens zu erzeugende Energiemenge zum Erhalt der Stoffwechselfunktionen abgeschätzt werden.

Die Effizienz der Produktbildung kann durch die Quotienten $r_X/(I_{\text{abs}}/c_{X,a})$ bzw. $r_L/(I_{\text{abs}}/c_{X,a})$ beschrieben werden. Der proportionale Anstieg der in Abb. 4.6 gezeigten Geraden belegt, dass die Effizienz bzw. der Wirkungsgrad der Lipidsynthese und der Biomassesynthese konstant ist. Ab einer absorbierten PFD von 8,5 $\mu\text{E}/(\text{g}\cdot\text{s})$ bis 9,0 $\mu\text{E}/(\text{g}\cdot\text{s})$ sinkt der Wirkungsgrad mit steigender absorbierter Lichtenergie kontinuierlich ab.

4.1.6 Produktivität und Effizienz des Wachstums von *P. tricornutum* unter Lichtlimitierung

Zum Vergleich mit den obigen Ergebnissen und zur Untersuchung, ob die PCE bei Lipidbildung von der bei Lichtlimitierung abweicht, wurde in einem Experiment versucht das Auftreten von Nährstofflimitierung zu vermeiden. Aus diesem Grund wurden der Zellsuspension nach 4 Tagen 10 ml einer wässrigen Lösung mit 100 g/l NaNO_3 und 3 ml einer wässrigen Lösung mit 40 g/l K_2HPO_4 nachgefüttert. Nach 7,5 Tagen wurden zudem 15 ml einer Lösung mit 40 g/l $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ zugegeben um auch ausreichend Schwefel für das Wachstum zur Verfügung zu stellen.

Die Biomasse-Produktivität wurde nach Erreichen der nahezu vollständigen Lichtabsorption ab Tag 6 bis zum 11. Tag bestimmt. Sie betrug 513 mg/(l·d) und war damit deutlich höher als bei den nährstofflimitierten Kulturen. Während dieser Zeit betrug der spezifische Lipidgehalt der Biomasse durchschnittlich 14 %. Unter diesen Bedingungen wurden also keine Speicherlipide akkumuliert (Abb. 4.7). Der spezifische Lipidgehalt stieg lediglich vor der letzten Messung leicht an und erreichte am Tag 15 einen Wert von 18 %. Am 12. Tag setzte die Stickstofflimitierung ein, wie aus Messungen der Konzentrationen der Nitrat-Ionen zu erkennen war. Für die Berechnung der PCE wurde mit der eingestrahlten PFD von 207,7 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ und der in der betrachteten Periode gemittelten PFD des transmittierten Lichts von 0,9 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ eine durchschnittlich absorbierte Energiemenge von 188,04 kJ/d berechnet (Gleichung (3.17)). Dagegen ergab sich mit Gleichung (3.19) eine Steigerung der Verbrennungsenthalpie der gesamten Biomasse von 9,87 kJ/d. Dabei wurde eine Verbrennungsenthalpie von 20,6 kJ/g der lipidarmen Biomasse gemäß den experimentellen Ergebnissen aus Kapitel 4.1.2 zugrunde gelegt. Die Berechnung der PCE ergab somit einen Wert von 5,62 %. Diese PCE war fast identisch mit der höchsten PCE, die bei stickstofflimitiertem Wachstum beobachtet wurde. Insgesamt war sie auf vergleichbarem Niveau wie in den drei nährstofflimitierten Experimenten mit den höchsten Nitrateinwaagen.

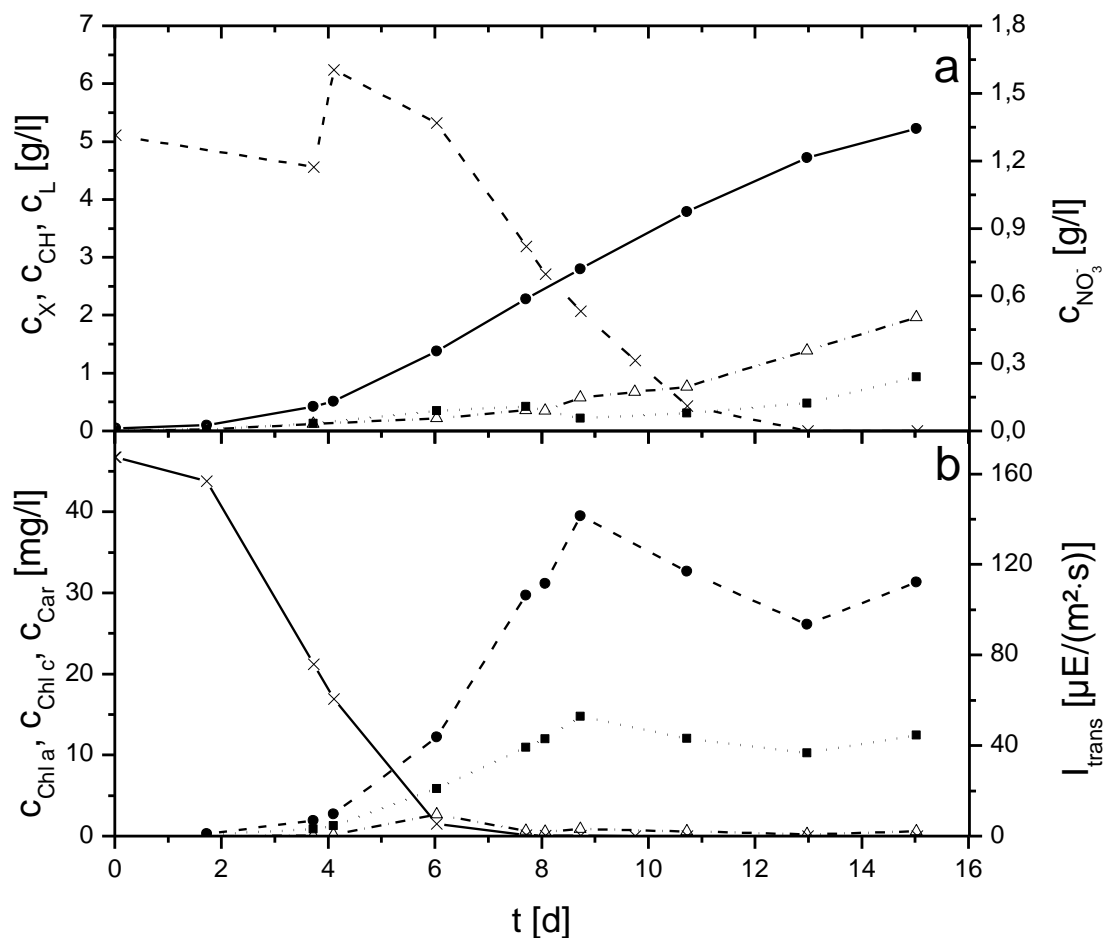


Abb. 4.7: Satzkultivierung von *P. tricornutum* mit Nitratüberschuss. a: ●: Biomassekonzentration c_X ; Δ Kohlenhydratkonzentration c_{CH} ; ■ Lipidkonzentration c_L ; ×: Nitratkonzentration $c_{NO_3^-}$. b: ●: Chlorophyll a-Konzentration $c_{Chl a}$; ■: Chlorophyll c-Konzentration $c_{Chl c}$; Δ: Karotinoidkonzentration c_{Car} ; ×: PFD des transmittierten Lichts I_{trans} .

Interessanterweise konnte eine maximale Chlorophyll-Konzentration (als Summe aus den Konzentrationen von Chlorophyll a und Chlorophyll c) von 40,4 mg/l gemessen werden. Dieser Wert stimmt sehr gut mit den beiden maximalen Konzentrationen überein, die bei den nährstofflimitierten Versuchen mit den höchsten $NaNO_3$ -Startkonzentrationen gemessen wurden.

4.1.7 Speicherlipidakkumulation bei zyklischer Tag-Nacht Beleuchtung

Zur Beurteilung der Übertragbarkeit der Technologie in den technischen Maßstab war es auch erforderlich die Auswirkungen von periodischen Beleuchtungszyklen, also Tag-Nacht Zyklen, auf das Wachstum und die Lipidbildung zu untersuchen. Da die Lipidbildung mit Mikroalgen zur Biodieselsynthese notwendigerweise auf die künstliche Beleuchtung verzichten muss um eine positive Energiebilanz zu erzielen, ist der technische Prozess auf die alleinige Beleuchtung durch Sonnenlicht angewiesen.

Aus diesem Grund wurden zwei Versuche mit *P. tricornutum* im Rührkesselreaktor mit Tag-Nacht Wechsel der Beleuchtungsintensität durchgeführt um die Effizienz der Biomasse- und Speicherlipidbildung unter diesen Bedingungen zu untersuchen. Im ersten Experiment wurde die Beleuchtungsintensität periodisch zwischen $168 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ mit einer Periodenlänge von 16 h und $0 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ mit einer Intervalllänge von 8 h gewechselt. Die Biomassekonzentration wurde mit einem online Spektralphotometer und der Korrelation mit offline Proben berechnet. Außerdem wurden die Konzentrationen von ausgewählten Anionen, Lipiden und Kohlenhydraten bestimmt. Im zweiten Experiment wurde eine Kultivierung bei Dauerbeleuchtung durchgeführt. Die PFD betrug $112 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, so dass in beiden Versuchen die Summe der täglich auf den Reaktor eingestrahlenen Photonenflussdichte identisch war. Alle übrigen Kultivierungsbedingungen und die Zusammensetzung des Mediums waren identisch. Das Kultivierungsmedium enthielt in beiden Fällen $0,2 \text{ g/l K}_2\text{HPO}_4$ und $0,4 \text{ g/l NaNO}_3$. Die lag-Phasen beider Experimente sind nicht abgebildet, um die Vergleichbarkeit der Versuche zu erhöhen. Die Kohlenhydratkonzentration wurde in diesem zweiten Versuch nicht gemessen, da der Fokus auf der Effizienz der Lipidbildung lag.

In beiden Versuchen wurde am Tag 5 die Stickstofflimitierung erreicht, wie die Messungen der Nitrat-Ionenkonzentrationen zeigten. Im Experiment mit periodischen Beleuchtungszyklen wurden zwischen dem 7. und dem 15. Tag Proben direkt nach Einschalten der Beleuchtung und am Ende der beleuchteten Periode gezogen, um die Lipidbildung während der Tag-Phase und die Veratmung von Lipiden während der Nacht quantifizieren zu können. Während der Tag-Phasen wurden in dieser Zeit durchschnittlich 100 mg/l Lipide synthetisiert und in der Nacht wurden durchschnittlich 17 mg/l Lipide durch Atmung verbraucht. Es wurde eine spezifische Lipidsyntheserate von $r_L = 91 \text{ mg}/(\text{g} \cdot \text{d})$ während der Tag-Phasen und eine Verbrauchsrate von $r_L = 32 \text{ mg}/(\text{g} \cdot \text{d})$ für die

Dunkelperioden berechnet. Gegen Ende der Kultivierung betrug der spezifische Lipidgehalt 46 % und blieb mehrere Tage lang stabil.

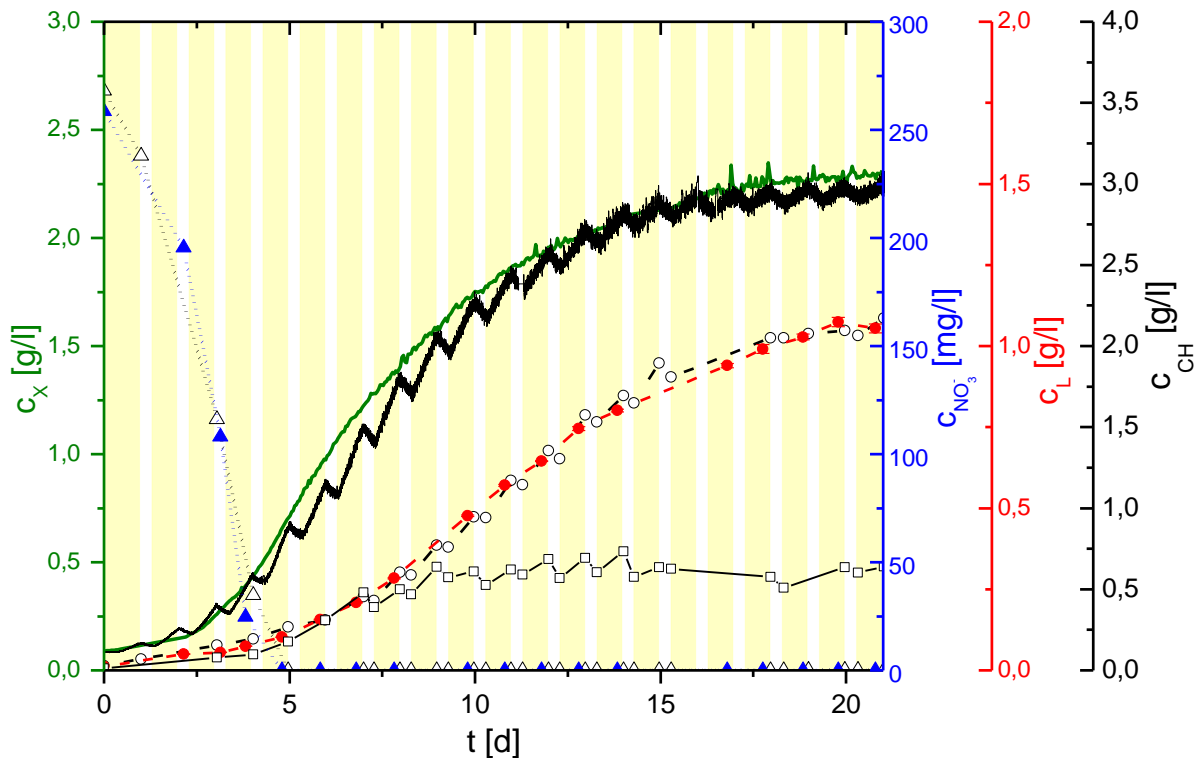


Abb. 4.8: Wachstum und Produktbildung bei zyklischer Tag-Nacht Beleuchtung und Dauerbeleuchtung. —: Biomassekonzentration c_x ; ○: Lipidkonzentration c_L ; △: Nitratkonzentration $c_{\text{NO}_3^-}$; □: Kohlenhydratkonzentration c_{CH} . Schwarze offene Symbole repräsentieren Daten des Versuchs mit zyklischer Tag-Nacht Beleuchtung. Farbige geschlossene Symbole repräsentieren Daten des Versuchs mit Dauerbeleuchtung. Die beleuchteten Perioden sind durch gelbe Balken dargestellt.

Während die Konzentration der Kohlenhydrate zu Beginn der Kultivierung noch deutlich anstieg, änderte sich deren Konzentration ab Tag 9 nicht mehr signifikant an. In den darauffolgenden Tagen schwankte die Konzentration zwischen 0,52 g/l und 0,72 g/l. Der Nettozuwachs der Kohlenhydratkonzentration während der Tag-Phase wurde demnach in der Nacht-Phase durch Atmung wieder vollständig kompensiert.

Der direkte Vergleich beider Experimente zeigt, dass sich die Konzentrationsverläufe der Biomasse und der Lipide über den gesamten Kultivierungsverlauf sehr ähnlich waren. Man erkennt, dass in beiden Versuchen innerhalb der ersten 5 Tage Nitrat verbraucht wurde. Die Verbrauchsraten waren vergleichbar in beiden Versuchen. Bei einer Biomassekonzentration von ca. 0,5 g/l trat die Stickstofflimitierung ein. Anschließend wurden Speicherlipide gebildet,

wie am Anstieg der Lipid-Konzentrationen in beiden Fällen zu erkennen ist. Bei einer Biomassekonzentration von ca. 2,25 g/l konnte kein weiteres Nettowachstum beobachtet werden und der Versuch wurde abgebrochen. Die Lipidkonzentration betrug in beiden Experimenten ca. 1 g/l am Ende der Kultivierung. Insgesamt kann aus dem fast identischen Verlauf der Konzentrationen von Biomasse und Lipiden geschlossen werden, dass die gleiche integrale Photonenflussdichte zu Biomasse- und Lipidsynthese mit gleicher Effizienz führte. Zwar sind die tageszyklischen Schwankungen von Biomasse- und Lipidkonzentrationen deutlich an den Messsignalen zu erkennen, jedoch kompensierte die höhere PFD während der Tag-Phasen das Absinken der Konzentrationen durch Atmung in der Dunkelperiode vollständig. Die Nacht-Phasen sind somit für den Prozess unproblematisch, denn die Effizienz des Prozesses war vergleichbar mit der bei Dauerbeleuchtung.

Im Falle der zyklischen Tag-Nacht Beleuchtung wurden zusätzlich die Konzentrationen der Kohlenhydrate gemessen um zu überprüfen, ob Lipide und Kohlenhydrate während der Nacht-Phasen veratmet werden. Beide Stoffgruppen wurden während der Nacht-Phasen zur Energiegewinnung durch Atmung genutzt, wie an den zyklischen Schwankungen der Konzentrationen zu erkennen war.

4.2 Prozessführungsvarianten zur effizienten Biomassebildung und Lipidsynthese

4.2.1 Diskontinuierliches Verfahren mit wiederholten Erntezyklen

Zur effizienten Biomassebildung im großtechnischen Maßstab ist eine der wesentlichen Zielsetzungen, das in den Reaktor einstrahlende Licht vollständig zu nutzen. Wenn allein aufgrund der Transmission ein signifikanter Anteil des Lichts ungenutzt den Reaktor verlässt, treten vermeidbare Effizienzverluste auf. Dies ist jedoch nicht der Fall, wenn etwa bei einer gestaffelten Aufstellung mehrerer Reihen von vertikal ausgerichteten Reaktoren transmittiertes Licht von anderen Modulen absorbiert wird.

Um Transmissionsverluste generell zu minimieren ist eine mögliche Strategie, die Biomasse im Satzbetrieb anzuziehen und mehrfach einen Teil der Zellsuspension zu ernten und das entnommene Volumen mit frischem Medium aufzufüllen. Somit können vollständige Lichtabsorption erreicht und hoher Transmissionsverlust zu Beginn der Satzkultivierungen

vermieden werden. Außerdem kann auf diese Weise periodisch Kulturflüssigkeit mit hoher Biomassekonzentration geerntet werden.

Es wurde ein Versuch mit *P. tricornutum* (Stamm SAG 1090-1b) durchgeführt, diese Strategie experimentell umzusetzen und die volumetrische Produktivität sowie die Effizienz der Biomassebildung zu untersuchen. Jeweils die Hälfte des Kulturvolumens wurde geerntet sobald die Biomassekonzentration ca. 3 g/l betrug oder diese Konzentration überschritt. Im unmittelbaren Anschluss an den Erntevorgang wurde frisches Medium zugeführt um das entnommene Volumen auszugleichen. Das Medium enthielt 1,5 g/l NaNO₃ und 0,2 g/l K₂HPO₄. Die Lipidkonzentration wurde mit der Sulpho-Phospho-Vanillin-Methode bestimmt. Die PFD wurde zu Beginn der Kultivierung schrittweise zwischen Tag 6 und Tag 11 von 109 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ auf 333 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ erhöht, jedoch während der Phase des zyklischen Erntens nicht weiter verändert. Der Versuchsaufbau ist in Kapitel 3.2.5 beschrieben.

Zunächst wuchs die Biomassekonzentration im Satzbetrieb innerhalb der ersten 13,9 Tage bis auf eine Konzentration von 3 g/l an. Danach wurde die Hälfte des Volumens geerntet und entsprechend mit frischem Medium aufgefüllt. Nach Zugabe des frischen Mediums wurde eine Biomassekonzentration von 1 g/l gemessen und nach weiteren 3 Tagen wurde die Konzentration von 3 g/l wieder überschritten. In der folgenden Zeit wurde zu drei weiteren Zeitpunkten geerntet.

Man erkennt, dass das zugegebene Nitrat nach der jeweiligen Zufütterung schnell durch die Zellen aufgenommen wurde. Zeitweise deuteten Messungen der Nitrat-Ionenkonzentrationen auf kurzzeitige Stickstofflimitierung hin, jedoch konnte kein signifikanter Anstieg des spezifischen Lipidgehaltes gemessen werden außer an den Tagen 17,5 und 23. Hier betrug der spezifische Lipidanteil der Biomasse kurzzeitig 30 %. Während der übrigen Erntezyklen war dieser nahezu konstant bei 20 %. Die PFD des transmittierten Lichts stieg lediglich unmittelbar nach Zufütterung kurzzeitig an, sank danach aber wieder schnell auf Werte zwischen 1 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ und 2 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$. Während der diskontinuierlichen Prozessführung mit Erntezyklen war die PFD des transmittierten Lichts dauerhaft niedrig und betrug kurzzeitig maximal 7 % des eingestrahlteten Lichts. Also wurden die Photonen dauerhaft fast vollständig durch die Kultur absorbiert.

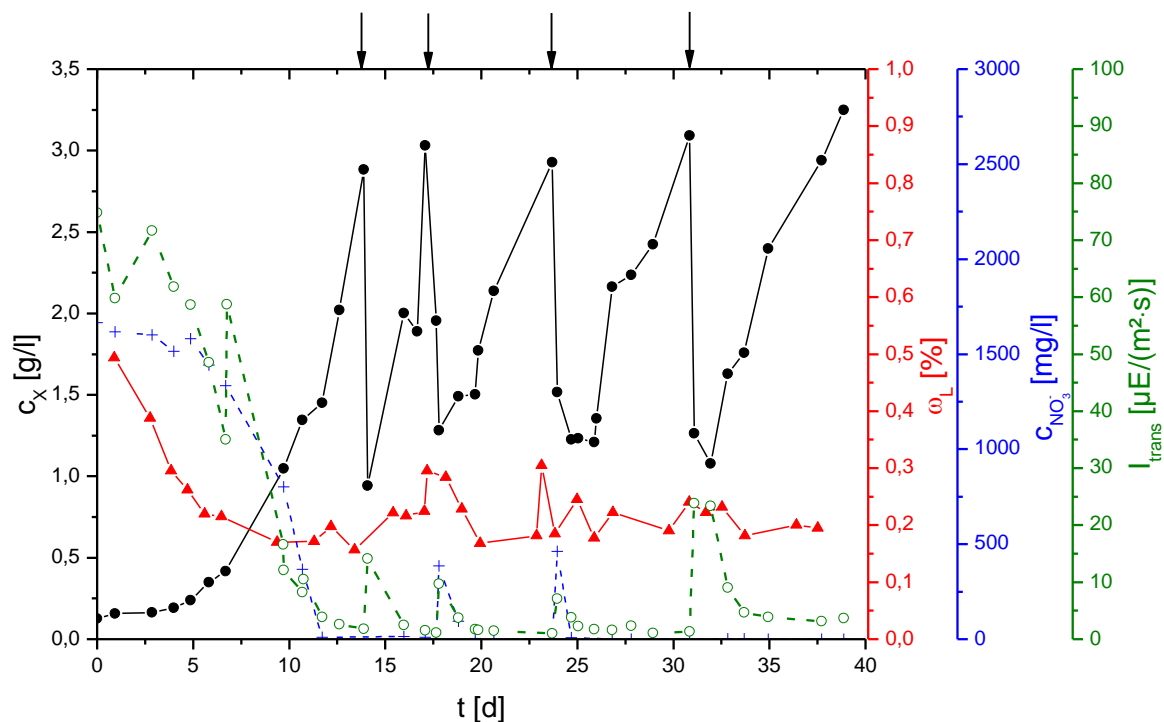


Abb. 4.9: Diskontinuierliches Verfahren mit Erntezyklen zur effizienten Biomasseproduktion. ●: Biomassekonzentration c_X ; ▲: Massenanteil von Lipiden in Biomasse ω_L ; ○: PFD des transmittierten Lichts I_{trans} ; +: Nitratkonzentration c_{NO_3} . Erntezeitpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Prozesseffizienz wurde auf Grundlage der volumetrischen Produktivität P_X bestimmt, die sich aus der Geradensteigung der Biomassekonzentrationskurve ergibt (siehe Kapitel 3.3.2). Die maximale volumetrische Produktivität wurde nicht direkt nach Austausch des Mediums erreicht, da das Medium erst bei Zugabe in den Reaktor mit CO_2 gesättigt wurde. Demnach erfuhren die Algen jeweils einen kurzzeitigen Anstieg des pH-Wertes. Kurze lag-Phasen von maximal einem Tag Länge, welche vermutlich auf diesen Effekt zurückzuführen waren, wurden nicht in die Berechnung einbezogen. Die Effizienz wurde nach der in Kapitel 3.5 gezeigten Methode berechnet. Lediglich die Verbrennungsenthalpie der Biomasse wurde in diesem Fall als konstant mit einem Wert von 20,6 kJ/g angenommen. Dieser Wert ergab sich aus der Messung der Verbrennungsenthalpie der Probe mit einem Lipidanteil von 18,1 % (siehe Kapitel 4.1.2). Die Biomasse-Produktivität war zunächst 662 mg/(l·d) vor dem ersten Ernten (Tabelle 4-3). In den nächsten Perioden war sie mit 696 mg/(l·d) zunächst höher, sank jedoch im Folgenden und betrug minimal ca. 300 mg/(l·d). Die PCE lag anfänglich bei 4,5 %, danach zwischen den ersten beiden Erntezyklen bei 4,7 % und sank dann auf Werte um ca.

2 % ab. Bei der Berechnung wurde jeweils von kompletter Lichtabsorption ausgegangen, da im betrachteten Fall der Fokus auf der Effizienz des Prozesses lag und nicht auf der physiologischen Begrenzung der effizienten Lichtnutzung.

Tabelle 4-3: Volumetrische Produktivität P_X und Effizienz der Biomassebildung bei diskontinuierlicher Prozessführung mit Erntezyklen.

Zyklus	Zeitintervall [d]	P_X [mg/(l·d)]	PCE [PAR] [%]
0	11,7 – 13,9	662	4,50
1	14,1 – 17,1	696	4,73
2	17,8 – 23,7	293	1,99
3	24,7 – 30,8	372	2,22
4	31,9 – 38,9	313	2,13

4.2.2 Zweistufige kontinuierliche Prozessführung

Zur Entkopplung der Biomasse- und der Lipidbildung wurde ein zweistufiger kontinuierlicher Prozess entwickelt. Dabei bestand die Besonderheit darin, dass auf der ersten Stufe Biomasse mit hoher Effizienz gebildet wurde und diese in der zweiten Stufe in die Stickstofflimitierung und damit Lipid-Produktionsphase eintrat. Der Versuchsaufbau ist in Kapitel 3.2.6 beschrieben. Durch die unterschiedlichen Flüssigkeitsvolumina der beiden Reaktoren konnte eine Verdopplung der Verweilzeit in der zweiten Prozessstufe erreicht werden und damit ein höherer spezifischer Lipid-Massenanteil der geernteten Biomasse erzielt werden.

Nach Anwachsen der Kulturen wurde nach ca. 7 Tagen die kontinuierliche Prozessführung gestartet bei einem Volumenstrom von 250 ml/d und damit bei einer Verdünnungsrate von $0,5 \text{ d}^{-1}$ in der ersten und $0,25 \text{ d}^{-1}$ in der zweiten Prozessstufe. Das Fließgleichgewicht in der ersten Stufe stellte an sich an Tag 11 ein (Abb. 4.10). Hier lagen eine mittlere Biomassekonzentration von 1,61 g/l und eine mittlere Lipidkonzentration von 0,26 g/l vor. In der zweiten Stufe stellte sich das Gleichgewicht bei einer Biomassekonzentration von 3,40 g/l und einer Lipidkonzentration von 0,93 g/l an Tag 16 ein. Gemäß der Intention, in der ersten Prozessstufe ausreichend Nitrat zur Verfügung zu stellen und erst in der zweiten Stufe unter

Stickstofflimitierung Lipide zu akkumulieren, konnten in der ersten Stufe im Gleichgewicht stets positive Nitrat-Ionenkonzentrationen gemessen werden. Außerdem bestätigte der niedrige Lipid-Massenanteil von 16 %, dass die Kultur nicht nährstofflimitiert war. In der zweiten Stufe war die Nitratkonzentration 0 mg/l und der Lipid-Massenanteil stieg auf ca. 30 %.

In der ersten Prozessstufe betrug die Biomasse-Produktivität 803 mg/(l·d) und die der Lipide 130 mg/(l·d). In der zweiten Prozessstufe war die Biomasse-Produktivität geringer mit 449 mg/(l·d), jedoch die Lipid-Produktivität mit 168 mg/(l·d) höher als in der ersten Stufe (siehe

Tabelle 4-4). Insgesamt wurde bei diesem Prozess eine Biomasse-Produktivität von 567 mg/(l·d) und eine Lipid-Produktivität von 155 mg/(l·d) erzielt. Die Produktivitäten wurden dabei mit den Gleichungen (3.5) und (3.6) bestimmt.

In beiden Prozessstufen wurde das Licht nahezu vollständig absorbiert, was die niedrige PFD des transmittierten Lichts indiziert. Damit kann von vollständiger Lichtnutzung ausgegangen werden.

Um zu überprüfen, ob eine weitere Steigerung der Verdünnungsrate eine weitere Steigerung der Produktivität bewirken könnte, wurde der Volumenstrom auf 300 ml/d erhöht. Danach sank die Lipidkonzentration in der zweiten Prozessstufe aufgrund der geringeren Verweildauer, so dass das Experiment nach 35 Tagen beendet wurde.

Tabelle 4-4: Volumetrische Produktivität und PCE im zweistufigen kontinuierlichen Prozess bei $Q = 250$ ml/d. c_X : Biomassekonzentration; c_L : Lipidkonzentration; P_X : volumetrische Biomasseproduktivität, P_L : volumetrische Lipid-Produktivität.

Stufe	c_X [g/l]	c_L [g/l]	P_X [mg/(l·d)]	P_L [mg/(l·d)]	PCE [PAR] [%]
1	1,61	0,26	803	130	8,62
2	3,40	0,93	449	168	6,27
1+2	-	-	567	155	7,13

Anhand der Produktivitätsdaten konnte die Effizienz des Gesamtprozesses und der beiden Teilprozesse berechnet werden. Dies wurde für das Fließgleichgewicht vor Tag 25 betrachtet. Die zweite Prozessstufe war mit 6,27 % weniger effizient als die erste Stufe mit einer PCE von 8,62 %. Betrachtete man den gesamten Prozess, so ergab sich eine PCE von 7,13 %.

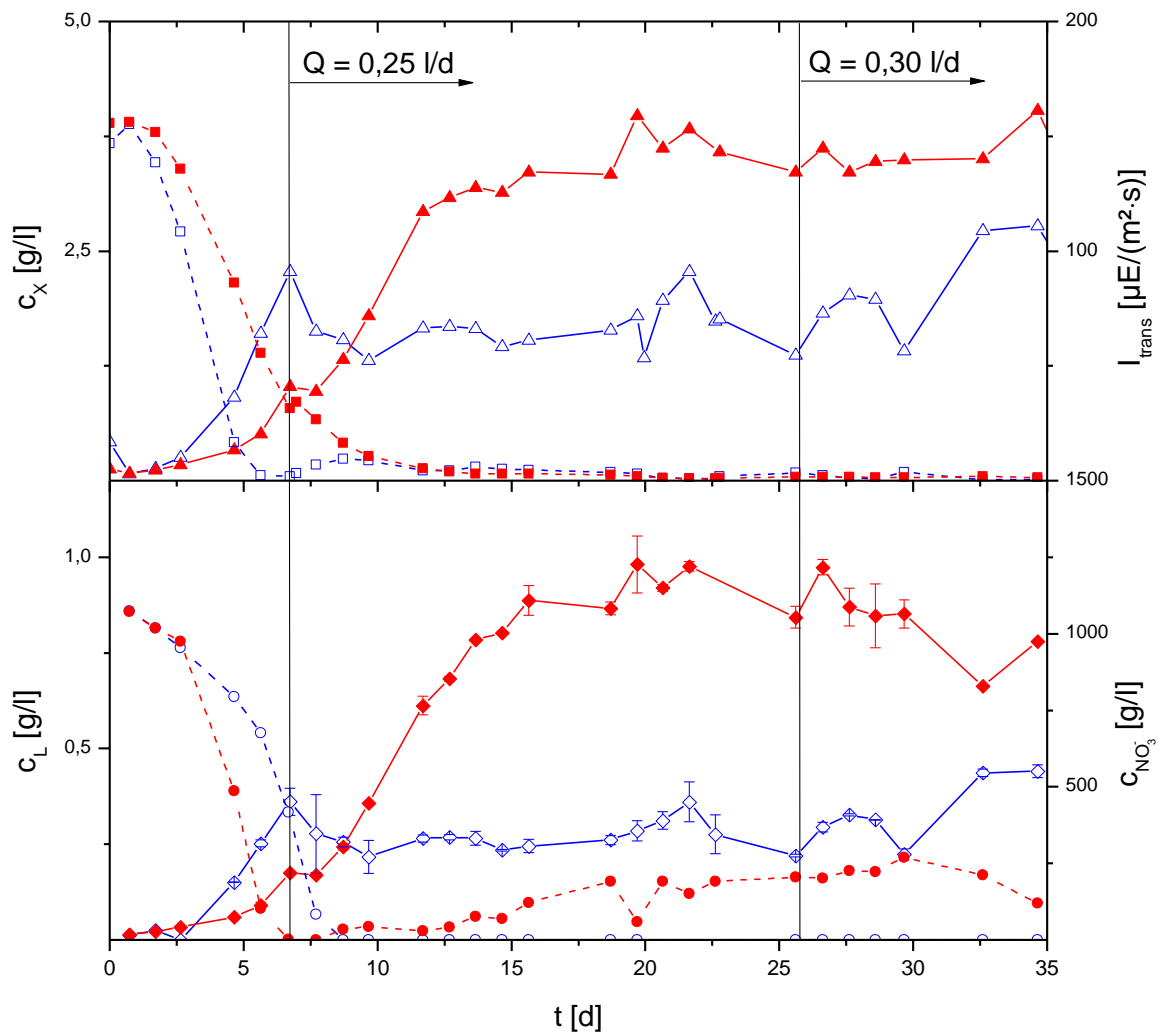


Abb. 4.10: Zweistufiger kontinuierlicher Prozess zur Biomasse- und Lipidsynthese mit *P. tricornutum*. Δ : Biomassekonzentration c_X ; \diamond : Lipidkonzentration c_L ; \circ : Nitratkonzentration $c_{\text{NO}_3^-}$; \square : PFD des transmittierten Lichts I_{trans} . Blau/offene Symbole: Messwerte der ersten Prozessstufe; rot/volle Symbole: Messwerte der zweiten Stufe. Änderungen der volumetrischen Flussrate sind durch vertikale Linien angezeigt.

4.3 Simulation des Wachstums von *P. tricornutum* und der Lipidakkumulation durch lineare Programmierung

4.3.1 Zielsetzung

Ein strukturiertes Modell wurde mit der Zielsetzung entwickelt, die Grundidee des von Droop entwickelten Ansatzes zur mathematischen Beschreibung der Lipidakkumulation von Mikroalgen [183] aufzugreifen und in strukturierter Weise auf Grundlage der linearen Programmierung weiterzuentwickeln. Das von Droop entwickelte Modell modifizierte die kinetische Gleichung zur Berechnung der Wachstumsrate um die intrazelluläre Beladung mit dem limitierenden Element. Im hier verfolgten Ansatz wurde die Modellierung anhand explizit formulierter Massen- und Energiebilanzgleichungen vorgenommen. Dadurch, dass nach dem Lösen der Bilanzgleichungen Freiheitsgrade des Systems verbleiben, wurde durch Maximierung einer Zielfunktion in jedem Berechnungsschritt der optimale Metabolismus der Mikroalgen unter Berücksichtigung der durch die Energiebilanz und die Massenbilanz vorgegebenen Restriktionen berechnet. Experimentell wurde das Modell validiert, indem experimentelle Daten der Satzkultivierungen von *P. tricornutum* in Midi-Plattenreaktoren mit Daten der Simulation verglichen wurden.

4.3.2 Struktur des Modells

Abb. 4.11 zeigt die generelle Struktur des Modells. Hier findet eine Unterteilung statt, wobei zwischen der Reaktorebene und der Regulation auf der Zellebene unterschieden wird.

Auf Reaktorebene wird durch den Block „Lichtabsorption“ berechnet, welcher Teil der eingestrahnten Photonen durch die Zellsuspension absorbiert wird. Die absorbierten Photonen tragen zur Synthese von NADPH und ATP bei. Der nicht durch die Zellsuspension absorbierte Anteil wird ebenfalls berechnet und kann mit dem experimentell an der Rückseite der Midi-Plattenreaktoren gemessenen Werten verglichen werden. Auf Zellebene erfolgt die Berechnung der Syntheserate aller Produkte und Aufnahmeraten von Nährstoffen, die ihrerseits wiederum auf der Reaktorebene im Block „Massenbilanzen“ integriert werden. Dadurch werden die Konzentrationen von aktiver Biomasse $c_{X,a}$, Speicherlipiden c_{TAG} , Speicherkohlenhydraten c_{CH} sowie die Konzentrationen der Nährstoffe Nitrat $c_{NO_3^-}$, Phosphat $c_{PO_4^{3-}}$ und Sulfat $c_{SO_4^{2-}}$ im Medium ermittelt.

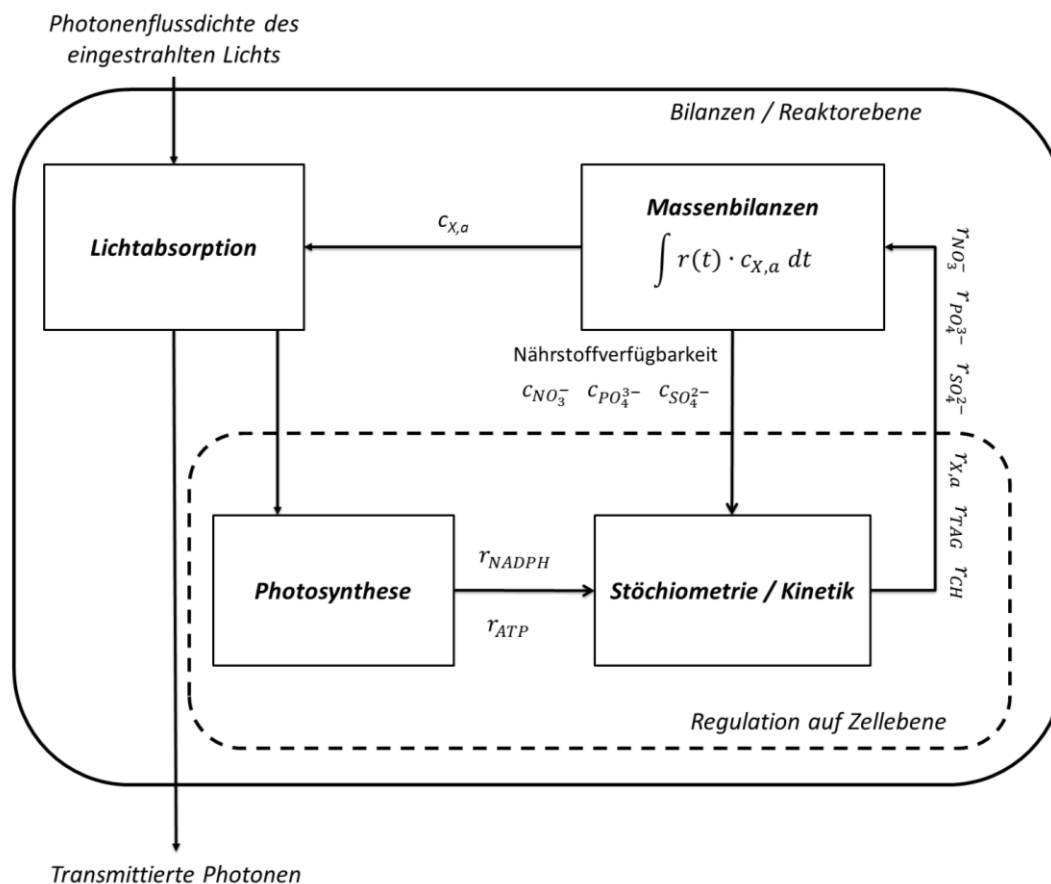


Abb. 4.11: Modellstruktur. $c_{X,a}/c_L/c_{CH}$: Konzentrationen von aktiver Biomasse, Lipiden und Kohlenhydraten; $r_{X,a}/r_L/r_{CH}/r_{NADPH}^*/r_{ATP}^*$: spezifische Syntheseraten von aktiver Biomasse, Lipiden, Kohlenhydraten, NADPH und ATP; $r_{NO_3^-}/r_{PO_4^{3-}}/r_{SO_4^{2-}}$: Aufnahmeraten von Nitrat, Phosphat und Sulfat; $c_{NO_3^-}/c_{PO_4^{3-}}/c_{SO_4^{2-}}$: Ionenkonzentrationen von Nitrat, Phosphat und Sulfat.

Auf der Zellebene werden einerseits die Effizienz der Energiekonversion durch die Photosyntheseapparat berechnet, andererseits auch die Syntheseraten von Zellbestandteilen und Aufnahmeraten von Anionen, welche als Nährstoffe dienen. Durch nicht-photochemisches Quenching wird ein Teil der Energie absorbiert Photonen in der Form von Wärme und Fluoreszenz dissipiert. Die Stärke des Effektes ist abhängig von der Lichtintensität und umso stärker, je weiter die PFD im Bereich der Lichtsättigung oder -inhibierung liegt. Verantwortlich hierfür sind Restriktionen im Photosyntheseapparat oder nachgelagerter chemischer Reaktionen der Dunkelreaktionen, wo auch die Fixierung von CO_2 stattfindet [34]. Im Block „Photosynthese“ werden die Effizienz der Synthese von ATP und NADPH und damit die Raten der Synthese beider Moleküle berechnet.

Im Block „Stöchiometrie/Kinetik“ sind alle stöchiometrischen Bilanzgleichungen, nämlich die Bilanzen von NADPH, ATP und der Elemente Stickstoff, Phosphor und Sulfat, zusammengefasst. Die Aufnahme der Nährstoffe und deren Verbrauch durch Reaktionen des Anabolismus sind dabei durch die zugehörigen Massenbilanzen gekoppelt. Ebenso entsprechen sich die Synthese von ATP (/NADPH) und dessen Verbrauch, der sich aus den Reaktionen des Anabolismus und zur Deckung des Energiebedarfs für den Erhaltungsstoffwechsel ergibt. Eine Lösung des Systems kann jedoch nicht gefunden werden, die dieses unterbestimmt ist. Die Zahl der zu berechnenden Synthese- und Aufnahmeraten übersteigt die Anzahl der stöchiometrischen Gleichungen. So besteht mathematisch die Möglichkeit die Syntheserate eines Speichermoleküls auf Kosten derjenigen eines anderen Energiespeichers zu steigern. Um trotz der zusätzlichen Freiheitsgrade zu einer Lösung zu gelangen, wurde der Ansatz der linearen Programmierung gewählt. Dabei führt die Maximierung der Zielfunktion des Organismus, also die Maximierung der Syntheseraten von aktiver Biomasse $r_{X,a}$, von TAGs r_{TAG} und von Kohlenhydraten r_{CH} , zu einer Lösung, welche die optimale Nutzung der Ressourcen für den Organismus darstellt. Zur Lösung des Algorithmus werden allerdings auch weitere kinetische Restriktionen, wie etwa die kinetische Limitierung der Nährstoffaufnahme eingeführt. Diese wurden als Restriktionen in der Form von Ungleichungen in das Modell einbezogen.

Durch die lineare Programmierung wird im Möglichkeitsraum, welcher durch die Stöchiometrie und durch die Kinetiken eingeschränkt wird, eine optimale Lösung gefunden. Sie stellt für den Organismus die effizienteste Ausgestaltung des Anabolismus dar. Die durch die Lösung der Optimierung erhaltenen Raten für die Synthesen im Anabolismus und die Nährstoffaufnahme werden auf Reaktorebene integriert. Somit werden die Konzentrationen der betrachteten Komponenten berechnet. In der Folge zeigen diese zum Teil wieder Rückwirkungen auf die Lichtabsorption.

4.3.3 Lichtabsorption

Licht wird durch die photosynthetischen Pigmente der Zellsuspension absorbiert, aber auch innerhalb der Kultur gestreut. Eine exakte Beschreibung der Zusammenhänge erfordert Kenntnisse über die Streuung und die Kinetik der Pigmentadaption. Da beide Phänomene für den betrachteten Organismus nicht hinreichend in der Literatur beschrieben sind, wurde die Lichtabsorption mit Gleichung 4.5 durch exponentielle Abnahme der PFD entlang des

Lichtwegs innerhalb des Reaktors berechnet [35], deren Gültigkeit für die ebene Reaktorgeometrie angenommen wird.

$$I_{\text{trans}}(t) = I_0(t) \cdot e^{-\epsilon_{\text{app}} \cdot L \cdot c_{X,a}(t)} \quad (4.6)$$

Die PFD (I) des einstrahlenden Lichts I_0 [$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] wurde durch hinter der vorderen Glasplatte des Midi-Plattenreaktors, also im Reaktorinneren, gemessen. L [m] bezeichnet die Länge des Lichtweges. Sie ergibt sich aus den Abmessungen des Reaktors und beträgt 0,02 m. $c_{X,a}$ ist die Konzentration aktiver Biomasse und ϵ_{app} [m^2/g] ist der scheinbare bzw. beobachtete Extinktionskoeffizient der Zellsuspension. Die experimentellen Daten zeigten, dass ϵ_{app} zu Beginn der Kultivierung sank und bei höheren Biomassekonzentrationen wieder anstieg. Daraus wurde die empirische Beschreibung des Extinktionskoeffizienten

$$\epsilon_{\text{app}} = \left(\frac{1}{a \cdot c_{X,a}} + b \cdot \sqrt{c_{X,a}} \right) \quad (4.7)$$

abgeleitet. Die Parameter a [m] and b [m^2/g] wurden durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit der GRG Nonlinear Solving Method [178] aus dem Vergleich mit experimentellen Daten bestimmt. Die phänomenologische Beschreibung der Lichtverteilung, basierend auf (4.6) und (4.7), diente hier der Entkopplung der Effekte der Lichtverteilung und der Absorptions- sowie Streuungseigenschaften vom eigentlichen Kern des Modells, nämlich der Beschreibung der physiologischen Reaktion auf die Nährstofflimitierung.

Die PFD des absorbierten Lichts I_{abs} [$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] konnte zu jedem Zeitpunkt t berechnet werden durch:

$$I_{\text{abs}}(t) = I_0(t) \cdot (1 - e^{-\epsilon_{\text{app}} \cdot L \cdot c_{X,a}(t)}) \quad (4.8)$$

4.3.4 Photosynthese und Effizienz der Lichtnutzung

Durch die Effekte der Lichtsättigung und der Photoinhibierung wird ein Teil der absorbierten Lichtenergie durch nicht-photochemisches Quenching in Form von Wärme und Fluoreszenzstrahlung dissipiert. Um diesem Effekt Rechnung zu tragen und den Anteil der Photonen rechnerisch zu bestimmen, der zur Synthese von ATP und NADPH beiträgt, wurde ein Modell von Camacho Rubio et al. [42] herangezogen. Dieses betrachtet drei Zustände der photosynthetischen Einheiten (photosynthetic units, kurz PSU): den Grundzustand, den

angeregten und den nicht-funktionalen Zustand. Nur Photonen, die auf PSUs im Grundzustand treffen, tragen zur Synthese von ATP und NADPH bei. Trifft ein Photon auf ein angeregtes oder nicht-funktionales PSU, so wird die Energie dissipiert. Zusätzlich kann der Übergang einer angeregten PSU in den nicht-funktionalen Zustand erfolgen. Dieses Phänomen wird als Photoinhibierung bezeichnet. Durch kinetische Beschreibung der Übergänge zwischen den Zuständen können die Anteile aller drei Zustände im Gleichgewichtszustand berechnet werden. Der als η [-] bezeichnete Anteil der durch PSUs im Grundzustand absorbierten Photonen kann berechnet werden durch:

$$\eta = 1 - \frac{1}{2} \left[\left(1 - \kappa - \frac{\alpha'}{I_0} \right) + \sqrt{\left(1 - \kappa - \frac{\alpha'}{I_0} \right)^2 + 4\kappa} \right] \quad (4.9)$$

Die Parameter α' [$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] und κ [-] können aus der Lichtkinetik bzw. PI-Kurve abgeleitet werden. Dazu sind Daten experimentell bestimmter Wachstumsraten erforderlich. Diese wurden in Satzkultivierungen im selben Reaktorsystem bei unterschiedlichen PFDs gemessen (Abb. 4.12). Gleichung (4.9) wurde für lichtlimitiertes Wachstum bei konstanter Beleuchtung entwickelt und ist gültig für stationäre Gleichgewichte zwischen den drei Zuständen der PSUs. Auf Grundlage der Kenntnis der PI-Kurve konnten die Parameter der Gleichung aus

$$P = P_m \frac{I_0}{\alpha'} \eta \left(\frac{1}{1 + \delta \sqrt{I_0}} \right) \quad (4.10)$$

durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit Hilfe der GRG Nonlinear Solving Method [178] angepasst werden. I_0 [$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] bezeichnet die PFD des eingestrahnten Lichts. Durch die Parameteranpassung ergaben sich $P_m = 0,996 \text{ d}^{-1}$, $\kappa = 0,042$, $\alpha' = 65,98 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ und $\delta = 0,042$. Das Verhältnis α'/I gibt die maximale Photosyntheserate in Bezug auf das eingestrahlte Licht an. κ ist die Anzahl aktivierter PSUs bei halbmaximaler Produktivität. Eine ausführlichere Erläuterung der Bedeutung der Parameter findet man bei Camacho Rubio et al. [42].

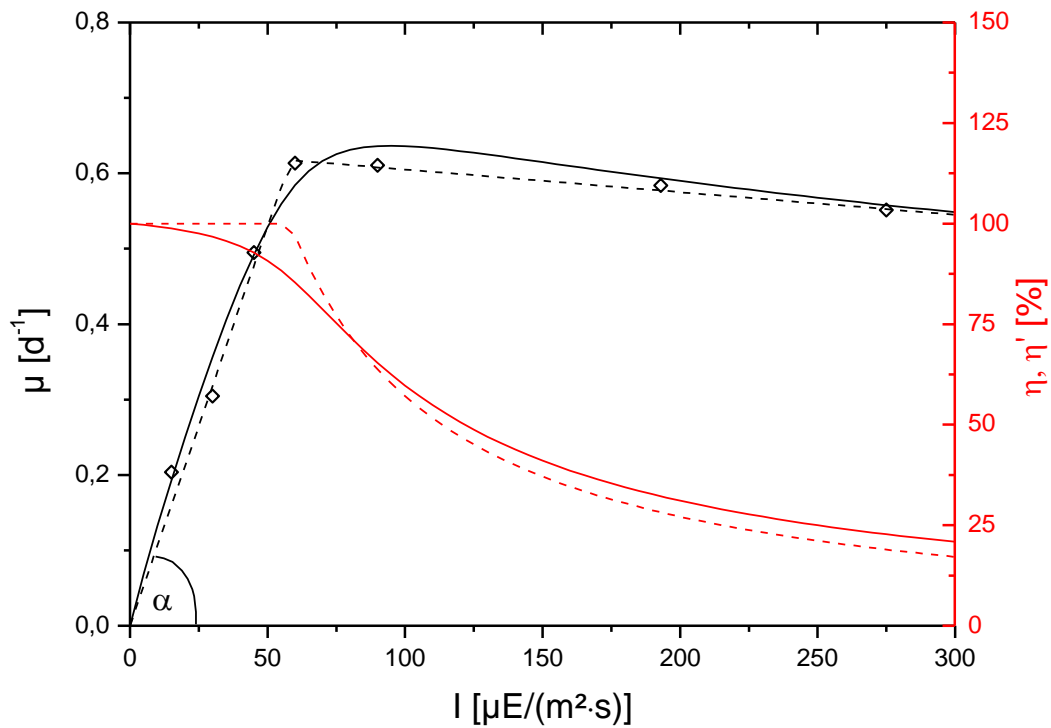


Abb. 4.12: Effizienz der Energiekonversion im Photosystem von *P. tricornutum*. \diamond : experimentell ermittelte Wachstumsraten μ . Durchgehende Linien bezeichnen die Beschreibung durch das Modell von Camacho Rubio et al. [42]. Unterbrochene Linien bezeichnen die Beschreibung durch das Effizienzmodell. η, η' : Effizienz der Photonennutzung. I : PFD des eingestrahlenen Lichts.

Abb. 4.12 zeigt die Anpassung experimenteller Daten an das Modell von Camacho Rubio. Die Abhängigkeit der Wachstumsrate von der PFD wurde nach Parameteranpassung akkurat durch das Modell beschrieben. Die resultierende Effizienz der Energiekonversion im gesamten Photosystem der Algen ergab sich aus Gleichung (4.9) als der Anteil der Photonen, der durch PSUs im Grundzustand absorbiert wurde.

Hydrodynamische Effekte sind in dem Modell nicht berücksichtigt, so dass auch Effekte des flashing light Effektes aufgrund der radialen Durchmischung nicht modelliert werden. Die Übertragung auf andere Kultivierungssysteme kann die Berücksichtigung der Hydrodynamik bei signifikanten Abweichungen der radialen Durchmischung erforderlich machen [37].

Mit einer abschnittsweise definierten Funktion konnte zusätzlich die Wachstumsrate μ [d^{-1}] in Abhängigkeit der PFD mathematisch durch Gleichung (4.11) beschrieben werden:

$$\mu = \begin{cases} 1.06 \cdot 10^{-2} \frac{m^2 \cdot s}{\mu E \cdot d} \cdot I & , I < 60 \frac{\mu E}{m^2 \cdot s} \\ -3 \cdot 10^{-4} \frac{m^2 \cdot s}{\mu E \cdot d} \cdot I + 0.635 d^{-1} & , I \geq 60 \frac{\mu E}{m^2 \cdot s} \end{cases} \quad (4.11)$$

Mit der Funktion wurde die PI-Kurve des Wachstums von *P. tricornutum* gut beschrieben (Abb. 4.12). Der Wirkungsgrad der Photonennutzung ist durch den Winkel α wiedergegeben. Der Betrag des Winkels kann durch Gleichung (4.11) berechnet werden und betrug für *P. tricornutum* $\alpha = \tan^{-1}(1.06 \cdot 10^{-2})$. Geht man von einem maximalen Wirkungsgrad von 100 % aus, wie auch im Falle des Modells von Camacho Rubio et al., so kann der Wirkungsgrad η' [%] bzw. die Effizienz der Energiekonversion im photosynthetischen Apparat berechnet werden durch:

$$\eta' = \frac{\mu}{\tan(1.06 \cdot 10^{-2}) \cdot I} \cdot 100 \text{ [%]} \quad (4.12)$$

Die Lichtkinetik von *P. tricornutum* wurde durch beide Ansätze mit hoher Genauigkeit beschrieben. Die experimentellen Daten wurden in Satzkultivierungen während der exponentiellen Wachstumsphase mit (3.2) bestimmt. Eine Nährstofflimitierung wurde hierbei durch die Zusammensetzung des Mediums ausgeschlossen. Wie zu erkennen ist, fand der Übergang des lichtlimitierten Wachstums in den Sättigungsbereich bei einer PFD von ca. $60 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ statt. Hier betrug die Wachstumsrate $0,6 \text{ d}^{-1}$ und nahm den größten Wert an. Der Übergang in den Lichtsättigungsbereich war abrupt. Dies ist anhand der guten Beschreibung durch die am Sättigungspunkt unstetige Funktion (4.11) zu erkennen. Bei höheren Lichtintensitäten war der Effekt der Photoinhibierung durch sinkende Wachstumsraten zu erkennen.

Durch beide Ansätze ergibt sich eine Effizienz von 100 % bei niedrigster PFD. Hier werden alle Photonen durch PSUs im Grundzustand absorbiert. Bei steigenden PFDs sinkt die Effizienz nach dem Modell von Camacho Rubio et al. stetig ab, wodurch die Effekte des nicht-photochemischen Quenching, also der Sättigung und der Photoinhibierung, beschrieben werden. In dem auf Grundlage des Wirkungsgrades erstellten Modell ist die Effizienz bis zu einer PFD von $60 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ zunächst konstant. Bei höherer PFD wurde experimentell Lichtsättigung beobachtet. Demnach sinkt auch die Effizienz hier kontinuierlich ab. Beide Ansätze stimmen in Bezug auf die Berechnung der Effizienz weitgehend gut überein. Größte Abweichungen sind beim Sättigungspunkt zu beobachten. Dies rührt daher, dass das PSU-Modell die Effekte mit stetigen Funktionen beschreibt und keine Unstetigkeiten zulässt. Das Effizienzmodell dagegen lässt die Unstetigkeit zu, benötigt aber keine Parameter, außer dem experimentell ermittelten Winkel α . Am Arbeitspunkt bei einer PFD von $I_0 = 200 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ gibt das mechanistische PSU-Modell eine Effizienz von 24 % an; mit dem anderen Modell

erhält man eine Effizienz von 27 %. Die Berechnungen des Wirkungsgrades durch das PSU-Modell wurden in der Simulation verwendet zu Berechnung der Syntheseraten von ATP r_{ATP}^* [mol/(g·s)] und NADPH r_{NADPH}^* [mol/(g·s)]. Diese wurden aus den folgenden Stöchiometrien [34, 184] berechnet:

$$r_{ATP}^*(t) = \frac{3}{8} \cdot I_{abs}(t) \cdot \frac{1}{c_{X,a}(t)} \cdot \eta \cdot \frac{A}{V} \quad (4.13)$$

$$r_{NADPH}^*(t) = \frac{2}{8} \cdot I_{abs}(t) \cdot \frac{1}{c_{X,a}(t)} \cdot \eta \cdot \frac{A}{V} \quad (4.14)$$

A [m²] ist dabei die beleuchtete Oberfläche der Zellsuspension im Reaktor und V [m³] ist das Flüssigkeitsvolumen der Kultur. I_{abs} [mol/(m²·s)] ist die PFD des absorbierten Lichts. $c_{X,a}$ [g/l] ist die Konzentration der aktiven Biomasse in der Zellsuspension. Dabei ergibt sich ein Verhältnis von 2:3 zwischen den Syntheseraten von NADPH und ATP. *P. tricornutum* ist grundsätzlich fähig, die Ladungstrennung im Photosystem II bei sehr hohen Lichtintensitäten zu durch zyklischen Elektronentransport zu umgehen [41]. Dabei wird kein NADP⁺ reduziert, jedoch ADP phosphoryliert. Damit können die Mikroalgen grundsätzlich das Verhältnis der Synthesen von ATP und NADPH bedarfsgerecht anpassen. Zur Vereinfachung wurde der zyklische Elektronentransport anders als in [185] im hier gezeigten Ansatz nicht berücksichtigt und ein konstantes Verhältnis der Syntheseraten von ATP und NADPH angenommen.

4.3.5 Biomassezusammensetzung und metabolische Kosten

In der Simulation werden im Wesentlichen zwei Hauptkomponenten der Biomasse unterschieden, aktive Biomasse und Speichermoleküle. Aktive Biomasse ist zusammengesetzt aus funktionellen Makromolekülen wie Proteinen, Membranlipiden, Kohlenhydraten mit struktureller Funktion, Nukleinsäuren und Pigmenten. Außerdem liegen Metaboliten vor, die ähnliche Zusammensetzung aufweisen wie die funktionellen Moleküle. Zu den Speichermolekülen zählen die während der Nährstofflimitierung akkumulierten Kohlenhydrate und Lipide, hauptsächlich TAGs. Da die Restriktionen der linearen Programmierung unter anderem auf Massen- und Energiebilanzen beruhen, ist es erforderlich

die Elementarzusammensetzung der Zellkomponenten und den NADPH- und ATP-Bedarf für deren Synthese zu kennen.

Ionenchromatographische Messungen haben gezeigt, dass die Ausbeutekoeffizienten der Biomassebildung unter Verbrauch von Sulfat und Nitrat in der nicht-nährstofflimitierten Wachstumsphase konstant sind (siehe Abschnitt 4.1.5). Für die übrigen Elemente der Biomasse wurden keine analogen Daten erhoben. Messungen der Phosphat-Ionenkonzentrationen waren vorhanden, konnten jedoch aufgrund der Befähigung von *P. tricornutum* zur intrazellulären Phosphat-Speicherung nicht zur Bestimmung der Ausbeutekoeffizienten genutzt werden. Obwohl Restrukturierungsprozess auf der Zellebene stattfinden können, ist nicht zu erwarten, dass sich die Zellzusammensetzung auf Ebene der Hauptstrukturkomponenten (Proteine, Nukleinsäuren, etc.) wesentlich ändert. Aus diesem Grund wurde zur Vereinfachung angenommen, dass die Zusammensetzung der aktiven Biomasse konstant ist und sich im zeitlichen Verlauf nicht wesentlich verändert. Erste Simulationszyklen zeigten, dass die Parameteroptimierung in der Simulation nicht-nährstofflimitierten Wachstums und der Vergleich mit sechs Datensätzen zur Konvergenz bei einer Biomassezusammensetzung mit 59,3 % Proteinen, 15,8 % Membranlipiden, 18,4 % Kohlenhydraten, 2,1 % RNA, 2,9 % DNA und 1,5 % Pigmentgehalt führte. Experimentelle Messungen zeigten zudem, dass das Verhältnis von Chlorophyll a, Chlorophyll c und Karotinoiden durchschnittlich 0,6:0,1:0,3 betrug. Obwohl hier erhebliche Variationen gemessen wurden, wurde im Modell von diesem Verhältnis ausgegangen. Zusätzlich sind in der aktiven Biomasse auch Metaboliten zu finden, die nicht explizit im Modell Berücksichtigung fanden. Vermutlich ist deren Zusammensetzung gut repräsentiert durch die Zusammensetzung der Makromoleküle, denn viele Metaboliten sind deren Vorstufen oder Abbauprodukte. Aus dieser Biomassezusammensetzung konnte die Elementarzusammensetzung von *P. tricornutum* berechnet werden (siehe Tabelle 4-5).

Die elementaren Zusammensetzungen der einzelnen molekularen Klassen wurden aus den Strukturen der Moleküle hergeleitet. Beispielsweise diente die von Brown [186] veröffentlichte Aminosäurezusammensetzung von *P. tricornutum* als Grundlage der Berechnung der Elementarzusammensetzung von Proteinen. Experimentelle Daten zur Zusammensetzung der Lipide (siehe Kapitel 4.1.1) wurden genutzt, um Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Membranlipide und TAGs zu ziehen.

Darüber hinaus mussten die metabolischen ATP- und NADPH-Kosten bzw. Ausbeutekoeffizienten für die Synthese der einzelnen Molekülklassen ermittelt werden. Dazu

wurden Angaben von Raven (1982) genutzt, die sich auf den ATP- und NADPH-Bedarf für die Fixierung und weitere Metabolisierung von Kohlenstoff beziehen. Aus diesen Daten wurden Ausbeutekoeffizienten für die Synthese der Makromoleküle berechnet (siehe Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5: Elementarzusammensetzung und Ausbeutekoeffizienten für die Synthese der makromolekularen Bestandteile der Biomasse. $Y_{I/NADPH}$, $Y_{I/ATP}$: Ausbeutekoeffizient für die Synthesen der Makromoleküle in Bezug auf NADPH und ATP. ω_X bezeichnet den Massenanteil des Elements X in der betrachteten Molekülklasse [186, 187].

	ω_C	ω_H	ω_N	ω_O	ω_P	ω_S	$Y_{I/NADPH}$	$Y_{I/ATP}$
	(w/w)	(w/w)	(w/w)	(w/w)	(w/w)	(w/w)	[g/mol]	[g/mol]
Proteine	0,53	0,07	0,18	0,20	0	0,03	5,88	4,63
Membranlipide	0,65	0,10	0,01	0,24	0,01	0	5,56	2,71
TAGs	0,77	0,12	0	0,11	0	0	5,56	2,71
Kohlenhydrate	0,44	0,06	0	0,49	0	0	13,75	7,46
Pigmente	0,77	0,08	0,06	0,09	0	0	3,78	5,46
DNA	0,38	0,05	0,16	0,31	0,10	0	12,61	7,39
RNA	0,36	0,04	0,15	0,35	0,10	0	11,99	7,02
Aktive Biomasse	0,52	0,07	0,12	0,27	0,01	0,02	6,78	4,68

Lediglich für DNA, RNA und Pigmente waren bei Raven [187] keine Angaben zu finden. Der ATP- bzw. NADPH-Bedarf für deren Synthese wurde aus dem ATP- bzw. NADPH-Verbrauch ermittelt, der sich aus den involvierten enzymatischen Reaktionsschritten auf den Synthesewegen (KEGG PATHWAY Datenbank) ergeben.

Die Zusammensetzung aktiver Biomasse sowie die Ausbeutekoeffizienten für deren Synthese ergaben sich aus den Elementarzusammensetzungen und metabolischen Kosten der einzelnen Molekülklassen. Die Berechnung erfolgte dabei durch Gewichtung entsprechend den prozentualen Anteilen der Stoffklassen in aktiver Biomasse.

Es gibt in der Literatur keine zuverlässigen Daten bezüglich des Energiebedarfs für den Erhaltungsstoffwechsel. Lediglich ein sehr niedriger Lichtkompensationspunkt, der kleiner als $1 \mu E/(m^2 \cdot s)$ ist, wurde für *P. tricornutum* beschrieben [188]. Daher ist von einem sehr niedrigen Maintenance-Bedarf der Mikroalge auszugehen. Hier wurde angenommen, dass die Lichtkonversion von mindestens $4 \mu E/(m^2 \cdot s)$ absorbiert Photonen im Reaktorsystem

ausreichend ist, um den Maintenance-Bedarf bei einer Biomassekonzentration von 1 g/l zu decken. Bei einer beleuchteten Reaktoroberfläche von $A = 0,05 \text{ m}^2$ müssen dementsprechend $1,73 \cdot 10^{-2} \text{ mol}$ Photonen pro Tag absorbiert werden. Da nach der bekannten Stöchiometrie 2 mol NADPH und 3 mol ATP nach Absorption von 8 mol Photonen synthetisiert werden, konnte ein Maintenance-Bedarf von $4,3 \text{ mmol}/(\text{g}\cdot\text{d})$ NADPH und $6,5 \text{ mmol}/(\text{g}\cdot\text{d})$ ATP berechnet werden. Die Raten des ATP- und NADPH-Verbrauchs aufgrund des Erhaltungsstoffwechsels, $r_{m,ATP}^*$ [mmol/(g·d)] und $r_{m,NADPH}^*$ [mmol/(g·d)], wurden berechnet mit:

$$r_{m,ATP}^*(t) = 6,5 \frac{\text{mmol}}{\text{g}\cdot\text{d}} \cdot c_X(t)/c_{X,a}(t) \quad (4.15)$$

$$r_{m,NADPH}^*(t) = 4,3 \frac{\text{mmol}}{\text{g}\cdot\text{d}} \cdot c_X(t)/c_{X,a}(t) \quad (4.16)$$

$c_X(t)$ [g/l] bezeichnet die Biomassekonzentration zum Zeitpunkt t . Da sie sowohl die Konzentration der aktiven Biomasse als auch die der Speichermoleküle beinhaltet, wird auch der Umschlag von Speichermolekülen (z. B. durch oxidativen Abbau und Ersatz infolge von de novo-Synthese [39]) durch den Maintenance-Term abgedeckt.

4.3.6 Stöchiometrie

In Matrixschreibweise kann die Stöchiometrie des Organismus wie folgt dargestellt werden:

$$\mathbf{b} \cdot \mathbf{r}^* = \mathbf{y} \quad (4.17)$$

Der Vektor \mathbf{r}^* enthält alle Synthese- und Nährstoffaufnahmeleistungen, die ihrerseits durch den Simplex-Optimierungsalgorithmus berechnet werden. \mathbf{b} ist die stöchiometrische Matrix des Systems. Die Multiplikation beider ergibt \mathbf{y} .

Durch den Block „Photosynthese“ werden - wie oben gezeigt - die Raten der Synthese von NADPH und ATP berechnet. Diese limitieren die Syntheseleistung der Zelle. Die NADPH- und ATP-Bilanz ergeben sich aus den ersten beiden Zeilen in Gleichung (4.18). Demnach entspricht der Verbrauch von ATP (/NADPH) für die Synthese von TAGs, Kohlenhydraten und aktive Biomasse zuzüglich des Verbrauchs durch den Erhaltungsstoffwechsel in jedem Zeitschritt der Syntheserate von ATP (/NADPH). Durch die Multiplikation der Syntheserate einer Komponente w mit dem inversen Ausbeutekoeffizienten $1/Y_{w,NADPH}$ ($1/Y_{w,ATP}$)

werden im Modell die NADPH- (bzw. ATP-), „Kosten“ für die Synthese der Komponente w bestimmt. Im weiteren Sinne stellen die beiden Gleichungen die Energiebilanzen des Systems dar. Darüber hinaus sind in (4.18) die Elementarbilanzen für die Atome Stickstoff, Phosphor und Sulfat durch die Zeilen 3 bis 5 dargestellt. Demnach stimmt zu jedem Zeitpunkt die Masse des aufgenommenen Stickstoffs, berechnet durch die Rate $r_{NO_3^-}$ und den Massenanteil des Stickstoffs im Nitrat ω_{N,NO_3^-} , mit dem Verbrauch für die Synthese der Biomassekomponenten überein.

$$\begin{bmatrix} 1 & 0 & \frac{-1}{Y_{X,a/NADPH}} & \frac{-1}{Y_{TAG/NADPH}} & \frac{-1}{Y_{CH/NADPH}} & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & \frac{-1}{Y_{X,a/ATP}} & \frac{-1}{Y_{TAG/ATP}} & \frac{-1}{Y_{CH/ATP}} & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & -\omega_{N,X,a} & -\omega_{N,TAG} & -\omega_{N,CH} & \omega_{N,NO_3^-} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -\omega_{P,X,a} & -\omega_{P,TAG} & -\omega_{P,CH} & 0 & \omega_{P,PO_4^{3-}} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -\omega_{S,X,a} & -\omega_{S,TAG} & -\omega_{S,CH} & 0 & 0 & \omega_{S,SO_4^{2-}} & 0 & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} r_{NADPH} \\ r_{ATP} \\ r_{X,a} \\ r_{TAG} \\ r_{CH} \\ r_{NO_3^-} \\ r_{PO_4^{3-}} \\ r_{SO_4^{2-}} \\ r_{m,NADPH} \\ r_{m,ATP} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (4.18)$$

$\omega_{X,Y}$ bezeichnet den Massenanteil des Elements X in dem Molekül Y. $Y_{U/V}$ ist der Ausbeutekoeffizient der Synthese der Komponente U in Bezug auf das Substrat V. Da die Limitierung von Nährstoffen betrachtet wird, enthält das System zur Vollständigkeit neben der Bilanz von Stickstoff auch diejenige von Schwefel und Phosphor. Eine Kohlenstofflimitierung wurde durch die CO_2 -Regelung ausgeschlossen. Außerdem würde die Einbeziehung der Kohlenstoffbilanz auch die Beschreibung des Massentransfers mit dem systemspezifischen Parameter k_a bedingen. Dies wurde im hier gezeigten Ansatz vermieden, jedoch ist eine Erweiterung um die Kohlenstoffbilanz einfach möglich.

Das Gleichungssystem hat mehr als einen Freiheitsgrad und ist unterbestimmt, da die Anzahl der unbekannt Raten größer ist als die Anzahl der linear unabhängigen stöchiometrischen Gleichungen.

4.3.7 Kinetik / Lineare Programmierung

Gleichung (4.18) ist nicht ausreichend, um die Syntheseraten aller Biomassekomponenten zu berechnen, da das System unterbestimmt ist. Aus diesem Grund wurde der Ansatz der linearen Programmierung verwendet, um die jeweilige optimale Lösung im Möglichkeitsraum zu berechnen und damit die Syntheseraten zu erhalten. Dabei geht der Ansatz davon aus, dass die Mikroorganismen ihre Wachstumsrate maximieren und diese Annahme durch die

Modellierung genutzt werden kann, um zu jedem Zeitpunkt eine Prädiktion über die Ausprägung der jeweiligen Syntheseraten zu machen. Die Syntheseraten sind im gezeigten Ansatz als Netto-Syntheseraten zu betrachten, wobei auf einen Versuch auch die Umwandlung von Kohlenhydraten in TAGs gesondert zu simulieren abgesehen wurde. Zusätzlich zu den stöchiometrischen Gleichungen grenzen die in (4.19) dargestellten kinetischen Restriktionen den Möglichkeitsraum, innerhalb dessen die optimale Lösung mit Hilfe des Simplex- Algorithmus gefunden werden kann, ein.

$$\begin{bmatrix}
 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \\
 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0
 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix}
 r_{NADPH} \\
 r_{ATP} \\
 r_{X,a} \\
 r_{TAG} \\
 r_{CH} \\
 r_{NO_3^-} \\
 r_{PO_4^{3-}} \\
 r_{SO_4^{2-}} \\
 r_{m,NADPH} \\
 r_{m,ATP}
 \end{bmatrix} \leq \begin{bmatrix}
 r_{NADPH}^* \\
 r_{ATP}^* \\
 -r_{m,NADPH}^* \\
 -r_{m,ATP}^* \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 r_{NO_3^-}^* \\
 r_{PO_4^{3-}}^* \\
 r_{SO_4^{2-}}^* \\
 \left(1 - \frac{c_{TAG}(t)}{c_{TAG,max}}\right) r_{TAG,max}(t) \\
 \left(1 - \frac{c_{CH}(t)}{c_{CH,max}}\right)^n r_{CH,max}(t)
 \end{bmatrix} \quad (4.19)$$

Die ersten beiden Zeilen beschränken die Syntheseraten von NADPH r_{NADPH} und ATP r_{ATP} . Diese können maximal die durch die Photosynthese vorgegebenen Werte r_{ATP}^* und r_{NADPH}^* , die durch (4.13) und (4.14) berechnet werden, annehmen. Durch die Optimierung mit dem Simplex-Algorithmus werden zu jedem Zeitpunkt die maximalen Syntheseraten r_{ATP}^* und r_{NADPH}^* angenommen. Durch die beiden folgenden Zeilen wird festgelegt, dass der Bedarf an ATP und NADPH zur Deckung des Grundstoffwechsels, der durch die Raten $r_{m,ATP}$ und $r_{m,NADPH}$ ausgedrückt ist, immer mindestens den geforderten Raten $r_{m,ATP}^*$ (4.15) und $r_{m,NADPH}^*$ (4.16) entspricht. Zusätzliche Nichtnegativitäts-Bedingungen in den anschließenden drei Zeilen stellen sicher, dass keine der Raten der Synthesen von aktiver Biomasse, TAGs und Kohlenhydraten negativ sind. Zusätzlich sind die Aufnahmeraten der Anionen Nitrat $r_{NO_3^-}$, Phosphat $r_{PO_4^-}$ und Sulfat $r_{SO_4^-}$ durch die zugrundeliegenden Michaelis-Menten-Kinetiken der Aufnahme beschränkt. Letztere sind durch (4.20) bis (4.22) definiert.

$$r_{NO_3^-}^* = r_{NO_3^-,max}^* \frac{c_{NO_3^-}}{K_{NO_3^-} + c_{NO_3^-}} \quad (4.20)$$

$$r_{PO_4^{3-}}^* = r_{PO_4^{3-},max}^* \frac{c_{PO_4^{3-}}}{K_{PO_4^{3-}} + c_{PO_4^{3-}}} \quad (4.21)$$

$$r_{SO_4^{2-}}^* = r_{SO_4^{2-},max}^* \frac{c_{SO_4^{2-}}}{K_{SO_4^{2-}} + c_{SO_4^{2-}}} \quad (4.22)$$

Dabei bezeichnen alle r^* [g/(g·d)] die Aufnahmeraten der Anionen. c [g/l] repräsentieren die Konzentrationen der Anionen im Kulturmedium. Die Michaelis-Menten-Konstanten sind durch K [g/l] gegeben. Die kinetische Modellierung der Substrataufnahme im Übergangsbereich von unlimitiertem zu nährstofflimitiertem Wachstum, also bei sehr geringen Konzentrationen der Anionen, stand nicht im Fokus der Modellbildung. Außerdem sind die Bereiche sehr geringer Konzentrationen der Nährstoffe in der Satzkultivierung zeitlich stark beschränkt und konnten daher nicht bestimmt werden. Daher wurden die Werte der maximalen Aufnahmeraten r_{max}^* mit 1 g/(g·d) festgelegt. Damit können prinzipiell sehr hohe Aufnahmeraten erreicht werden. Den Michaelis-Menten-Konstanten wurden sehr geringe Werte von 1 mg/l zugewiesen, um eine hohe Affinität zu den Substraten zu simulieren. Eine Modellverfeinerung durch experimentelle Bestimmung der kinetischen Parameter der Substrataufnahme ist an dieser Stelle möglich.

Die letzten Zeilen beziehen empirische Beobachtungen in die Optimierung ein, denn die Akkumulation von Kohlenhydraten und Lipiden ist nicht unbeschränkt und ihre jeweilige Synthese folgt einer Sättigungskinetik. $c_{TAG}(t)$ [g/l] und $c_{CH}(t)$ [g/l] sind die Konzentrationen von Speicherlipiden und Speicherkohlenhydraten. $c_{CH,max}$ [g/l] und $c_{TAG,max}$ [g/l] die zugehörigen Maximalwerte, die sich aus den maximalen Masseanteilen der Biomasse ergaben. n ist ein Parameter, der in die phänomenologische Beschreibung der Kinetik der Kohlenhydratsynthese eingeht. Die Einführung des Parameters geht auf die Beobachtung eines schnellen Übergangs der Kohlenhydratsynthese in die Sättigung zurück. Ein ähnlicher Verlauf wurde bei der Lipidsynthese nicht beobachtet, so dass hier auf die Einführung eines vergleichbaren Parameters verzichtet wurde. Die maximalen Raten der Synthese von TAGs und Speicherkohlenhydraten $r_{TAG,max}$ [g/(g·d)] und $r_{CH,max}$ [g/(g·d)] berechnen sich wiederum aus der Beschränkung durch die ATP und NADPH-Verfügbarkeit zu:

$$r_{TAG,max}(t) = \min[Y_{TAG/NADPH} \cdot (r_{NADPH} - r_{m,NADPH}), Y_{TAG/ATP} \cdot (r_{ATP} - r_{m,ATP})] \quad (4.23)$$

$$r_{CH,max}(t) = \min[Y_{CH/NADPH} \cdot (r_{NADPH} - r_{m,NADPH}), Y_{CH/ATP} \cdot (r_{ATP} - r_{m,ATP})] \quad (4.24)$$

Damit sind die maximalen Raten von TAG und Speicherkohlenhydratsynthese lediglich durch die Verfügbarkeiten von NADPH und ATP beschränkt.

Zur Lösung der Optimierungsaufgabe muss zusätzlich die Zielfunktion formuliert werden. Sie lautet:

$$\max g = f_{X,a}^* \cdot r_{X,a} + f_{TAG}^* \cdot r_{TAG} + f_{CH}^* \cdot r_{CH} \quad (4.25)$$

$f_{X,a}^*$ [-], f_{TAG}^* [-] und f_{CH}^* [-] sind Gewichtungsfaktoren. Damit die Synthese aktiver Biomasse durch das Modell begünstigt wird, um damit dem höheren Wert für die Reproduktion der Zellen Rechnung zu tragen, muss $f_{X,a}^*$ größer sein als die Gewichtungsfaktoren für die Akkumulation beider Energiespeicherstoffe. Die Synthese der letzteren ist nicht primäres Ziel der Zellen, sondern sie findet ohnehin nur unter Stressbedingungen statt. f_{CH}^* wurde auf 1 normiert. Dementsprechend wurde ein höherer Wert von $f_{X,a}^*$ für die Gewichtung von $r_{X,a}$ eingesetzt. Zur Gewichtung der TAG-Synthese wurden die Verbrennungsenthalpien von TAGs und Kohlenhydraten verglichen. Literaturangaben beziffern die Verbrennungsenthalpie von Lipiden mit $\Delta H_{c,TAG} = 40$ kJ/g und die der Kohlenhydrate mit $\Delta H_{c,CH} = 18$ kJ/g. Das Verhältnis aus beiden Verbrennungsenthalpien wurde für f_{TAG}^* gewählt. Dieses betrug 2,2 und bezieht somit die höhere Energiedichte der Lipide im Vergleich zu Kohlenhydraten in das Modell ein.

Durch das System aus der Zielfunktion (4.30), den stöchiometrischen Restriktionen (4.18) und den kinetischen Beschränkungen (4.19) wurden der Simplex-Algorithmus [189] durch die Matlab-Funktion 'linprog' gelöst und damit die Raten der Biomassebildung $r_{X,a}$ [g/(g·d)], der Synthese von Kohlenhydraten r_{CH} [g/(g·d)] und der Speicherlipide r_{TAG} [g/(g·d)] berechnet.

4.3.8 Massenbilanzen / Berechnung der Zustandsvariablen

Die Konzentrationen der aktiven Biomasse, Lipide, Kohlenhydrate und alle Ionen-Konzentration im Medium wurden durch die Integration der folgenden Differenzialgleichung berechnet:

$$\frac{dc}{dt} = \mathbf{r}(t) \cdot \mathbf{c}_{X,a}(t) \quad (4.26)$$

In der Differenzialgleichung bezeichnet $\mathbf{r}(t)$ den Vektor aller spezifischer Syntheseraten oder Aufnahmeraten der entsprechenden Ionen zum Zeitpunkt t . Er wird durch Lösen des Simplex-Algorithmus berechnet. \mathbf{c} ist der Vektor aller Zustandsgrößen des Modells.

4.3.9 Modellvalidierung

Zur Modellvalidierung wurden experimentelle Daten aus zwei Satzkultivierungen mit NaNO_3 -Startkonzentrationen von 0,55 g/l und 1,56 g/l herangezogen (Abb. 4.13). Nach Anpassung der Parameter des Modells (Tabelle 4-6) konnten die experimentellen Daten hinreichend genau mit der Simulation beschrieben werden.

Nach anfänglicher kurzer lag-Phase wuchs die Biomasse in beiden Experimenten mit vergleichbarer Wachstumsrate an. Die Transmission sank in beiden Experimenten während des nicht-nährstofflimitierten Wachstums ab. Ebenso wurde in dieser Phase Nitrat durch die Zellen aufgenommen und verbraucht. Beim Übergang in die limitierte Phase (Tag 5 bzw. Tag 9) sank die PFD des transmittierten Lichts nicht weiter, so dass davon auszugehen war, dass die optischen Eigenschaften der Zellen nicht durch die Akkumulation von Speichermolekülen verändert wurden. Außerdem wurden unmittelbar nach Eintritt der Stickstofflimitierung Lipide und Kohlenhydrate zeitgleich synthetisiert. Dies wurde durch die lineare Programmierung in der Simulation prädiziert. Die experimentelle Vorgehensweise erlaubte keine direkte Unterscheidung zwischen Membranlipiden und TAG, jedoch wird angenommen, dass der Zuwachs der Lipide in der nährstofflimitierten Phase hauptsächlich auf einer Akkumulation von TAG beruht. Weiterhin war bemerkenswert, dass die Kohlenhydratkonzentrationen anfänglich mit hoher Syntheserate stiegen und frühzeitig in die Sättigung übergingen. Dagegen wurden Lipide über einen längeren Zeitraum akkumuliert. Im Experiment mit einer NaNO_3 -Startkonzentration von 0,55 g/l stiegen die Konzentrationen von Kohlenhydraten von 0,15 g/l zu Beginn der Kultivierung auf einen Maximalwert von mehr als 0,7 g/l (Abb. 4.13 d). Die Lipide nahmen während der Nährstofflimitierung von anfänglich 0,2 g/l bis auf ca. 1,5 g/l zu (Abb. 4.13 c). Die aktive Biomassekonzentration war in der nährstofflimitierten Phase konstant und die Zunahme der Biomassekonzentration ergab sich als Summe der Zunahme von Lipiden und Kohlenhydraten (Abb. 4.13 a). In diesem Experiment wurde keine komplette Lichtabsorption erreicht. I_{trans} blieb bei ca. $25 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ bis zum Ende der Kultivierung konstant (Abb. 4.13 e). Die größte Modellabweichung ergab sich in Bezug auf die Biomassekonzentration: hier wiesen die letzten Messwerte eine

Abweichung von 8 % zur Simulation auf. Alle weiteren Datenpunkte wurden durch die Simulation mit geringerer Abweichung beschrieben.

Tabelle 4-6: Parameter für die Modellvalidierung

Experiment	a	b	$c_{TAG,max}$	$c_{CH,max}$	n
	[m]	[m ² /g]	[g/l]	[g/l]	[-]
Gleichung	(4.7)	(4.7)	(4.19)	(4.19)	(4.19)
0,55 g/l NaNO ₃	$1,93 \cdot 10^{-1}$	$1,62 \cdot 10^{-2}$	$2,1 \cdot c_{X,a}$	$1,2 \cdot c_{X,a}$	1
1,56 g/l NaNO ₃	$8,2 \cdot 10^{-2}$	$6,39 \cdot 10^{-3}$	$> 3,5 \cdot c_{X,a}^*$	$2,2 \cdot c_{X,a}$	4,25

* Sättigung der Lipidsynthese wurde in diesem Experiment nicht beobachtet

Im Vergleichsexperiment mit einer NaNO₃-Startkonzentration von 1,56 g/l ergaben sich prinzipiell ähnliche Verläufe aller Messwerte. Die Stickstofflimitierung trat in diesem Falle später ein (Tag 9) und somit wurde die Akkumulation von Kohlenhydraten und Lipiden erst später gemessen. Die Konzentrationen von Lipiden und Kohlenhydraten stiegen um den Faktor 5 bis 6 während der Limitierung (Abb. 4.13 c/d). Das Licht wurde fast vollständig absorbiert, wie an der geringen Intensität des transmittierten Lichts zu erkennen ist (Abb. 4.13 e). Auch in diesem Fall war die größte Abweichung zwischen Modell und experimentellen Daten bei der Biomassekonzentration zu erkennen, wo wiederum eine Abweichung von ca. 8 % gegen Ende der Kultivierung gemessen wurde. In diesem Fall war kein Sättigungseffekt in Bezug auf die Lipidakkumulation zu beobachten, weil das Experiment während der Lipidakkumulationsphase abgebrochen wurde. Die Simulation zeigte, dass sich eine Variation von $c_{TAG,max}$ nicht auf das Ergebnis auswirkte, solange dieser Parameter größer als $3,5 \cdot c_{X,a}$ war. Somit wurde alleine anhand der Energiebilanzen die Lipidakkumulation hinreichend begrenzt. Der empirische Term in Gleichung (4.19) war in diesem Fall redundant.

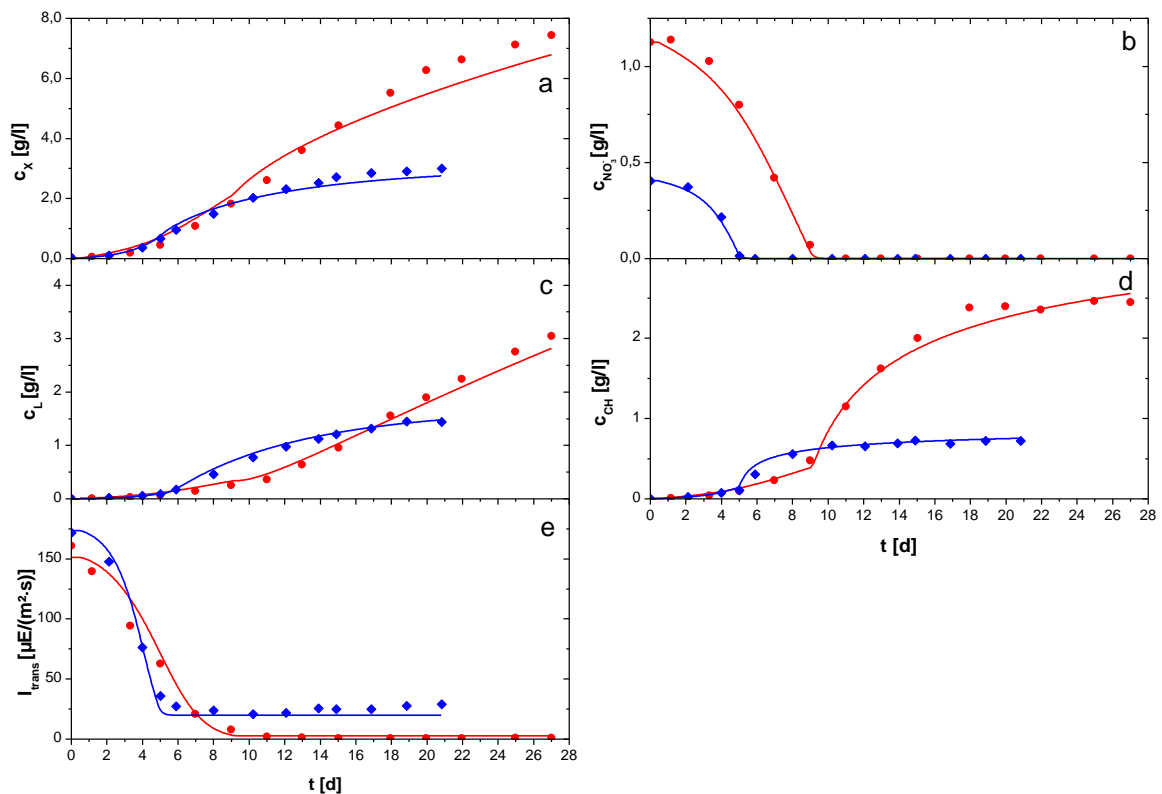


Abb. 4.13: Modellvalidierung – Simulation zweier Satzkultivierungen von *P. tricornutum*. Blau: Experiment mit einer NaNO_3 -Startkonzentration von 0,55 g/l; rot: Experiment mit 1,56 g/l NaNO_3 -Startkonzentration. Symbole: experimentelle Daten; Linien: Simulation. a: Biomassekonzentration c_x ; b: Nitratkonzentration $c_{\text{NO}_3^-}$; c: Lipidkonzentration c_L ; d: Kohlenhydratkonzentration c_{CH} ; e: PFD des transmittierten Lichts I_{trans} .

4.4 Scale-up des Prozesses und Integration von phototropher und heterotropher Kultivierung

4.4.1 Maßstabsübertragung in den Semi-Pilotmaßstab

Der Wellen-Photobioreaktor wurde am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich III: Bioverfahrenstechnik, entwickelt (siehe Kapitel 3.2.8). Er wurde als Horizontalreaktor geplant und konstruiert. Dies hat prinzipiell den Vorteil, dass der auftretende hohe Druckverlust durch Blasenbegasung in vertikal orientierten Reaktoren vermieden werden kann. Damit ist es prinzipiell möglich, den hohen Energiebedarf für die Blasenbegasung deutlich zu reduzieren. In der ersten Stufe der Reaktorentwicklung war noch die Blasenbegasung vorgesehen, jedoch

ist es möglich, durch Membranbegasung auf die Gasphase im Reaktionskompartiment zu verzichten und damit eine weitere Einsparung der benötigten Hilfsenergie zu erzielen. Durch die wellenförmige Oberfläche wird eine Oberflächenvergrößerung von 21 % erreicht, die durch eine stärkere Krümmung aber prinzipiell weiter erhöht werden kann. Durch die Lichtverdünnung im Reaktor können Lichtsättigung und Photoinhibierung reduziert oder sogar vermieden werden.

In der Konfiguration mit Blasenbegasung im Gastauscher (siehe Kapitel 3.2.8) wurde der k_{Ia} für den Massentransfer von CO_2 bestimmt, um in der frühen Phase der Reaktorentwicklung zu überprüfen, ob die Dimensionierung des Gastauschers ausreichend war und ob die gewünschte Biomasse-Produktivität generell erzielt werden kann.

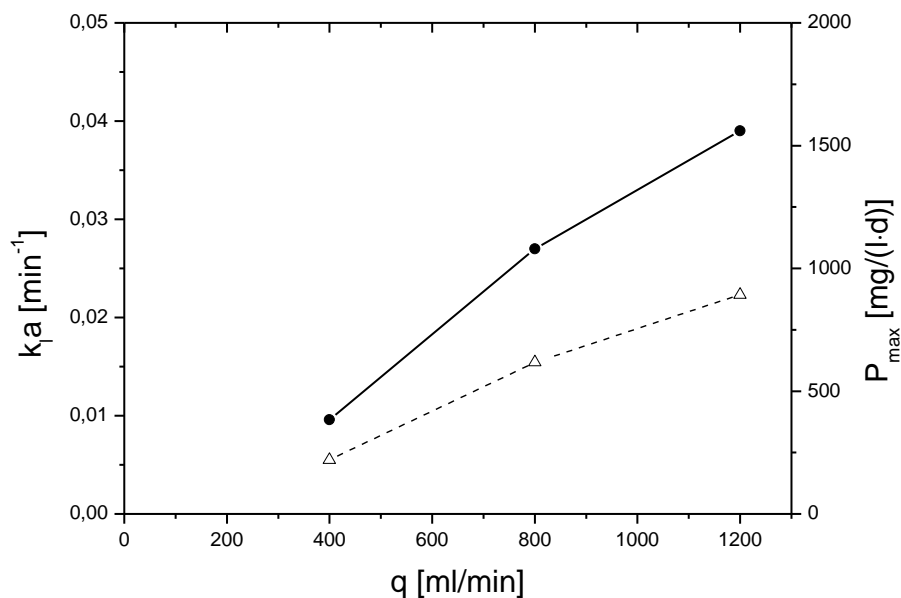


Abb. 4.14: Massentransfer im Wellenreaktor bei Begasung mit verschiedenen Gasvolumenströmen. ●: volumetrischer CO_2 -Transferkoeffizient k_{Ia} ; △: maximal erzielbare Produktivität bei einer Begasung mit 2 % CO_2 -Volumenanteil; q: Gasvolumenstrom.

Der k_{Ia} wurde bei verschiedenen Gasvolumenströmen durch die in 3.4 beschriebene Methode bestimmt. Es zeigte sich, dass der k_{Ia} durch einen Anstieg des Gasvolumenstroms deutlich gesteigert werden konnte (Abb. 4.14). Während der $k_{\text{Ia}}(\text{CO}_2)$ bei einem Gasvolumenstrom von 400 ml/min 10^{-3} min^{-1} betrug, erreichte dieser bei 1200 ml/min Gasvolumenstrom einen Wert von $4 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. Um Biomasse mit 50 % Kohlenstoffanteil zu synthetisieren kann durch Multiplikation der Biomasse-Produktivität mit dem Faktor 1,83 auf den CO_2 -Verbrauch geschlossen werden [74]. Somit konnte die erzielbare maximale Biomasse-Produktivität bei

den experimentell ermittelten k_{1a} -Werten berechnet werden. Der Massentransfer wurde mit Gleichung (3.11) berechnet. Dabei wurde angenommen, dass mit einem Volumenanteil von 2 % CO_2 im Gasstrom begast wird und sich im Kulturmedium im Fließgleichgewicht ein CO_2 -Partialdruck in der Höhe des Partialdrucks von CO_2 in der Luft einstellt. Somit konnte eine maximale Biomasse-Produktivität von 220 mg/(l·d) für den niedrigsten und 890 mg/(l·d) für den höchsten Gasvolumenstrom berechnet werden. Die maximale erzielbare volumetrische Biomasse-Produktivität betrug rechnerisch 17,8 g/(m²·d), wobei diese durch eine weitere Erhöhung des CO_2 -Volumenanteils prinzipiell weiter gesteigert werden kann. Damit war der Gasauscher ausreichend dimensioniert. Des Weiteren wurden vor und hinter der Reaktorkammer pH-Sonden installiert, welche infolge der örtlichen Konzentrationsdifferenzen im Falle eines zu geringen Massentransfers deutlich verschiedene pH-Werte anzeigen würden. Dies wurde bei den Kultivierungen (siehe Abb. 4.15 und Abb. 4.16) allerdings nicht beobachtet.

Im Reaktor herrschten bei dem Volumenstrom von 9,5 l/min im Reaktor unterschiedliche Strömungsgeschwindigkeiten und Profile. Berechnet man die Reynolds-Zahl für die Rohrströmung in dem zum Reaktor führenden Schlauch, so erhält man mit

$$\text{Re} = \frac{\rho \cdot v \cdot d}{\eta} \quad (4.27)$$

eine Reynoldszahl von $\text{Re} > 6300$. Der Vergleich mit der kritischen Reynolds-Zahl für Rohrströmungen ($\text{Re}_{\text{krit}} \approx 2300$) zeigt damit, dass in dem Schlauchstück ein turbulentes Strömungsprofil herrschte. Dabei wurden die Annahmen getroffen, dass sich die Viskosität der Suspension η [kg/(m·s)] und die Dichte ρ [kg/m³] nicht von derjenigen von Wasser bei 25 °C unterscheiden. Die charakteristische Strömungsgeschwindigkeit v betrug 0,5 m/s. Sie wurde mit der Kontinuitätsgleichung für inkompressible Flüssigkeiten berechnet. Die charakteristische Länge war der Innendurchmesser des Schlauches $d = 0,02$ m. In der Kreiselpumpe sind ebenfalls turbulente Strömungsverhältnisse anzunehmen.

Betrachtet man die Strömungsgeschwindigkeit in der Hauptreaktorkammer unter Vernachlässigung von Randeffekten, so ergibt sich mit der Kontinuitätsgleichung eine Geschwindigkeit von $9 \cdot 10^{-3}$ m/s. Um eine grobe Abschätzung der Strömungsverhältnisse zu erhalten wurde die Reynolds-Zahl unter Verwendung des Plattenabstandes von $d = 0,02$ m berechnet. Diese betrug 113. Zwar war aufgrund der fehlenden geometrischen Ähnlichkeit kein Vergleichsmaßstab verfügbar, jedoch zeigte ein Vergleich zur Rohrströmung, dass wegen der geringen Reynolds-Zahl laminare Strömung angenommen werden konnte.

Im Folgenden sind zwei Experimente gezeigt, bei denen jeweils *C. vulgaris* (Abb. 4.15) und *P. tricornutum* (Abb. 4.16) im Wellen-Photobioreaktor kultiviert wurden.

Bei der Kultivierung von *C. vulgaris* zeigte sich innerhalb der ersten 14 Tage des Prozesses, dass die optische Dichte stark anstieg und die Transmission kontinuierlich abnahm. In dieser Zeit wurde das gesamte im Kultivierungsmedium vorgelegte Nitrat durch die Algen verbraucht. Dieses wurde zur Vermeidung einer Nährstofflimitierung am 14. Tag nachgefüttert. Es wurde im Anschluss weiter durch die Kulturen aufgenommen. Am Kurvenverlauf der optischen Dichte konnte jedoch kein weiteres Wachstum abgelesen werden. Durch Agglomeration von Zellen und Rückhaltung in der Hauptreaktorkammer konnte die optische Dichte der Kultur nicht experimentell bestimmt werden, da die Probenahme in diesem Experiment in der externen Messstrecke vorgesehen war. In weiteren Experimenten wurden die Proben direkt aus der Hauptreaktorkammer gezogen. Durch einen weiterhin ansteigenden CO₂-Volumenanteil in der Zuluft, welche über den pH-Wert geregelt war, und die weitere Aufnahme von Nitrat und Sulfat wurde allerdings indiziert, dass die Biomassekonzentration auch im weiteren Verlauf des Versuches anstieg.

Die Biomassekonzentration wurde mit Hilfe der Schwefelbilanz berechnet. Aus Daten der Kultivierung von *C. vulgaris* im Rührkesselreaktor (siehe Anhang, Abb. A3.7) konnte der Ausbeutekoeffizient $Y_{x/s}$ für das Biomassewachstum bei gleichzeitigem Verbrauch von Schwefel aus dem Kulturmedium bestimmt werden. Dieser betrug 119,1 g/g. Während der Kultivierung wurde ein Sulfatverbrauch von 117 mg/l, also ein Verbrauch von 39 mg/l Schwefel, gemessen. Daraus ergab sich ein Biomassezuwachs von 4,64 g/l. Damit konnten in dem neuartigen Reaktorkonzept auch bei einer niedrigen Beleuchtungsintensität von 100 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ hohe Biomassen erreicht werden. Wie aus Abb. 4.15 ersichtlich war die Kultur ab Tag 5 bei vollständiger Lichtabsorption lichtlimitiert, so dass im Folgezeitraum lediglich lineares Wachstum stattfand. Der Gasübergang im Reaktor war nicht limitierend, wie anhand der Tatsache erkennbar war, dass kein O₂ im Reaktor akkumulierte. Der Partialdruck des O₂ in Lösung betrug temporär maximal 23,9 % des Systemdrucks und war damit zeitweilig lediglich 3 Prozentpunkte höher als der Partialdruck von O₂ in der Luft. Außerdem traten keine starken pH-Gradienten auf, wie Messungen vor Eintritt und nach Verlassen der Reaktorkammer zeigten. Somit kann auch ein kritisches Absinken des CO₂-Partialdrucks in der Lösung ausgeschlossen werden.

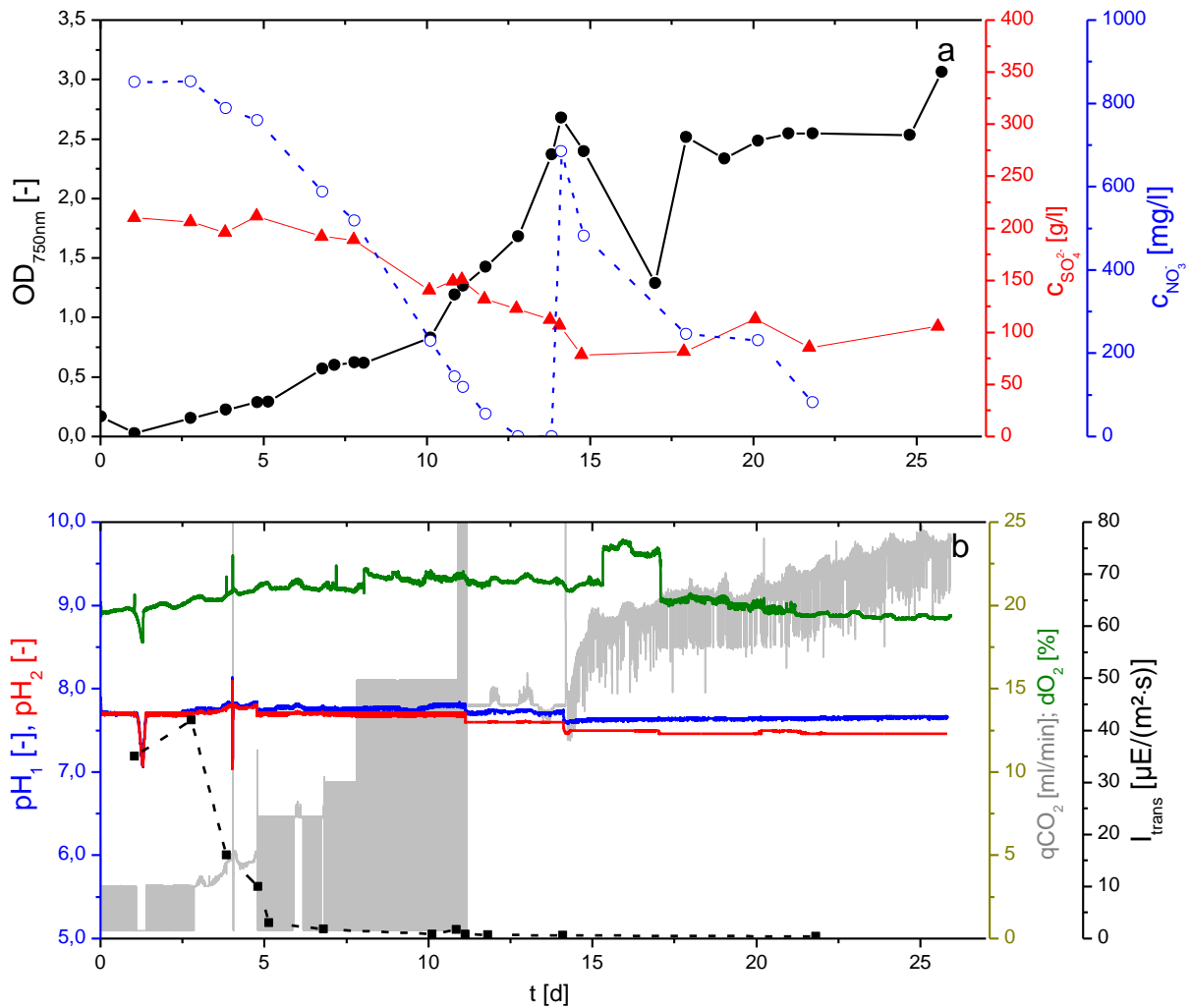


Abb. 4.15: Kultivierung von *C. vulgaris* im Wellen-Photobioreaktor. ■: PFD des transmittierten Lichts I_{trans} ; ●: optische Dichte $OD_{750\text{nm}}$ (gemessen bei 750 nm); ▲: Sulfatkonzentration $c_{\text{SO}_4^{2-}}$; ○: Nitratkonzentration $c_{\text{NO}_3^-}$; pH_1 : pH-Wert in der Messstrecke vor Eintritt in die Hauptreaktorkammer; pH_2 : pH-Wert nach Verlassen der Hauptreaktorkammer; q_{CO_2} : CO_2 -Volumstrom der Begasung; $d\text{O}_2$: O_2 -Partialdruck (in % des Systemdrucks) in der Messstrecke nach Verlassen der Hauptreaktorkammer.

Zum Scale-up des Prozesses zur Lipidbildung mit *P. tricornutum* wurde ein weiterer Versuch im Wellen-Photobioreaktor durchgeführt. Um die Stickstofflimitierung frühzeitig zu erreichen wurde eine Nitratkonzentration von 1 g/l im Medium vorgelegt. Die Kultivierung wurde gemäß den Angaben in Kapitel 3.2.8 durchgeführt.

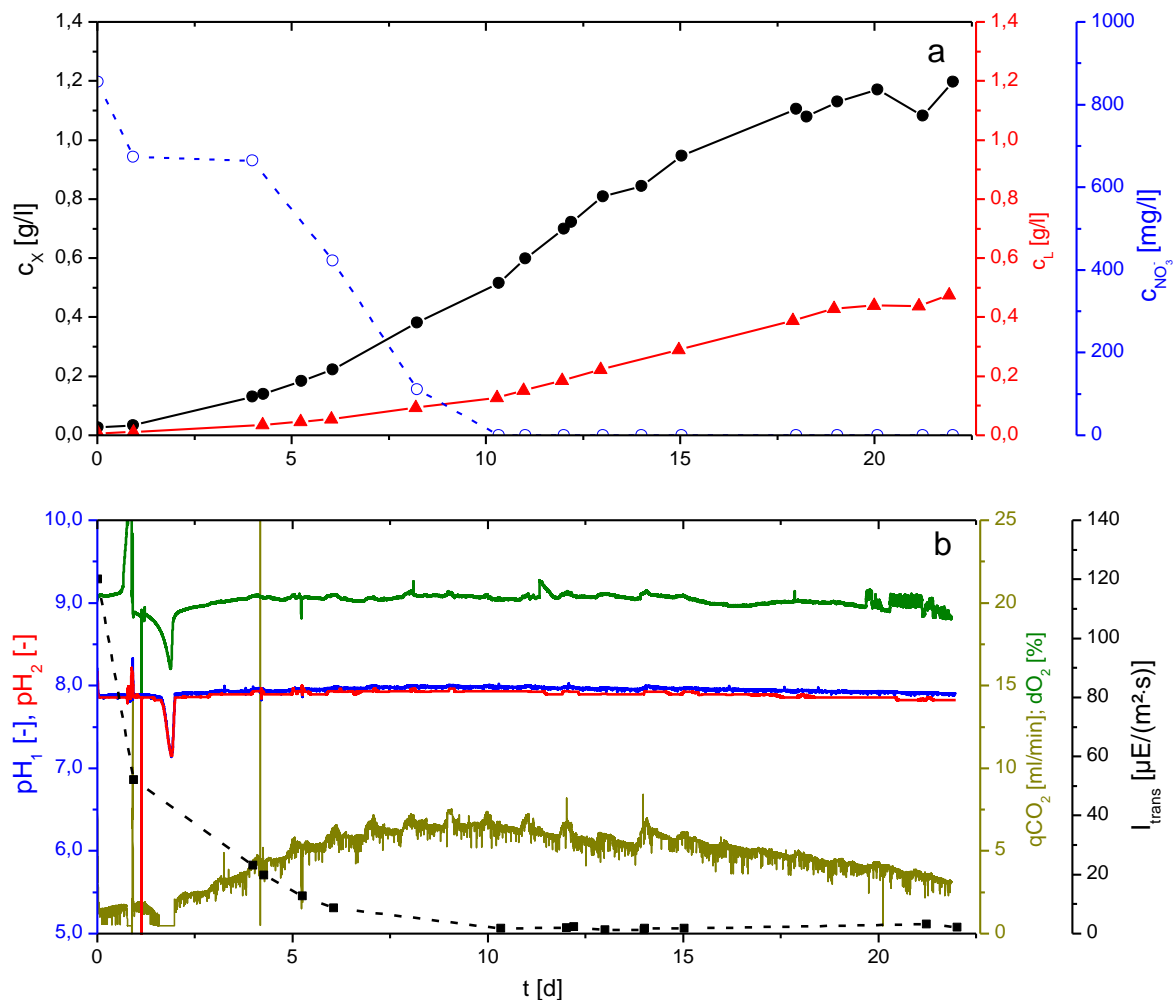


Abb. 4.16: Kultivierung von *P. tricornutum* im Wellen-Photobioreaktor. ■: PFD des transmittierten Lichts I_{trans} ; ●: Biotrockenmassekonzentration c_x ; ▲: Lipidkonzentration c_L ; ○: Nitratkonzentration c_{NO_3} ; pH_1 : pH-Wert in der Messstrecke vor Eintritt in die Hauptreaktorkammer; pH_2 : pH-Wert nach Verlassen der Hauptreaktorkammer; q_{CO_2} : CO₂-Volumenstrom der Begasung; dO_2 : O₂-Partialdruck in der Messstrecke nach Verlassen der Hauptreaktorkammer.

Die Biomasse wuchs in den ersten 10 Tagen unter Verbrauch von Nitrat bis die Stickstofflimitierung nach 10 Tagen eintrat (Abb. 4.16). Danach war lineares Wachstum mit der Synthese von Speicherlipiden zu erkennen. Außerdem war der (geregelt) CO₂-Volumenanteil in der Begasung zum Eintritt in die Nährstofflimitierung maximal, in den kommenden Tagen wegen des linearen Wachstums fast konstant und ist in den letzten Tagen wieder leicht gesunken, was auf eine reduzierte CO₂-Fixierungsrate hindeutete. Kritische Konzentrationen des gelösten Sauerstoffs traten auch bei diesem Versuch nicht auf. Der pH-Wert konnte durch die Regelung sehr gut im Bereich des Optimums (pH 7.7 +/- 0.25)

konstant gehalten werden. Insgesamt wurden im Laufe der Kultivierung 31,2 g Biotrockenmasse produziert, wobei der Lipidanteil zum Ende der Kultivierung 40 % betrug. Damit wurden 12,48 g Lipide synthetisiert. Die örtlich gemittelte Photonenflussdichte auf der Oberfläche des Reaktors betrug $83 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. Unter der Annahme, dass die spektrale Abweichung der Beleuchtungsquelle (Halogenscheinwerfer) gegenüber dem bekannten Spektrum der LED-Beleuchtungsmodule den durchschnittlichen Energiegehalt der Photonen (Gleichung (3.15)) nicht signifikant verändern, wurde mit den Gleichungen (3.15) bis (3.20) eine PCE von 3,7 % berechnet. Die Produktivitäten wurden in dem Zeitraum von Tag 8 bis Tag 14 bestimmt. Die Biomasse-Produktivität betrug dabei $86,2 \text{ mg}/(\text{l} \cdot \text{d})$ und die Lipid-Produktivität war $35,1 \text{ mg}/(\text{l} \cdot \text{d})$.

Beim Reinigen des Reaktors wurde festgestellt, dass sich Ablagerungen von Agglomeraten gebildet hatten, die nicht in der Biomassebestimmung der Suspension berücksichtigt wurden. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die tatsächlich erreichte PCE höher war als die rechnerisch bestimmte.

4.4.2 Einzeller-Ölproduktion im Semi-Pilotmaßstab durch Prozessintegration von heterotropher und phototropher Kultivierung

Durch die Prozessintegration unter Kopplung der heterotrophen Kultivierung lipidreicher Hefespezies und der phototrophen Kultivierung von Mikroalgen können prinzipiell Synergieeffekte genutzt werden. Insbesondere der Abgasstrom der heterotrophen Kultivierung kann genutzt werden, um die Algenkulturen mit CO_2 zu versorgen. Außerdem könnten Nebenproduktströme nutzbar gemacht werden und gegebenenfalls die Restbiomasse nach Ölextraktion zurückgeführt werden und den Mikroorganismen als Nährstoffquelle - insbesondere der Elemente Stickstoff, Schwefel und Phosphor - zugeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Nutzung des Abgasstroms gesetzt. Dazu wurde der in Kapitel 3.2.9 beschriebene Versuchsaufbau realisiert. Die besondere Schwierigkeit bestand darin, die Prozessdauer und die Dimensionierung beider Teilprozesse aufeinander abzustimmen, da sich die Wachstumsraten der Mikroorganismen *Phaeodactylum tricornutum* (SAG 1090-1a) und *Cryptococcus curvatus* (ATCC 20509) deutlich unterscheiden und letztere mit signifikant höherer Wachstumsrate wächst. Daher wurde eine spezielle Fütterungsstrategie gewählt, die die Prozessdauer der Fed-Batch Hefekultivierung deutlich verlängerte. Zudem musste bei der Versuchsplanung, welche durch mathematische

Simulation unterstützt wurde, berücksichtigt werden, dass der Volumenanteil von CO₂ im Abgas der heterotrophen Kultivierung erheblich schwanken und in der phototrophen Kultivierung deutliche Schwankungen des pH-Werts nach sich ziehen kann. Daher wurde im phototrophen Teil eine pH-Regelung implementiert, die größere pH-Schwankungen (+0,5/ -0,3 pH-Stufen) zuließ (siehe Kapitel 3.2.9). Die heterotrophe Kultivierungsstrategie wurde vom Partnerinstitut (Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich II: Technische Biologie) entwickelt und experimentell umgesetzt.

Durch zweimaligen Medien austausch im heterotrophen Reaktor (erkennbar an dem deutlichen Abfall der Konzentrationen von Biomasse und Lipiden und am Anstieg der NH₄⁺-Konzentration an den Tagen 6 und 11) und täglicher Zufütterung von Glucose-Lösung (erkennbar an den kleineren stufenförmigen Absenkungen der Biomassekonzentration) konnte die Prozessdauer der Fermentation von *C. curvatus* auf 18 Tage verlängert werden (Abb. 4.17 b). Nach der zweimaligen Zellernte wurde mit dem frischen Medium jeweils auch die Stickstoffquelle erneuert. Dies führte zwischenzeitlich zu nicht-nährstofflimitiertem Wachstum, während nach Tag 3, ab Tag 8 und Tag 13 wegen des Stickstoffmangels Lipide akkumulierten.

Die phototrophe Kultur erreichte nach ca. 8 Tagen die Stickstofflimitierung. Hier wurden Speicherlipide bis zum Abbruch des Experiments nach 24 Tagen synthetisiert (Abb. 4.17 a). Da beide Prozesse über den Gasstrom verbunden waren, ist in Abb. 4.17 a und Abb. 4.17 b jeweils der CO₂-Volumenanteil im Abgas aufgetragen, welcher beim Verlassen der zweiten Prozessstufe gemessen wurde. Man erkennt, wie der CO₂-Volumenanteil mit der Stoffwechselaktivität der Hefen zusammenhängt. Der signifikante Anstieg von CO₂ im Abgas nach Austausch des Mediums belegte dies. Hier hatte die verbleibende Biomasse ausreichend Nährstoffe, um mit höchstmöglicher Wachstumsrate zu wachsen. Infolge der hohen Stoffwechselaktivität wurde ein hoher CO₂-Ausstoß erreicht. Durch den hohen CO₂-Volumenanteil im Gasstrom sank folglich im Photobioreaktor der pH-Wert ab und es musste kurzzeitig mit Lauge titriert werden.

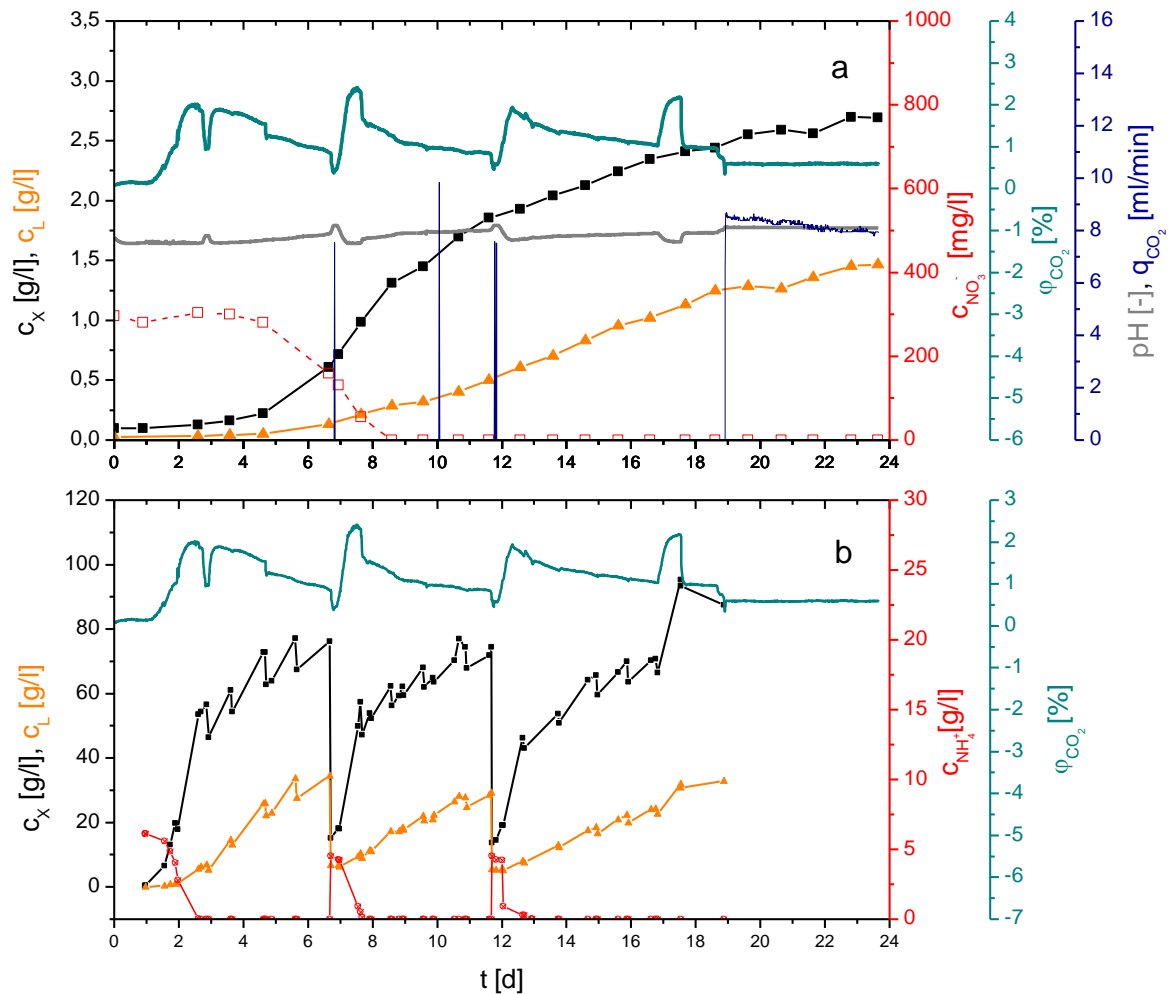


Abb. 4.17: Prozessintegration durch Kopplung von heterotropher Hefefermentation und phototropher Algenkultivierung. c_X : Biomassekonzentration; c_L : Lipidkonzentration; $c_{NO_3^-}$: Nitratkonzentration; $c_{NH_4^+}$: Ammoniumkonzentration; q_{CO_2} : CO_2 -Volumenstrom aus externer Quelle; φ_{CO_2} : Volumenanteil des CO_2 im Abgasstrom.

Bei Stickstofflimitierung der Hefen sank der CO_2 -Volumenanteil im Gasstrom kontinuierlich ab und rief im Photobioreaktor ein leichtes Ansteigen des pH-Werts hervor. Nur zu den Zeitpunkten, an welchen das Medium der Hefefermentation getauscht wurde (an Tag 6 und Tag 11), mussten zu hohe pH-Abweichungen kurzzeitig durch einen zusätzlichen CO_2 -Volumenstrom aus einer externen Quelle ausgeglichen werden. Während der restlichen Zeitdauer der Kultivierung reichte die CO_2 -Versorgung durch das Abgas der heterotrophen Kultur aus, um kontinuierlich CO_2 für die Algen bereitzustellen.

An Tag 19 wurde die Hefefermentation abgebrochen und wie im weiteren Verlauf der Algenkultivierung zu sehen ist, war ein Volumenstrom von mehr als 8 ml/min CO_2

erforderlich, um einen ausreichenden CO₂-Anteil im Gasstrom für den Stoffwechsel der Algen aufrecht zu erhalten und zugleich den pH-Wert konstant zu halten.

Insgesamt wurden mit dem Photobioreaktor 57 g Biotrockenmasse und 31 g Lipide erzeugt. Die Hefefermentation produzierte insgesamt 223 g Biomasse und 87,72 g Lipide. Der Lipidgehalt der Hefen betrug maximal 39,3 %. Die Algen wiesen gegen Ende der Kultivierung hingegen einen Lipidgehalt von 55 % auf.

4.5 Monochromatisches Licht als alternative Energiequelle für Kultivierungen von Mikroalgen

Am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich III: Bioverfahrenstechnik, wurden Beleuchtungsmodule entwickelt, die mit roten und blauen LEDs ausgestattet waren (siehe Kapitel 0.03.2.3). Mit deren Hilfe wurde die Effizienz des Wachstums von Mikroalgen in Abhängigkeit von der Lichtwellenlänge untersucht. Eine Effizienzsteigerung kann theoretisch durch Anpassung der Wellenlänge der emittierten Photonen an die Absorptionsmaxima der Pigmente erreicht werden, denn um die Elektronen in den Reaktionszentren der Photosysteme anzuregen genügt die Energie langwelliger roter Photonen mit einer Wellenlänge von 680 nm bzw. 700 nm. Bei der Absorption kurzwelligerer Photonen wird deren höherer Energieanteil durch Quenching dissipiert. Dadurch tritt bei der Beleuchtung mit Photonen im PAR-Bereich des Sonnenlicht-Spektrums nach Tredici ein Effizienzverlust von 21 % auf [34]. Zur Anpassung der Lichtwellenlänge an die Absorptionsmaxima wurden rote LEDs (L680-02AU, Epitex) mit einem Emissionsmaximum bei 680 nm und blaue LEDs (LXML-PR01-0500, Luxeon), die ein Emissionsmaximum zwischen 440 nm und 445 nm aufwiesen, kombiniert. Letztere emittierten Licht, dessen Wellenlänge mit dem Absorptionsmaximum von Chlorophyll a im blauen Bereich übereinstimmte.

Die Untersuchungen sollten zeigen, ob durch die Beleuchtung mit rotem Licht eine höhere Effizienz des Wachstums von Mikroalgen erreicht werden kann und ob die zusätzliche Beleuchtung mit blauem Licht etwa durch die Aktivierung regulatorischer Mechanismen der Zelle Auswirkungen auf die Effizienz zeigt. Zudem könnten sich bei der Aktivierung akzessorischer und sensorischer Pigmente durch die Beleuchtung mit spezifischen Lichtwellenlängen verfahrenstechnische Möglichkeiten eröffnen, wie z. B. die gezielte Beeinflussung der Pigmentierung und damit der Lichtabsorptionseigenschaften der Zellen. In

ähnlicher Weise wird dies durch gentechnische Modifikation bei der Generierung Antennen-reduzierter Mutanten angestrebt.

Die Kultivierung von *P. tricornutum* (SAG 1090-1a) in Mini-Plattenreaktoren zeigte, dass eine deutliche Steigerung der PCE bei Beleuchtung mit roten LEDs im Vergleich zur Beleuchtung mit weißen LEDs möglich war. Zur Kultivierung wurden PFDs im lichtlimitierten Bereich der PI-Kurve gewählt (siehe Abb. 4.12), um eine Aussage über den Wirkungsgrad der Lichtnutzung treffen zu können, ohne Effekte wie Lichtsättigung oder Photoinhibierung in Betracht ziehen zu müssen. Zur Berechnung der PCE-Werte wurde die Biomasse-Produktivität in jedem Experiment in der lichtlimitierten linearen Wachstumsphase gemessen. Für die Verbrennungsenthalpie der Biomasse wurde ein Wert von 20,6 kJ/g angenommen, da dieser für *P. tricornutum* im nichtnährstofflimitierten Wachstum experimentell ermittelt wurde (siehe Kapitel 4.1.2). Der Energiegehalt der roten Photonen wurde berechnet mit:

$$E_{\text{photon}} = h \cdot \frac{c}{\lambda} \cdot N_A = 176,21 \text{ kJ/mol} \quad (4.28)$$

Dabei bezeichnen h [J·s] das Plancksche Wirkungsquantum, N_A [mol⁻¹] die Avogadro-Konstante, c [m/s] die Lichtgeschwindigkeit und $\lambda = 680$ nm die Wellenlänge der roten Photonen.

Wie in Abb. 4.18 gezeigt, lag die PCE bei allen betrachteten PFDs bei Beleuchtung mit Rotlicht deutlich höher als die PCE bei Beleuchtung mit warmweißen LEDs. Die Effizienz bei Beleuchtung mit Rotlicht war im Mittel um 9 Prozentpunkte höher als diejenige bei Beleuchtung mit warmweißem Licht. Insgesamt wurden maximale PCE-Werte um ca. 20 % erreicht. Es zeigte sich also, dass das monochromatische rote Licht effizient genutzt werden konnte und ausreichte, um effizientes phototrophes Wachstum zu ermöglichen. Es muss angemerkt werden, dass aufgrund messtechnischer Beschränkungen keine Möglichkeit zur Regelung des pH-Werts und der Temperatur in den Mini-Plattenreaktoren bestand und daher größere Schwankungen bei der Bestimmung von Produktivität und PCE zu beobachten waren. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die Beleuchtung mit monochromatischem Rotlicht oder mit dichromatischem Licht (Rotlicht mit einem zusätzlichen Blauanteil von 10 % bzw. 20 %) auf die Morphologie der Zellen auswirkt. Dazu wurden Zellen gezählt und der Anteil der spindelförmigen Zellen an der Gesamtzellzahl untersucht. Hier konnten keine signifikanten Auswirkungen der Lichtfarbe auf die Morphologie festgestellt werden.

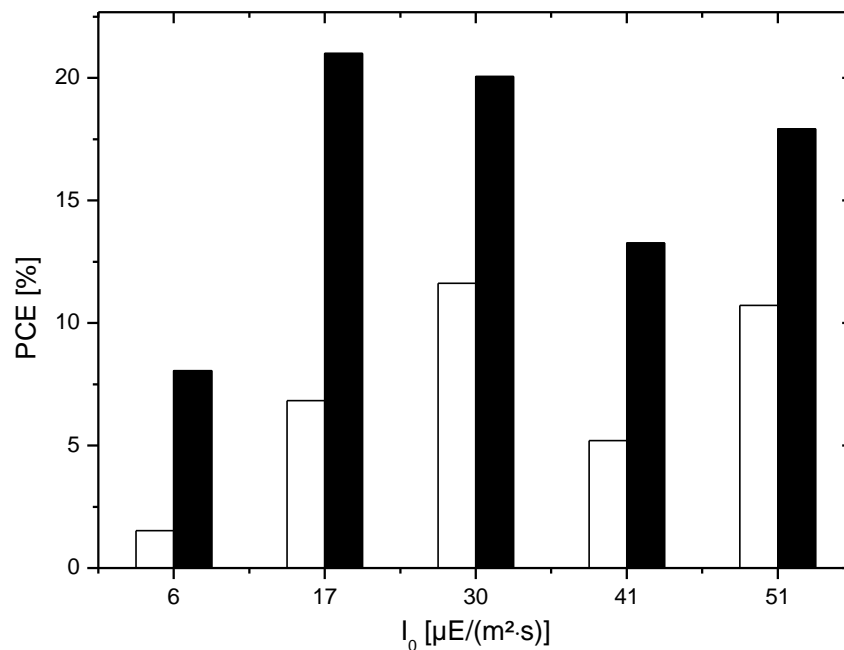


Abb. 4.18: Vergleich der PCE des Wachstums von *P. tricornutum* bei Beleuchtung mit warmweißen bzw. roten LEDs. Ausgefüllte Balken: Beleuchtung mit roten LEDs; offene Balken: Beleuchtung mit warmweißen LEDs.

Der Vergleich zwischen Beleuchtung mit monochromatischem und dichromatischem Licht wurde insbesondere bei der Kultivierung von *N. salina* betrachtet. Hier wurden die Kulturen einerseits ausschließlich mit rotem Licht beleuchtet und andererseits bei gleicher PFD mit einem Blaulichtanteil von 10 % bzw. 20 %. Der Energiegehalt blauer Photonen wurde mit (4.28) berechnet, indem die mittlere Wellenlänge im Emissionspeak von 442,5 nm zugrunde gelegt wurde. Er betrug 271 kJ/mol.

Es zeigte sich, dass der Einfluss auf die Wachstumsrate in der exponentiellen Wachstumsphase gering war. Die höchsten Wachstumsraten wurden bei monochromatischer Beleuchtung erzielt, also bei Abwesenheit des Blauanteils (Abb. 4.19 a). In Bezug auf die Effizienz des Wachstums lässt sich feststellen, dass die höchste Effizienz bei beiden untersuchten PFDs ebenfalls unter diesen Bedingungen erreicht wurde. Ein zusätzlicher Blauanteil verminderte die Effizienz leicht. Auch hier muss erwähnt werden, dass die Bestimmung der Produktivität und damit der Effizienz hohe Schwankungsbreiten zeigten, weshalb Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Der Vergleich mit der warmweißen Beleuchtungsquelle zeigte, dass bei Rotlichtbeleuchtung mit einer PFD von 47 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ eine Effizienzsteigerung um 4,8 Prozentpunkte möglich war. Ein zusätzlicher Blauanteil hat in allen Versuchen den Wirkungsgrad des Wachstums bzw. die PCE vermindert.

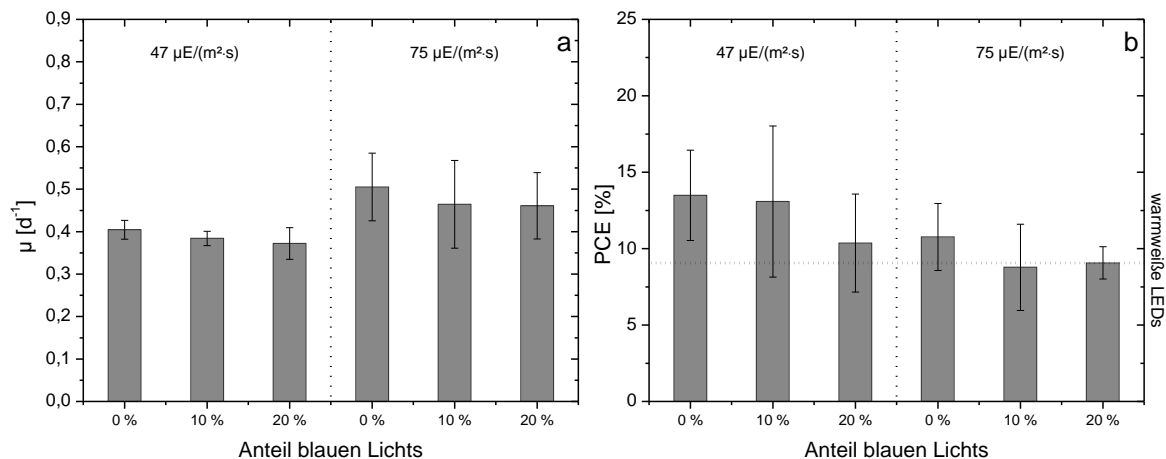


Abb. 4.19: Einfluss der Lichtfarbe auf die Wachstumsrate und die PCE des Wachstums von *N. salina*. a: Wachstumsrate von *N. salina* bei Beleuchtung mit Rotlicht und angegebenem Blauanteil. Die angegebene PFD bezeichnet die Summe der PFDs des roten und blauen Lichts. b: PCE bei Wachstum in der linearen (lichtlimitierten) Wachstumsphase. Die horizontale Linie gibt die PCE bei Beleuchtung mit warmweißen LEDs an.

Neben der Wachstumsrate und der PCE wurde auch der Effekt der Beleuchtung auf die Konzentrationsverhältnisse zwischen Chlorophyll a und Karotinoiden in *N. salina* untersucht. Durchschnittswerte aus 13 Messungen zeigten, dass die Beleuchtung mit mono- bzw. dichromatischem Licht eine Auswirkung auf die Pigmentierung der Mikroalgen hatte (Abb. 4.20). Das Verhältnis von Chlorophyll a zu Karotinoiden betrug bei Beleuchtung mit warmweißem Licht 2,3 und bei Beleuchtung mit Rotlicht 3,1. Insgesamt sank also der Anteil der Karotinoide deutlich. Dagegen zeigte ein zusätzlicher Blauanteil in der dichromatischen Beleuchtung keinen weiteren Einfluss, da auch hier ein Verhältnis von 3,1 bis 3,2 ermittelt wurde.

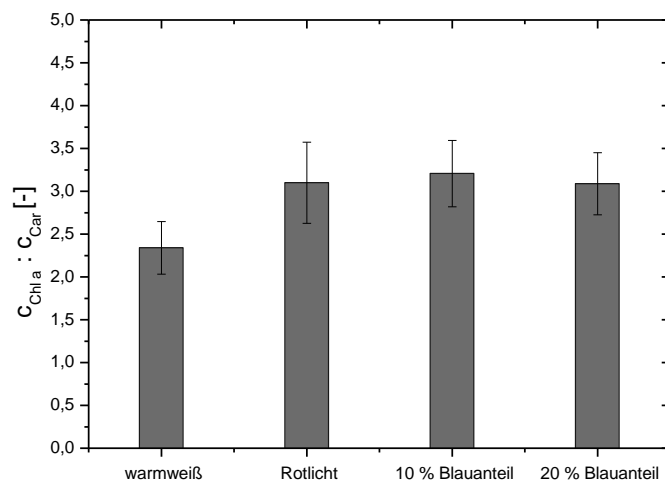


Abb. 4.20: Einfluss der Lichtfarbe auf die Pigmentierung von *N. salina*. $c_{\text{Chl a}}$: Konzentration von Chlorophyll a; c_{Car} : Konzentration von Karotinoiden. Die Beleuchtung erfolgte entweder mit warmweißen LEDs oder mit Rotlicht und dem ausgewiesenen Blaulichtanteil.

4.6 Der Einfluss gelösten Kohlenstoffdioxids auf das Wachstum von Mikroalgen und die Etablierung einer modellprädiktiven $d\text{CO}_2$ -Regelung

4.6.1 Einfluss der PFD auf das Wachstum von *C. vulgaris*

Im Vorfeld der Untersuchung des Einflusses des gelösten CO_2 auf die Wachstumsrate von *C. vulgaris* wurde die Kinetik des Wachstums der Mikroalge unter dem Einfluss verschiedener PFDs untersucht. Dies war erforderlich, da im anschließenden Versuch im Modell-Photobioreaktor zur Untersuchung der CO_2 -Kinetik PFDs eingestellt werden sollten, die maximale Wachstumsraten zulassen. Zugleich sollte ein Arbeitspunkt im Übergangsbereich von lichtlimitiertem Wachstum zum Sättigungsbereich der Lichtkinetik identifiziert werden. Somit sollte es grundsätzlich möglich sein anhand des Einflusses auf die Wachstumsrate auch den erhöhten Energiebedarf der CO_2 -konzentrierenden-Mechanismen (carbon concentrating mechanisms = CCM) zu erkennen. Die Aktivierung der CCM stellt für die Zellen einen erhöhten Energiebedarf durch die Expression beteiligter Gene und den ATP-Bedarf aktiver Transportmechanismen dar. Im lichtlimitierenden Bereich der Lichtkinetik wird – im Gegensatz zur lichtgesättigten Bereich der PI-Kurve - das erzeugte ATP und NADPH direkt verbraucht, so dass sich der zusätzliche Energiebedarf erwartungsgemäß in

sinkenden Wachstumsraten niederschlagen sollte. Daher sollte im Übergangsbereich gearbeitet werden, um sowohl maximale Wachstumsraten erreichen zu können und somit die CO₂-Kinetik vollständig zu beschreiben. Zugleich sollte dadurch auch die Möglichkeit gegeben sein einen Einfluss der CCM auf die Wachstumsrate erkennen zu können.

Zur Untersuchung der Lichtkinetik wurden bei verschiedenen PFDs Satzkultivierungen mit *C. vulgaris*, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, durchgeführt und die Wachstumsraten bestimmt. Diese stiegen zunächst mit der PFD stark an bis in einem Bereich um ca. 200 μE/(m²·s) die maximale Wachstumsrate erreicht war (Abb. 4.21). Im weiteren Verlauf schloss sich der charakteristische Sättigungsbereich der PI-Kurve an. Gleichung (4.29) erlaubte die mathematische Beschreibung des Kurvenverlaufs. Sie lehnt an die Michaelis-Menten-Gleichung an, die zur Beschreibung des Einflusses der Substratkonzentration auf die Wachstumsrate entwickelt wurde.

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot I_0}{I_0 + K_I} \quad (4.29)$$

μ [d⁻¹] ist die Wachstumsrate der Kultur und μ_{max} [d⁻¹] beschreibt als Parameter die maximal erzielbare Wachstumsrate. I_0 [μE/(m²·s)] bezeichnet die eingestrahelte PFD. K_I [μE/(m²·s)] ist ein Parameter des Systems und gibt die PFD an, bei der die halbmaximale Wachstumsrate erreicht wird.

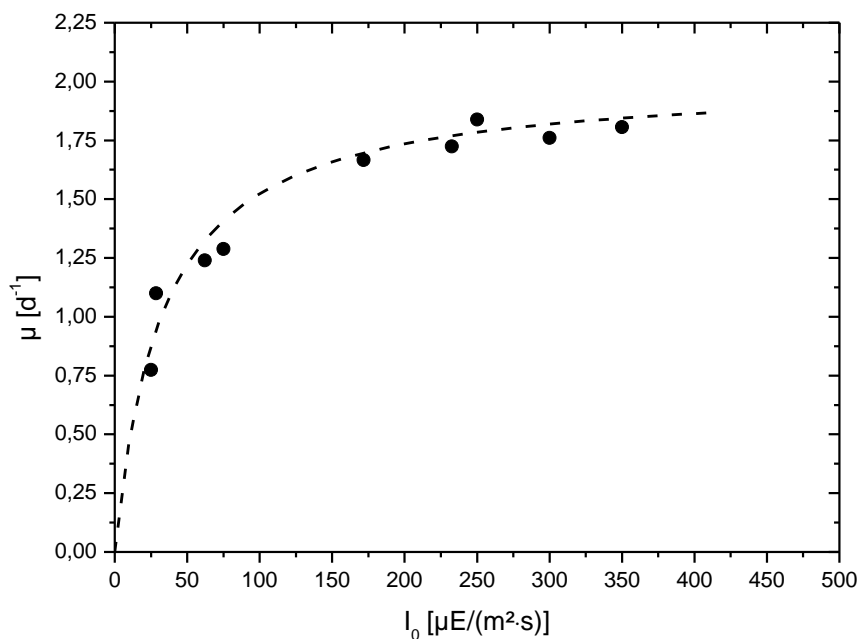


Abb. 4.21: Einfluss der PFD auf das Wachstum von *C. vulgaris*. Die Punkte stellen experimentelle Daten dar. Die Linie zeigt den durch Gleichung (4.29) beschriebenen Kurvenverlauf.

Durch Parameteranpassung wurde $\mu_{\max} = 2,02 \text{ d}^{-1}$ ermittelt. Die halbmaximale Wachstumsrate wurde bei einer geringen PFD von $32,3 \text{ } \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ bereits erreicht. Nach Auswertung der experimentellen Ergebnisse und aufgrund obiger Überlegungen wurde im Rührkessel-Modellreaktor eine PFD von $210 \text{ } \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ eingestellt.

4.6.2 Beeinflussung der Wachstumsrate durch die Verfügbarkeit von gelöstem CO_2 in der Flüssigphase

Der Einfluss des gelösten CO_2 auf die Wachstumsraten von Mikroalgen wurde in zahlreichen Studien untersucht, wobei üblicherweise die Gaszusammensetzung, d.h. der Volumenanteil des CO_2 im Gasstrom, variiert und die resultierende Wachstumsrate bestimmt wurde. Dieses Vorgehen birgt den Nachteil, dass durch den Verbrauch des CO_2 infolge der Photosynthese und durch limitierenden Massentransfer der Partialdruck des Gases in der Lösung erheblich vom Partialdruck in der Gasphase abweichen kann.

Aus diesem Grund wurde hier der kinetische Einfluss des gelösten CO_2 experimentell untersucht, indem der Partialdruck des Gases in der Lösung mit einem dCO_2 -Sensor gemessen und dieser während der Kultivierung über den Volumenanteil des CO_2 im Gasstrom geregelt wurde. Damit konnten die experimentell ermittelten Wachstumsraten den Partialdrücken exakt zugeordnet und eine Kinetik erstellt werden. Der generelle Versuchsaufbau erfolgte wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben. Abweichend davon wurde der Reaktor mit Medium gefüllt ohne zuvor den pH-Wert des Mediums einzustellen. Durch Aktivierung der pH-Regelung (Titration mit 1 M NaOH) und der Regelung des CO_2 -Volumenstroms über das Signal des dCO_2 -Sensors wurde vor dem Animpfen das Gleichgewicht mit dem gewünschten CO_2 -Partialdruck und dem gewünschten $\text{pH} = 7,5$ erreicht.

Die Experimente wurden bei einer PFD von $210 \text{ } \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ durchgeführt. Die Wachstumsraten wurden mit Hilfe des online-Spektralphotometers in einem Zeitbereich von wenigen Stunden vor und nach dem Erreichen des Kompensationspunktes (siehe Kapitel 3.2.7) berechnet. Im Falle von *C. vulgaris* war der Kompensationspunkt bei einer optischen Dichte von $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,74$ erreicht. An diesem Punkt wurde die gegenseitige Abschattung der Algen weitgehend durch den Fokussiereffekt des Lichts (infolge der zylindrischen Geometrie) kompensiert. Folglich war das Lichtfeld im Reaktor relativ homogen. Experimentell wurde die Lichtgleichverteilung bestätigt, indem die Lichtintensität innerhalb der Zellsuspension an unterschiedlichen Positionen mit differierendem Abstand von der

Rührwelle gemessen wurde. Zudem wurde die Zellsuspension stufenweise verdünnt und bei der optischen Dichte $OD_{750\text{nm}} = 0,74$ zeigte sich, dass hier die örtliche Variation der Lichtintensität minimal war.

Zur besseren Vergleichbarkeit mit Literaturangaben wurde der Partialdruck als prozentualer Anteil des Systemdrucks angegeben. Die zugehörigen Druckangaben in der Einheit Pascal sind in Tab. A3.1 im Anhang zu finden.

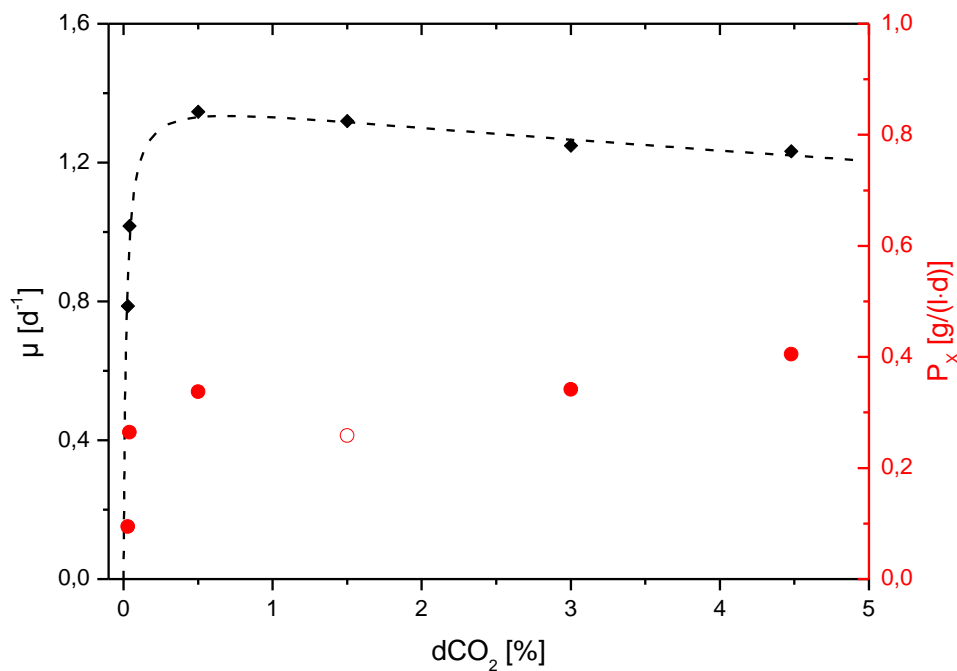


Abb. 4.22: Einfluss des gelösten CO_2 auf die Wachstumsraten der Kulturen von *C. vulgaris*. ◆: Experimentell ermittelte Wachstumsraten (Symbole) und mathematische Beschreibung der Kinetik (Linie) durch Gleichung (4.30). ●: Volumetrische Produktivität P_x der Kultur in der linearen Wachstumsphase. $d\text{CO}_2$ ist angegeben als Partialdruck in Prozent des Systemdrucks.

Die höchste Wachstumsrate von $1,35 \text{ d}^{-1}$ wurde bei einem Partialdruck von 0,5 % des Systemdrucks in der Lösung gemessen (Abb. 4.22). Bei sehr geringen Partialdrücken von CO_2 im Medium, welche kleiner als 0,5 % des Systemdrucks waren, wurde ein starker Einfluss einer Änderung des Partialdrucks auf die Wachstumsrate des Mediums gemessen. Bei $d\text{CO}_2 = 0,03 \text{ %}$ war die Wachstumsrate lediglich $0,79 \text{ d}^{-1}$. Höhere Partialdrücke, die größer als 0,5 % des Systemdrucks waren, führten dagegen zu keiner weiteren Steigerung der Wachstumsrate. Dagegen sank die Wachstumsrate bei hohem CO_2 -Partialdruck wieder. Möglicherweise spielte der osmotische Druck dabei eine Rolle, da bei hohen CO_2 -Partialdrücken vor dem Animpfen mit größeren Volumina Lauge titriert werden musste, um

den entsprechenden Gleichgewichtspunkt bei pH 7,5 zu erhalten. Eine vollständige Entkopplung von pH-Wert und dCO_2 ist generell nicht möglich.

Die CO_2 -Kinetik konnte durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot dCO_2}{dCO_2 + K_{CO_2} + \left(\frac{dCO_2}{K_{Inh}}\right)^n} \quad (4.30)$$

μ [d^{-1}] ist dabei die Wachstumsrate und μ_{max} [d^{-1}] die maximal erreichbare Wachstumsrate. K_{Inh} [-] ist ein Parameter des Inhibierungsterms. dCO_2 [-] bezeichnet die Konzentration des gelösten CO_2 und ist in Form des Partialdrucks in Lösung angegeben. K_{CO_2} [-] ist ein Parameter, der mit steigender Affinität der Mikroorganismen zum gelösten CO_2 zunimmt. Mit dem nichtlinearen Optimierungsalgorithmus von Fylstra et al. [178] wurden folgende Parameter für das System identifiziert: $\mu_{max} = 1,41 d^{-1}$, $K_{CO_2} = 0,019 \%$; $K_I = 65,9 \%$; $n = 1,85$. Damit zeigt *C. vulgaris* eine sehr hohe Affinität für die C-Quelle CO_2 , wobei von einer Beteiligung der CCMs auszugehen ist.

Eine Betrachtung der volumetrischen Produktivität P_X [$g/(l \cdot d)$] in der linearen Wachstumsphase der Kultivierungen zeigte ebenfalls einen deutlichen Einfluss des dCO_2 -Partialdruckes (Abb. 4.22). In dieser Phase, in welcher kein exponentielles Wachstum beobachtet wurde und die Kultur wegen Lichtlimitierung nur linear wuchs, war die volumetrische Produktivität beim geringsten CO_2 -Partialdruck von 0,03 % des Systemdrucks geringer als 100 $mg/(l \cdot d)$. Eine deutliche Steigerung bis auf 338 $mg/(l \cdot d)$ wurde beim Anstieg des Partialdruckes (in Lösung) bis $dCO_2 = 0,5 \%$ beobachtet. Auch danach stieg die volumetrische Produktivität noch leicht an bis auf 405 $mg/(l \cdot d)$ bei $dCO_2 = 4,5 \%$. Der Punkt bei 1,5 % dCO_2 wurde aus der Betrachtung ausgeschlossen, da hier aufgrund technischer Schwierigkeiten nach Beendigung der exponentiellen Wachstumsphase ein Teil der LED-Beleuchtungseinheit ausgefallen war. Insgesamt konnte also eine mehr als 400%ige Steigerung der volumetrischen Produktivität beobachtet werden.

4.6.3 Modellprädiktive Regelung des gelösten CO₂ über das pH-Signal

Über die chemischen Gleichgewichtsreaktionen von gelöstem CO₂, Kohlensäure, Carbonat und Hydrogencarbonat in der Lösung sind Veränderungen der Konzentration von gelöstem CO₂ und des pH-Werts gekoppelt. Eine Veränderung der Konzentration von gelöstem CO₂ bewirkt eine Verschiebung des pH-Werts, die mit Gleichung (3.14) berechnet werden kann [48]. Hierdurch eröffnet sich prinzipiell die Möglichkeit, eine modellprädiktive Regelung des gelösten CO₂ zu etablieren, welche das Signal eines pH-Sensors als indirekte Regelgröße nutzt, um damit die Regeldifferenz als Abweichung des gelösten CO₂ von der entsprechenden Führungsgröße zu berechnen. Dies ist einerseits dadurch vorteilhaft, dass pH-Sensoren im Vergleich zu dCO₂-Sensoren eine kürzere Ansprechzeit aufweisen. Letztere sind in der Regel pH-Sensoren, die vom umgebenden Medium von einer gaspermeablen aber für Flüssigkeiten impermeablen Membran abgeschirmt sind. Dadurch ergibt sich ein Diffusionswiderstand für den Durchtritt des CO₂ und eine längere Ansprechzeit des Sensors. Andererseits gehören pH-Sensoren zum analytischen Standard in der Biotechnologie und sind daher auch in der Photobiotechnologie ubiquitär verfügbar.

Die Führungsgröße, also die gewünschte Konzentration des gelösten CO₂, kann mit dem Henryschen Gesetz berechnet werden. Im Gleichgewicht entsprechen sich die Konzentrationen von CO₂ in der Lösung c_{CO_2} und an der Phasengrenzfläche $c_{CO_2}^*$ [g/l]. Es gilt nach Einstellen des Gleichgewichts:

$$c_{CO_2} = c_{CO_2}^* = K_H \cdot p \cdot M_{CO_2} \cdot \frac{q_{CO_2}}{(q_{CO_2} + q_L)} \quad (4.31)$$

K_H [mol/(l·Pa)] ist der Henry-Koeffizient für CO₂ im wässrigen System und beträgt $3,36 \cdot 10^{-7}$ mol/(l·Pa). p [Pa] ist der Systemdruck, der im offenen Reaktorsystem mit $1,013 \cdot 10^5$ Pa angenommen wurde, und M_{CO_2} [g/mol] die Molekularmasse von CO₂. Die Volumenströme von Luft und CO₂ sind gegeben durch q_L [l/s] und q_{CO_2} [l/s].

Bei einer Abweichung des pH-Wertes von der Gleichgewichtslage, wo keine Regelabweichung gemessen wird, kann mit Gleichung (3.14) auf die Regeldifferenz auf der Ebene der CO₂-Konzentration in der Lösung geschlossen werden.

Das grundlegende Modell des Reglers ist in Abb. 4.23 gezeigt. An den gezeigten Bilanzpunkten wird die zeitliche Veränderung der Konzentration von gelöstem CO₂ betrachtet. Diese wird beschrieben durch:

$$\frac{dc_{CO_2}}{dt} = k_1 a \cdot (c_{CO_2}^* - c_{CO_2}) - g(I, PCE) \quad (4.32)$$

Die Modellierung des Massentransfers von der Gasphase in die Flüssigphase ist dabei identisch mit dem Ausdruck in (3.11). Hinzu kommt ein Term, der den CO_2 -Verbrauch der Mikroalgen beschreibt. Der Verbrauch ist abhängig von der Photosyntheseleistung, also indirekt eine Funktion g der PFD des eingestrahlenen Lichts I und der Effizienz der Lichtnutzung, welche hier durch die PCE berücksichtigt wird. Der Verbrauchsterm wird in der Störgrößenaufschaltung berücksichtigt, wobei die eingestrahelte PFD der Messung durch einen zusätzlichen Sensor zugänglich gemacht werden muss. Die Konzentration von CO_2 an der Phasengrenzfläche in der Flüssigphase $c_{CO_2}^*$ wird - wie oben beschrieben - mit dem Henryschen Gesetz (3.11) berechnet. Eine weitergehende Modellierung der Gasphase findet nicht statt, da die Übergänge in der Gasphase deutlich kürzere Zeitkonstanten haben als beim Transfer in die Flüssigphase.

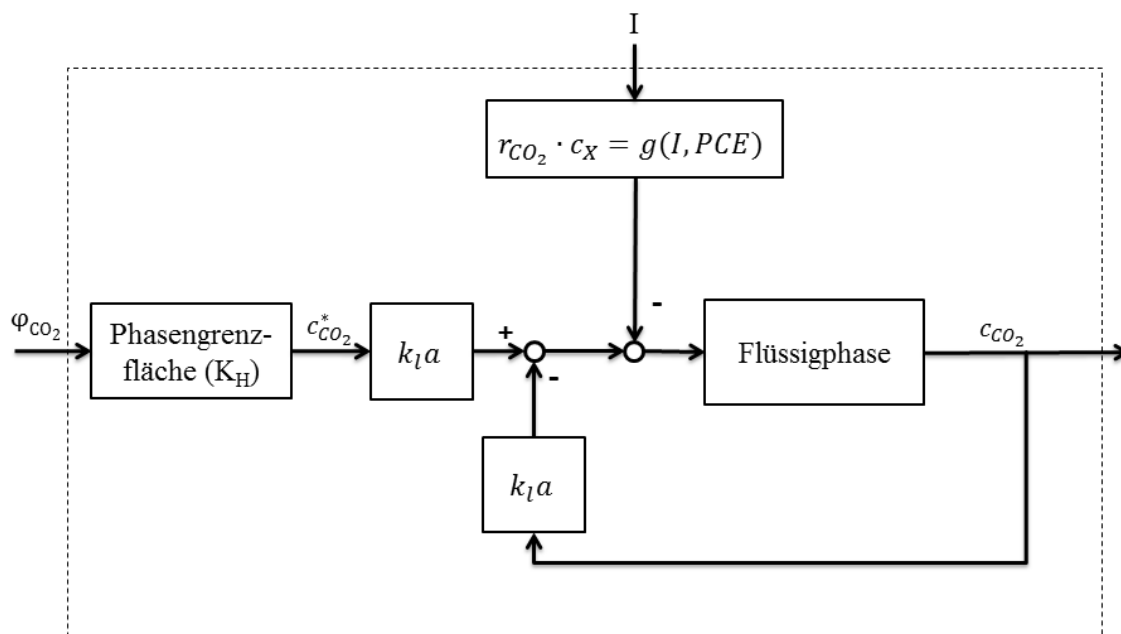


Abb. 4.23: Modellstruktur für die modellprädiktive Regelung. φ_{CO_2} : CO_2 -Volumanteil; K_H : Henry-Koeffizient für CO_2 im wässrigen System; c_{CO_2} : Konzentration des gelösten CO_2 in der Flüssigphase; $c_{CO_2}^*$: CO_2 -Konzentration an der Phasengrenzfläche; $k_1 a$: CO_2 -Transportkoeffizient; I : PFD der auf den Reaktor auftreffenden Strahlung; r_{CO_2} : spezifische CO_2 -Aufnahmerate der Biomasse; c_X : Biomassekonzentration.

Das zu regelnde System ist linear und zeitinvariant. Aufgrund der Linearität gilt das Superpositionsprinzip. Die Umsetzung des Reglers orientiert sich stark an der Struktur der

Dynamic Matrix Control (DMC), wie sie beispielsweise von Camacho und Bordons beschrieben wurde [158]. Dabei wird zu jedem Ausführungszeitpunkt eine Minimierung der Abweichung berechneter Systemzustände in zukünftigen Zeitpunkten von der Referenz-Trajektorie durchgeführt. Die prädizierten Zustände $\hat{y}_{(N,1)}$ des Systems, die für alle diskreten Zeitschritte N des Prädiktionshorizonts berechnet werden, ergeben sich durch:

$$\hat{y} = H \cdot u + f \quad (4.33)$$

Die durch den Vektor $\hat{y}_{(N,1)}$ bezeichneten Systemzustände sind die Konzentrationen des gelösten CO₂ in der Flüssigphase. $f_{(N,1)}$ ist die freie Antwort des Systems und beinhaltet alle zukünftigen Systemzustände, die sich ohne eine weitere Änderung der Stellgröße für alle Zeitschritte N ergeben würden. Ihre Berechnung ist weiter unten dargestellt. $u_{(M,1)}$ bezeichnet den Vektor aller zukünftigen Stellgrößenänderungen.

$$u = \begin{bmatrix} \Delta u_{t+1} \\ \Delta u_{t+2} \\ \Delta u_{t+3} \\ \vdots \\ \Delta u_{t+M} \end{bmatrix} \quad (4.34)$$

Stellgrößenänderungen sind in dem Algorithmus des gezeigten CO₂-Reglers die Änderungen der CO₂-Konzentrationen an der Phasengrenzfläche $\Delta c_{CO_2}^*$ [g/l]. Aus diesen wird die notwendige Änderung des CO₂-Volumenstroms q_{CO_2} am Aktuator, dem CO₂-Massendurchflussregler, berechnet. Die Dimension des Vektors $u_{(M,1)}$ unterscheidet sich für $N \neq M$ von der Dimension der andern Vektoren, da die Optimierungsaufgabe nur über M Zeitschritte (mit $M \leq N$) erfolgt und nicht über den gesamten Prädiktionshorizont N.

$H_{(N,M)}$ ist die systembeschreibende Matrix und beinhaltet die Sprungantwortkoeffizienten h_x der Übergangsfunktion bei einem Einheitssprung für alle zukünftigen Zeitschritte x.

$$H = \begin{bmatrix} h_1 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ h_2 & h_1 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ h_3 & h_2 & h_1 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ h_N & h_{N-1} & h_{N-2} & h_{N-3} & \dots & h_{N-M+1} \end{bmatrix} \quad (4.35)$$

Die Bestimmung der Sprungantwortkoeffizienten erfolgte mit dem Zwei-Film Modell [177] des Massentransfers (siehe Gleichung (3.11)). Mit der Lösung der Differentialgleichung im Zeitbereich ergibt sich für die Änderung der CO₂-Konzentration im Intervall Δt bei sprunghafter Veränderung der CO₂-Konzentrationsdifferenz zwischen der Phasengrenzfläche und Flüssigphase $\Delta c'_{CO_2}$ folgende Konzentrationsänderung in der Flüssigphase Δc_{CO_2} :

$$\Delta c_{CO_2} = \Delta c'_{CO_2} \cdot (1 - e^{-k_1 a \cdot \Delta t}) \quad (4.36)$$

Damit können die Sprungantwortkoeffizienten h_x für alle zukünftigen Zeitschritte x der Länge T [min] bestimmt werden mit:

$$h_x = 1 - e^{-k_1 a \cdot T \cdot x} \quad (4.37)$$

Die experimentelle Bestimmung der CO_2 -Transportkoeffizienten $k_1 a$ erfolgte wie in Kapitel 3.4 beschrieben. Um die experimentell beobachtete Totzeit t' zu berücksichtigen, die sich u. a. aus der Schlauchstrecke der Begasung ergab, wurde (4.37) erweitert:

$$h_x = \max[0, (1 - e^{-k_1 a \cdot (T \cdot x - t')})] \quad (4.38)$$

Die freie Antwort beschreibt das Systemverhalten ohne weitere Änderungen der Stellgröße, die sich einzig aufgrund des aktuellen Messwertes und vergangener Stellgrößenänderungen ergeben. Die Berechnung von c_{CO_2} für alle zukünftigen Zeitschritte k des Prädiktionshorizonts N werden als $f(t + k)$ bezeichnet. Die Berechnung erfolgt nach:

$$f(t + k) = c_{CO_2,t} + \sum_{i=1}^{N'} \Delta u(t - i) \cdot (G_{k+i} - G_i) \quad (4.39)$$

Die aktuelle Ausführungszeit des Reglers wird mit t bezeichnet. Der Vektor $G_{(N+N',1)}$ enthält die Sprungantwortkoeffizienten nach (4.39) für $N+N'$ Zeitschritte. N' bezeichnet die Anzahl der vergangenen Stellgrößenänderungen, die in der Berechnung der freien Antwort berücksichtigt werden. Diese werden in Matrixform gespeichert und gemäß dem „moving horizon“ Prinzip wird die letzte Änderung der Stellgröße gespeichert und alle weiteren Elemente werden um eine Position weitergeschoben. Die Stellgrößenänderung, welche vor N' Zeitpunkten implementiert wurde, wird entsprechend nicht weiter im Vektor gespeichert und im nächsten Zyklus nicht berücksichtigt.

Mit der Kenntnis der freien Antwort f und der systembeschreibenden Matrix H ist prinzipiell die Berechnung der Prädiktion nach Gleichung (4.33) möglich, allerdings müssen dazu die Änderungen der Stellgröße bekannt sein. Diese werden durch einen Optimierungsalgorithmus berechnet. Die zugehörige Zielfunktion lautet:

$$\min J = \sum_{i=1}^N [\hat{y}(t + i) - w(t + i)]^2 + \sum_{i=0}^N [\lambda \Delta u(t + i)]^2 \quad (4.40)$$

J repräsentiert die Kostenfunktion der Optimierungsaufgabe. Dabei werden durch den ersten Summanden die Abweichungen der prädizierten CO₂-Konzentrationen $\hat{y}_{(N,1)}$ von der vorgegebenen Trajektorie $w_{(N,1)}$ zu allen Zeitpunkten des Prädiktionshorizonts minimiert. Die Trajektorie besteht in der Regel aus einem Vektor, deren Elemente die gewünschte CO₂-Konzentration, also die Führungsgröße, beinhalten. Durch den zweiten Summanden werden starke Änderungen der Stellgröße verhindert, indem diese mit dem Gewichtungsfaktor λ [-] multipliziert werden.

Der Matlab-Algorithmus „fmincon“ lässt die Beschränkung der Lösung zu. Dies wurde genutzt, um bei der Optimierung von $u_{(M,1)}$ die physikalischen Beschränkungen des verwendeten Massendurchflussreglers zu berücksichtigen. Bei gegebener Begasungsrate q_L konnte durch diesen ein CO₂-Volumenanteil zwischen 0,4 % bis 8,0 % eingestellt werden. Daher wurden die beiden folgenden Beschränkungen eingeführt:

$$u(1) \leq (0,08 - \varphi_{CO_2,t-1}) \cdot K_H \cdot p \cdot M_{CO_2} \quad (4.41)$$

$$u(1) \geq (0,004 - \varphi_{CO_2,t-1}) \cdot K_H \cdot p \cdot M_{CO_2} \quad (4.42)$$

Der letzte eingestellte CO₂-Volumenanteil der Begasung zur Ausführungszeit des Regelalgorithmus wird mit $\varphi_{CO_2,t-1}$ [-] bezeichnet. K_H [mol/(l·Pa)] ist die Henry-Konstante, p [Pa] der Systemdruck und M_{CO_2} [g/mol] die molare Masse des CO₂.

Aus der Änderung der CO₂-Konzentration an der Phasengrenzfläche, die sich aus dem ersten Element des Vektors u ergibt, kann über das Henrysche Gesetz auf den CO₂-Volumenanteil $\varphi_{CO_2,t}$ [-] in der Gasphase geschlossen werden mit:

$$\varphi_{CO_2,t} = \varphi_{CO_2,t-1} + \frac{u(1)}{K_H \cdot p \cdot M_{CO_2}} \quad (4.43)$$

Der einzustellende CO₂-Volumenstrom q_{CO_2} [ml/min] ergibt sich schließlich mit:

$$q_{CO_2} = \frac{\varphi_{CO_2,t}}{1 - \varphi_{CO_2,t}} \cdot q_L \quad (4.44)$$

Hierbei wurde der CO₂-Anteil im Volumenstrom der Luft q_L vernachlässigt. Dieser sollte aber berücksichtigt werden, wenn eine Regelung bei geringerem CO₂-Partialdruck erfolgen soll. Der Volumenstrom wird an den Massendurchflussregler übermittelt, der als Aktuator des Systems fungiert.

Das phototrophe Wachstum der Algen führt zum Verbrauch von CO_2 und kann als Störung des Systems angesehen werden. Wird ein konkreter Wert für die PCE angenommen, so kann der Verbrauchsterm in (4.32) abgeschätzt werden mit:

$$g(I, PCE) = I_t \cdot \frac{A}{V} \cdot PCE \cdot \frac{E_{\text{photon}}}{\Delta H_{c,x}} \cdot 1,8 = d \quad (4.45)$$

Die PFD bzw. Störgröße I [$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] muss dabei etwa durch einen Photosensor gemessen werden. Unter Einbeziehung des Verhältnisses von Oberfläche A [m^2] zum Volumen V [m^3] und des Energiegehalts der Photonen E_{photon} [kJ/mol] sowie der Verbrennungsenthalpie der Biomasse $\Delta H_{c,x}$ [J/g] wird die zeitliche Änderung der Biomassekonzentration berechnet. Der Faktor 1,8 g/g ist der CO_2 -Bedarf für das Wachstum von Biomasse mit 50 % Massenanteil Kohlenstoff [61] und ist damit das Inverse des Ausbeutekoeffizienten Y_{X,CO_2} . Somit ergibt sich die zeitliche Änderung der CO_2 -Konzentration in Lösung („disturbance“ d [$\text{g}/(\text{l} \cdot \text{s})$]), die aus dem Verbrauch durch phototrophes Wachstum der Mikroalgen resultiert. Löst man die Differentialgleichung (4.32) im Zeitbereich, so erhält man folgende Gleichung für die zeitliche Entwicklung der CO_2 -Konzentration bei gleichzeitigem Verbrauch von CO_2 :

$$c_{\text{CO}_2,t} = c_{\text{CO}_2,0} + \left(c_{\text{CO}_2}^* - \frac{d}{k_1 a} \right) \cdot (1 - e^{-k_1 a \cdot \Delta t}) \quad (4.46)$$

Zur Berücksichtigung des Verbrauchsterms in der Störgrößenaufschaltung wurde die Zielfunktion J (4.40) durch Anpassung der Prädiktion in Gleichung (4.33) modifiziert. Dementsprechend wird die Prädiktion \hat{y} berechnet mit:

$$\hat{y} = H \cdot \left(u - \frac{d'}{k_1 a} \right) + f \quad (4.47)$$

Dabei geht die Annahme ein, dass die aktuell gemessene Störgröße auch in zukünftigen Zeitschritten keine Änderung erfährt. Der Störgrößenvektor ist $d'_{(M,1)}$. Man erkennt, dass in Übereinstimmung mit Abb. 4.23 der Störung am gezeigten Bilanzpunkt entgegengewirkt werden kann, indem die Konzentration an der Phasengrenzfläche um $d/k_1 a$ gesteigert wird. Hierbei ist durch Division mit dem $k_1 a$ bereits die Kinetik des Massentransfers berücksichtigt.

4.6.4 Experimentelle Ermittlung des $k_1 a$ im Rührkesselreaktor

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, wurde der CO_2 -Transportkoeffizient $k_1 a$ [min^{-1}] im Rührkessel-Photobioreaktor bestimmt. Hierzu wurde nach anfänglicher Begasung mit einem

Gasvolumenstrom von 100 ml/min und einem CO₂-Volumenanteil von 0,8 % ein Sprung durchgeführt, indem der CO₂-Volumenanteil der Zuluft auf 1,5 % erhöht wurde (Abb. 4.24). Nachdem die Übergangsdynamik für die Veränderung des pH-Werts und des Messsignals des gelösten CO₂ aufgezeichnet wurde, wurde erneut ein Sprung durchgeführt, indem der Volumenanteil des CO₂ auf 1,0 % reduziert wurde. Die experimentellen Daten wurden mit den simulierten Daten des durch Gleichungen (3.11) bis (3.14) definierten Modells beschrieben. Dazu wurde der k_{1a} als einziger Parameter des Systems angepasst und führte zu einer hinreichend genauen Beschreibung der experimentellen Daten bei einem Wert von $k_{1a} = 0,042 \text{ min}^{-1}$.

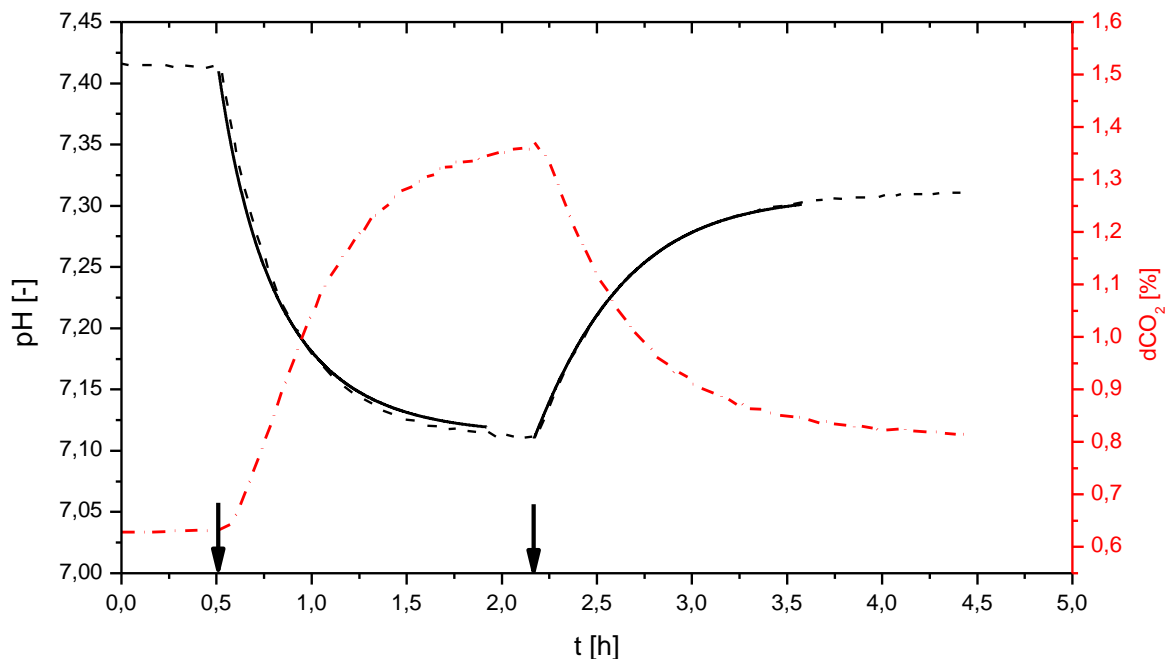


Abb. 4.24: Bestimmung des k_{1a} im Rührkesselreaktor. Die Pfeile zeigen Änderungen des CO₂-Volumenanteils in der Zuluft von ursprünglich 0,8 % zu 1,5 % und schließlich zu 1,0 % an. $d\text{CO}_2$: Partialdruck von CO₂ in Lösung (Angabe als prozentualer Anteil des Systemdrucks). Durchgezogene Linien repräsentieren simulierte Modelldaten, die durch Parametervariation (Variation des k_{1a}) an die experimentellen Ergebnisse angepasst wurden.

4.6.5 Experimentelle Untersuchung der modellprädiktiven Regelung des $d\text{CO}_2$ über das Signal des pH-Sensors

Um das Verhalten des Reglers im realen System zu untersuchen wurden Kultivierungen von *C. vulgaris* im Rührkesselreaktor durchgeführt. Da Licht als wichtigste Störgröße im System betrachtet werden kann und sich eine Änderung der PFD in einer Änderung der

Verbrauchsrate von gelöstem CO_2 niederschlägt, wurden die Kulturen mit zyklisch wechselnden PFDs beleuchtet. Die Länge der Tagphasen betrug jeweils 16 h und diejenige der Nachtphasen 8 h. In der gezeigten Kultivierung (Abb. 4.25) wurde der Reaktor während der Tagphasen zunächst mit einer PFD von $I_0 = 263 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ beleuchtet und später mit einer PFD von $I_0 = 368 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. An den Tagen 3, 5 und 10 wurden kürzere Beleuchtungszyklen von wenigen Minuten Länge getestet (siehe Abb. 4.27). Die pH-Regelung erfolgte mit dem in Kapitel 4.6.3 dargestellten modellprädiktiven Regler mit implementierter Störgrößenaufschaltung. Der Prädiktionshorizont umfasste $N = 40$ Zeitschritte der Länge $\Delta t = 30 \text{ s}$. Der Regler wurde alle 30 s ausgeführt. Die gemessene Totzeit des Systems von $t^* = 30 \text{ s}$ wurde gemäß Gleichung (4.38) berücksichtigt. Der eingestellte pH-Sollwert betrug pH 7,5 und die eingestellte CO_2 -Konzentration war 15 mg/l. Diese wurde mit (4.31) berechnet. Vor dem Inokulieren und dem ersten Ausführen des Regelalgorithmus wurde der pH-Wert der Kultur durch Titration mit HNO_3 und NaOH bei einem CO_2 -Volumenanteil von 1 % in der Begasung auf den Wert pH 7,5 eingestellt. Die weiteren Parameter des Reglers waren $k_{\text{Ia}} = 0,042 \text{ min}^{-1}$ - gemäß der in Kapitel 4.6.4 dargestellten Bestimmung - und $\lambda = 0,02$. Die PCE der Lichtnutzung ging in die Störgrößenaufschaltung ein. Sie wurde mit $\text{PCE} = 3 \%$ angenommen. Um der geringeren Biomassekonzentration zu Beginn der Kultivierung Rechnung zu tragen, wurde zunächst eine PCE von 1 % in den ersten drei Tagen angenommen. Während der Nachtphasen wurde der Regelalgorithmus nicht ausgeführt, sondern ein Grundstrom von 0,8 ml/min eingestellt. Damit wurde ein Gasvolumenanteil von 0,8 % CO_2 eingestellt, um zusammen mit dem CO_2 -Ausstoß der Algen durch Atmung einen Partialdruck von 1 % (des Systemdrucks) CO_2 zu realisieren. Zugleich wurde der pH nachts mit 0,5 M HNO_3 auf pH 7,5 titriert.

Man erkennt in Abb. 4.27, dass die Biomasse während der Tagphasen wuchs und im selben Zuge der CO_2 -Volumenstrom anstieg, um den höheren CO_2 -Bedarf der Algen zu decken. Zugleich zeigte sich, dass der CO_2 -Partialdruck bei konstantem pH-Wert während der Tagphasen leicht anstieg. Nachts musste jeweils mit HNO_3 auf pH 7,5 titriert werden, um wieder das Ausgangsgleichgewicht von 1 % CO_2 -Partialdruck bei einem konstanten pH-Wert von 7,5 zu erreichen. Insgesamt deutete dies darauf hin, dass der Verbrauch von Medienkomponenten durch die Algen den pH-Wert des Mediums änderte und dieser während der Tagphasen durch einen erhöhten CO_2 -Volumenanteil in der Begasung kompensiert werden musste. Die Regelgüte des pH-Reglers war ausreichend, um die Regelabweichung auf $\pm 0,02$ pH-Stufen zu begrenzen. Zu Beginn der Tagphasen wurde der Regelalgorithmus nach

konstanter Begasung mit einem definierten CO_2 -Volumenanteil während der Nacht neu gestartet und es mussten zunächst wenige vergangene Stellgrößenänderungen Δu aufgezeichnet werden, damit der Regler mit geringster Regelabweichung funktionierte.

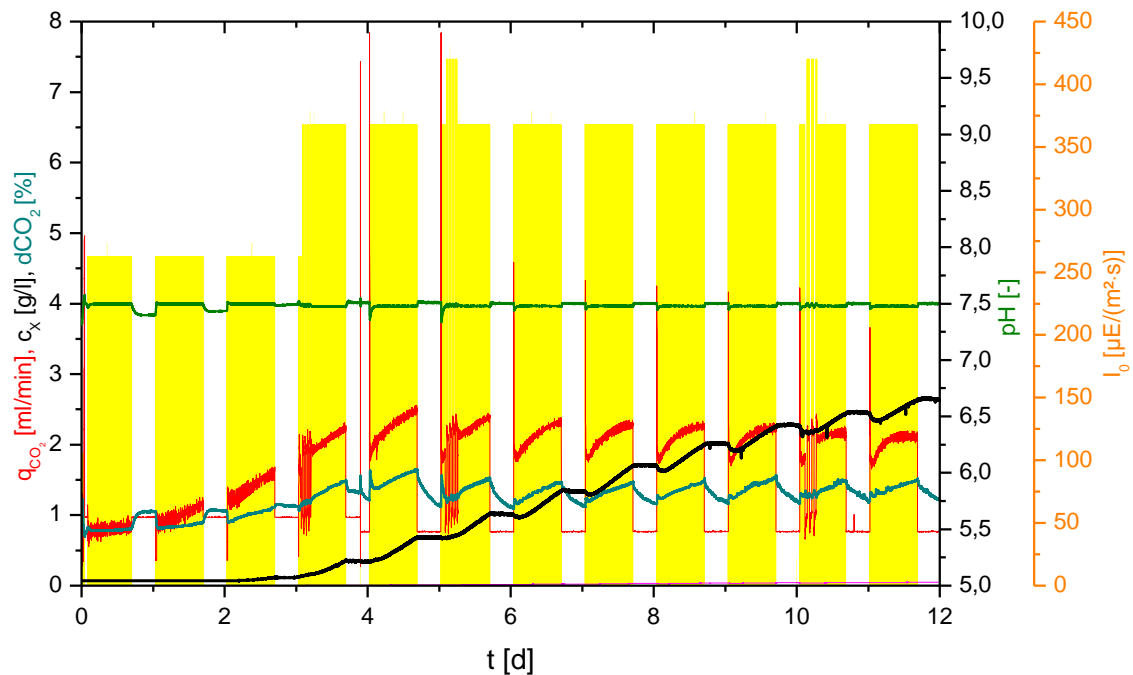


Abb. 4.25: Modellprädiktive pH-Regelung während der Kultivierung von *C. vulgaris*. Die Kultivierung erfolgte bei Tag-Nacht-Zyklen mit 16 h Beleuchtung und 8 h Dunkelheit. An den Tagen 3, 5 und 10 wurden Beleuchtungszyklen mit kürzeren Intervalllängen getestet. I_0 : Intensität des eingestrahlt Lichts; q_{CO_2} : CO_2 -Volumenstrom; d_{CO_2} : Partialdruck von CO_2 in Lösung (Angabe als prozentualer Anteil des Systemdrucks); c_x : Biomassekonzentration.

Die Regelgüte und Funktionalität des Reglers konnten insbesondere während der kürzeren Beleuchtungszyklen und sprunghaften Variationen der Lichtintensität genauer untersucht werden (Abb. 4.27). Die Arbeitsweise des Regelalgorithmus bei sprunghafter Veränderung der PFD ist in Abb. 4.26 gezeigt. Die zugehörigen Datensätze (Prädiktion, freie Antwort, Stellgrößenänderungen) wurden dabei während der Kultivierung und Ausführung des Regelalgorithmus aufgezeichnet und bilden damit reale Berechnungen während des experimentellen Tests des Reglers ab. Man erkennt anhand des Verlaufs der freien Antwort, dass die Konzentration von gelöstem CO_2 bei sprunghafter Reduktion der Lichtintensität

(Abb. 4.26 A) und Ausbleiben der Anpassung der Stellgröße steigen würde. Um die positive Regelabweichung zu verhindern sind die Stellgrößenänderungen Δu zunächst negativ.

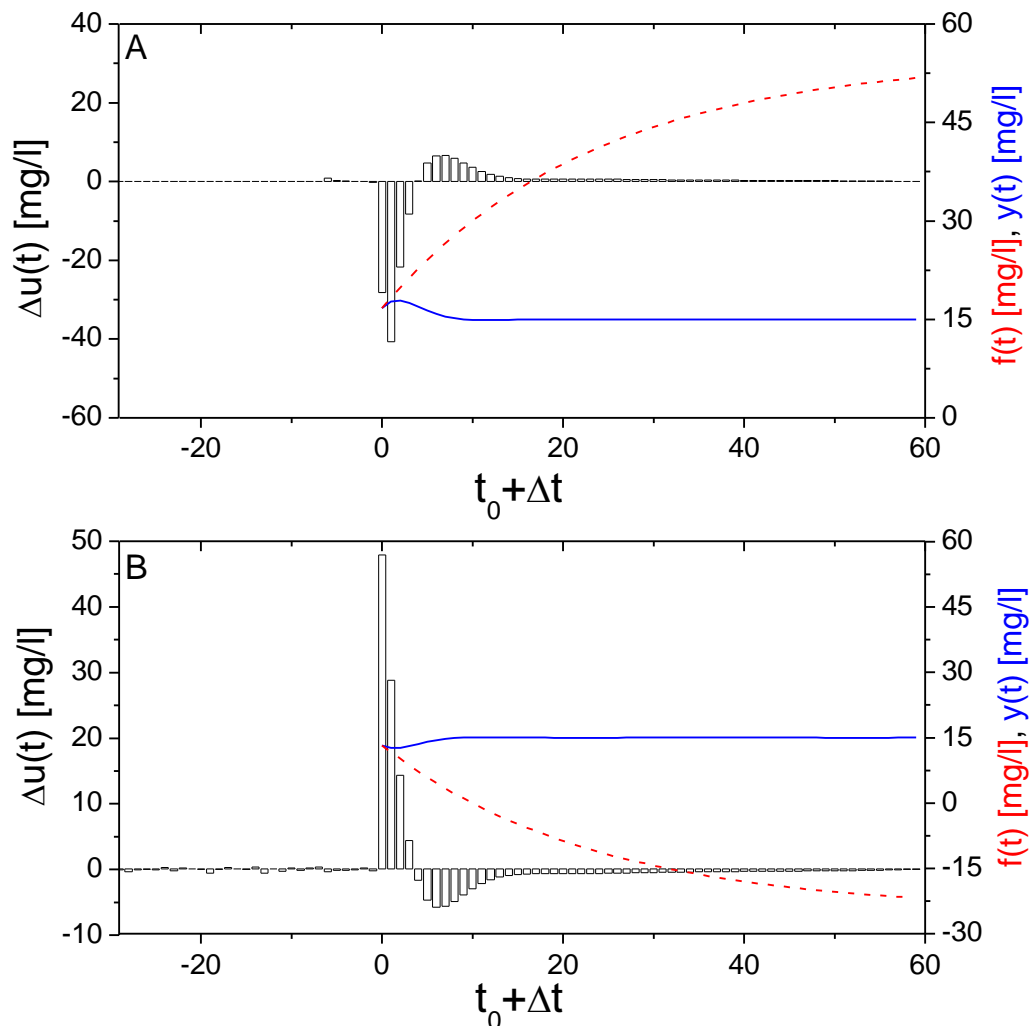


Abb. 4.26: Reaktion des Reglers auf sprunghafte Änderungen der Lichtintensität. $t_0 = 0$: Ausführungszeitpunkt, $\Delta u(t)$: Stellgrößenänderung; $f(t)$: freie Antwort des Systems; $y(t)$: Prädiktion der CO_2 -Konzentration zum Zeitschritt t . A: Sprung von $I_0 = 420 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ nach $I_0 = 53 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ zwischen den Zeitpunkten t_0-1 und t_0 ; B: Sprung von $I_0 = 53 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ nach $I_0 = 420 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ zwischen den Zeitpunkten t_0-1 und t_0 .

Weil der Parameter λ in Gleichung (4.40) einen positiven Wert annimmt, wird dabei die Grenzflächenkonzentration des CO_2 schrittweise reduziert (und nicht einmalig sprunghaft), und anschließend in mehreren Schritten wieder leicht erhöht, um ein Überschwingen der prädizierten Werte $y(t)$ der Konzentration von CO_2 zu verhindern. Danach findet keine weitere Stellgrößenänderung statt und die Regeldifferenz ist vollständig ausgeregelt.

Ein gegenläufiges Bild ergibt sich bei sprunghaftem Anstieg der Lichtintensität (Abb. 4.26 B). Hier wird zunächst durch ein stufenartiges Ansteigen der Grenzflächenkonzentration von gelöstem CO_2 und damit des ansteigenden CO_2 -Volumenanteils dem stärkeren Verbrauch durch die Algen entgegenwirkt. Anschließend findet eine geringfügige Korrektur durch mehrere negative Stellgrößenänderungen Δu statt. Der CO_2 -Volumenanteil bleibt danach auf höherem Niveau konstant und die prädizierte Änderung der CO_2 -Konzentration (ohne Veränderung des Stellwertes), abgebildet durch die freie Antwort $f(t)$ zu allen Zeitschritten $t_0 + \Delta t$, wird vollständig ausgeregelt.

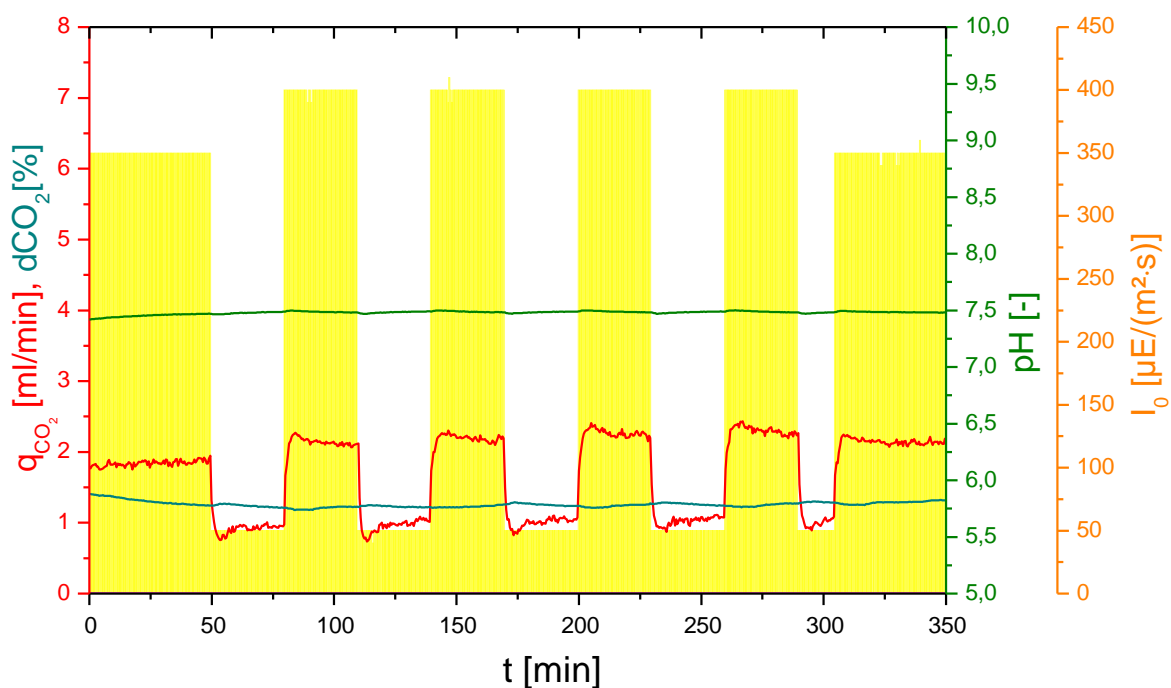


Abb. 4.27: Reaktion des CO_2 -Volumenstroms auf sprunghafte Änderungen der Lichtintensität bei Regelung mit zusätzlicher Störgrößenaufschaltung ($\text{PCE} = 3\%$). Nach anfänglich $I_0 = 368 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ Start der Beleuchtungszyklen mit der Intervalllänge 30 min zwischen $53 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ und $420 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. Die Biomassekonzentration nahm im betrachteten Zeitraum von $0,67 \text{ g/l}$ bis $0,73 \text{ g/l}$ zu. I_0 : Intensität des eingestrahlt Lichts; q_{CO_2} : CO_2 -Volumenstrom; $d\text{CO}_2$: Partialdruck von CO_2 in Lösung (Angabe als prozentualer Anteil des Systemdrucks).

Die zeitlichen Änderungen von pH-Wert, CO_2 -Volumenstrom q_{CO_2} und CO_2 -Partialdruck $d\text{CO}_2$ während Beleuchtungszyklen mit kurzen Intervallen sind in Abb. 4.27 abgebildet. In dem gezeigten Intervall nahm die Biomassekonzentration zu von $0,67 \text{ g/l}$ bis $0,73 \text{ g/l}$. Die PFD des eingestrahlt Lichts wurde nach einer anfänglichen Beleuchtung mit $368 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$

in Intervallen von 30 min sprunghaft zwischen $53 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ und $420 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ gewechselt. Der Verbrauch von CO_2 stieg unmittelbar nach dem Anstieg der Lichtintensität an und musste durch einen höheren Volumenanteil von CO_2 , bzw. durch einen höheren Volumenstrom q_{CO_2} ausgeregelt werden. Beim ersten Sprung von $53 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ auf $420 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ stieg der CO_2 -Volumenstrom beispielsweise in vier Schritten von jeweils 30 s von anfänglich 0,97 ml/min auf 2,11 ml/min und blieb danach etwa auf diesem Niveau. Damit stimmt der Verlauf der Stellgrößenänderung mit dem im Zeitpunkt t_0 prädizierten Verhalten des Systems (Abb. 4.26) überein. Diese Stellgrößenänderungen stellen die optimale Lösung des in Gleichung (4.40) definierten Optimierungsproblems dar. Der Verlauf des pH-Werts lässt keine signifikanten Abweichungen von der Trajektorie erkennen. Dementsprechend wird der Einfluss der Störgröße mit hoher Regelgüte ausgeregelt.

Zuletzt wurde der Vergleich des Regelverhaltens bei aktivierter und deaktivierter Störgrößenaufschaltung angestellt (Abb. 4.28). Beide Kultivierungen wurden - wie oben beschrieben - unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die Parameter des Regelalgorithmus nahmen in beiden Fällen die oben dargestellten Werte an. Lediglich der Parameter PCE, welcher für die Störgrößenaufschaltung maßgeblich ist, wurde in einem Versuch auf $\text{PCE} = 0$ eingestellt. In beiden Versuchen wurde das Verhalten des geregelten Systems bei sprunghaften Änderungen der Lichtintensität – wie oben beschrieben – getestet. Um einen direkten Vergleich anstellen zu können, wurde dabei darauf geachtet, dass Sprünge nicht nur bei identischer PFD durchgeführt wurden, sondern dass auch die Biomassekonzentration identisch war. Diese betrug in beiden Fällen 2,1 g/l. Dies war von besonderer Wichtigkeit, da die Biomassekonzentration neben der PFD wesentlich den CO_2 -Bedarf der Kultur bestimmt.

Der in Abb. 4.28 gezeigte Lichtsprung fand im Zeitraum zwischen 0 min und 0,5 min statt. Der Volumenstrom q_{CO_2} änderte sich bei eingeschalteter Störgrößenaufschaltung direkt im ersten Ausführungszeitpunkt des Reglers nach Änderung der Lichtintensität. Im Vergleichsfall ($\text{PCE} = 0$) musste zunächst eine geringe Regelabweichung berechnet werden, bevor der Volumenstrom erst im Intervall zwischen 0,5 min und 1 min nach Änderung der PFD anstieg. In beiden Fällen war die Regelabweichung sehr gering. Dennoch erkennt man, dass das System mit der Störgrößenaufschaltung noch schneller auf Störungen reagiert.

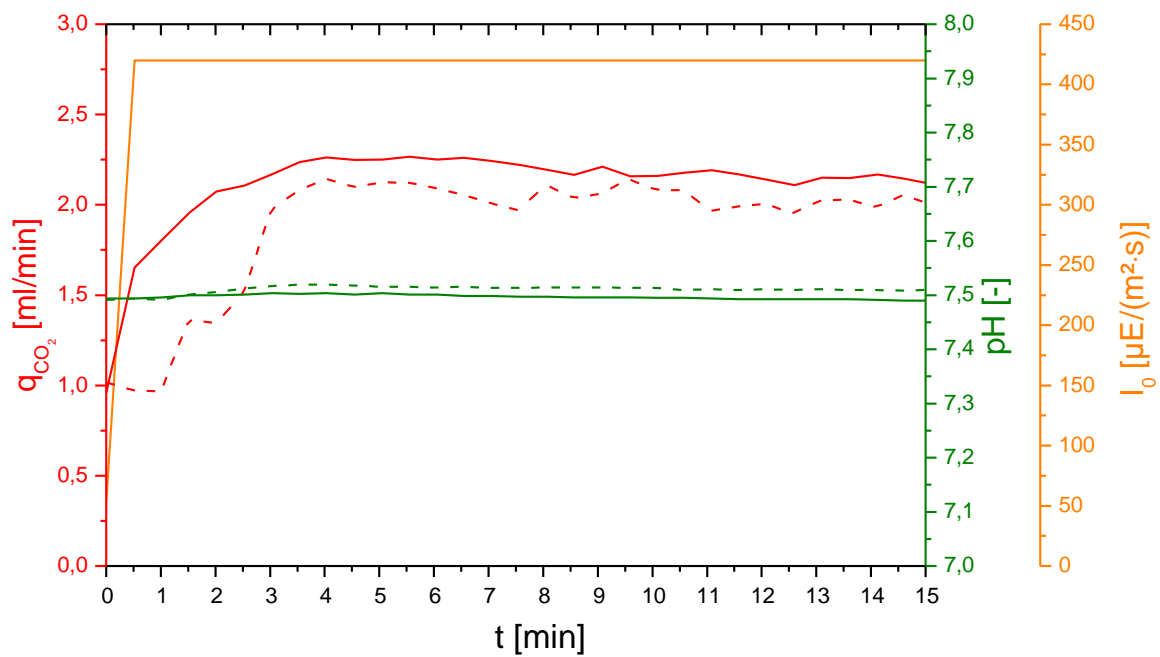


Abb. 4.28: Vergleich der Regelgüte des grundlegenden Regelalgorithmus und mit zusätzlicher Störgrößenaufschaltung bei einem sprunghaften Anstieg der Lichtintensität von $53 \mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ auf $420 \mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$. Die Biomassekonzentration betrug in beiden Fällen $2,1 \pm 0,1 \text{ g/l}$. I_0 : Intensität des eingestrahlt Lichts; q_{CO_2} : CO_2 -Volumenstrom. Kontinuierliche Linien: Regelalgorithmus mit zusätzlicher Störgrößenaufschaltung; unterbrochene Linien: Regelung ohne Implementierung der Störgrößenaufschaltung.

5 Diskussion

5.1 Die Effizienz der Lipidsynthese mit Mikroalgen

5.1.1 Die Eignung von *P. tricornutum* als Produzent von Lipiden zur Biodiesel-Gewinnung

Notwendige Voraussetzung für die Gewinnung von Biodiesel der zweiten Generation ist die Erzeugung der Biomasse mit hoher Produktivität. Zugleich muss die Biomasse einen hohen Lipidanteil aufweisen, damit die Extraktion wirtschaftlich ist. Literaturangaben zeigen, dass der spezifische Massenanteil von Lipiden in Mikroalgen höher als 80 % sein kann [34, 64]. Die Auswertung von mehreren Literaturangaben durch Hu et al. zeigt an, dass Diatomeen unter Stressbedingungen durchschnittlich einen Lipidanteil von 45 % erreichen können [84]. In den Experimenten mit der Kieselalge *P. tricornutum* wurden unabhängig von der Art der Nährstofflimitierung (Stickstoff- und Phosphorlimitierung) vergleichbar hohe Lipid-Massenanteile von maximal 63 % gemessen (Kapitel 4.1.1). Terrestrische Landpflanzen dagegen weisen einen Lipidanteil von nur 5 % auf, wird dieser auf die gesamte Pflanze bezogen [92]. Durch den hohen Lipidgehalt eignen sich Mikroalgen demnach generell als Rohmaterial für die Gewinnung von Biodiesel.

Die aus Algen gewonnenen Fettsäuren müssen bestimmte Anforderungen erfüllen, damit der Biodiesel nach der Umesterung den Bestimmungen den Mindestanforderungen gemäß der Norm EN14214 genügt (Chisti2007). Nach Brennan erfüllt der aus Algen gewonnene Biodiesel grundsätzlich diese Anforderungen und eignet sich sogar besonders für die Luftfahrtindustrie aufgrund seines geringen Gefrierpunktes [67, 74]. In diesem Rahmen wurde die Biodieselqualität nicht experimentell untersucht. Eine theoretisch-quantitative Ableitung der Qualitätskriterien ist nicht möglich. Grundsätzlich positiv zu bewerten ist allerdings der hohe Anteil der Fettsäure C16:0 am Gesamtlipidgehalt der Alge *P. tricornutum*. Die Ester der Palmitinsäure (C16:0) haben eine hohe Cetanzahl [190] und tragen damit zu den guten Verbrennungseigenschaften des Biodiesels bei [73]. Zugleich trägt ein signifikanter Anteil von Palmitinsäure zur Verringerung der Iodzahl bei und steigert damit die Qualität des Biodiesels erheblich. Die Iodzahl ist ein Maß für den Anteil ungesättigter Fettsäuren im Kraftstoff. Sie ist durch die in EN14214 definierten Qualitätskriterien beschränkt. Ein höherer

Anteil der einfach ungesättigten Palmitoleinsäure (C16:1) wirkt sich erwartungsgemäß günstig auf die Filtrierbarkeitsgrenze (cold filter plugging point) aus, so dass der Biodiesel günstige Eigenschaften bei niedrigen Temperaturen aufweisen sollte [73]. Ein hoher Anteil der Palmitoleinsäure (C16:1) am Gesamtlipidgehalt wird generell als günstig eingestuft. Zum Beispiel schlagen Schenk et al. eine optimale Biodiesel-Zusammensetzung aus den Fettsäuren C16:1, C18:1 und C14:0 im Verhältnis 5:4:1 aufgrund der geringen Oxidationsneigung, der hohen Cetanzahl und den günstigen Fließeigenschaften vor [69].

Ungünstig auf die Biodiesel-Eigenschaften wirkt sich dagegen ein hoher Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren aus. Abb. 4.1 zeigt, dass *P. tricornutum* einen hohen Anteil der mehrfach ungesättigten Eicosapentaensäure (EPA) enthält. Dieser lag bei 15 % bis 27 %, wobei der Anteil am Gesamtlipidgehalt während der Speicherlipidakkumulation deutlich sank. Der hohe Anteil von EPA ist jedoch grundsätzlich positiv zu bewerten, denn die Fettsäure erzielt als Nahrungsmittelergänzung hohe Marktpreise. Sie zeigte positive Effekte bei der Behandlung und Prävention von kardiovaskulären und entzündlichen Erkrankungen [132, 160-163]. Ohnehin zielt das Bioraffinerie-Konzept darauf ab Nebenproduktströme zu nutzen um die Wirtschaftlichkeit der Prozesse zu verbessern. Demnach sollten primär Nährstoffe, wie Kohlenhydrate und Proteine der Futtermittelproduktion dienen und ein Teil der verbleibenden Biomasse etwa in Biogasanlagen zur Methangewinnung anaerob abgebaut werden [61]. Auch die Nutzung hochpreisiger Nebenprodukte ist nicht ausgeschlossen. Jedoch ist hierbei auf die Mengengerüste zu achten, da die Massenproduktion im Zuge der Bereitstellung von Biomasse zur Biodieselproduktion im technischen Maßstab bei gleichzeitigem Verkauf von hochpreisigen Nebenprodukten einen starken Preisverfall bei den letzteren nach sich ziehen würde.

Die experimentellen Ergebnisse in Kapitel 4.1.1 zeigten auch, dass sich der Anteil einzelner Fettsäuren am Gesamtlipidgehalt während des Kultivierungsverlaufs stark ändert. Interessanterweise wurde dabei festgestellt, dass sich bei allen Experimenten eine reproduzierbare Verschiebung des Fettsäureprofils ergab (Abb. 4.1). Dies eröffnet bei der Prozessentwicklung die Möglichkeit, den Prozess so auszulegen, dass die Biomasse bei einer gewünschten Fettsäurezusammensetzung geerntet wird, um so eine optimale Biodieselqualität zu erzielen. Des Weiteren kann durch den Zusatz von Antioxidantien [73], durch Mischung von Fettsäuremethylestern verschiedener Algen mit unterschiedlichen Fettsäureausstattungen oder durch partielle katalytische Hydrierung die Qualität des Biodiesels weiter optimiert werden [191, 192].

5.1.2 Physiologische Effekte der Stickstoff- und Phosphorlimitierung

Viele Prozessparameter, wie etwa die Temperatur, die Salinität und die CO₂-Konzentration haben einen Einfluss auf den Lipidgehalt und die Lipidzusammensetzung von Mikroalgen [67]. Die Limitierung von Nährstoffen gilt jedoch als die effektivste Methode zur Induktion der Speicherlipidakkumulation [79, 132]. Dabei finden fundamentale physiologische Veränderungen statt, die die Zellzusammensetzung drastisch verändern.

So erfolgt bei der Stickstofflimitierung eine Akkumulation von Lipiden [79] und die Neusynthese von Proteinen ist unterbunden [58]. In Bezug auf die Elementarzusammensetzung äußert sich dies in einem sinkenden Anteil von Stickstoff an der Gesamtbiomasse bzw. in einem geringeren Verhältnis zwischen Stickstoff und Kohlenstoff [188]. Diese Erkenntnis wurde auch bei der Modellierung der Lipidakkumulation aufgegriffen. So wurde die sinkende volumetrische Produktivität durch den Niederschlag eines geringeren Anteils intrazellulären Stickstoffs (auch als „Quota“ bezeichnet) in der Wachstumsrate modelliert [183]. Jedoch sind nicht nur die intrazellulären Stoffflüsse und die Verwertung des fixierten Kohlenstoffs in der Synthese verschiedener Stoffklassen durch den Nährstoffmangel beeinflusst, sondern auch die photosynthetische Energieumwandlung ist betroffen. Einerseits stagniert die Bildung der mit dem photosynthetischen Apparat assoziierten und in den Thylakoiden lokalisierten Proteine. Andererseits ist auch die Synthese der stickstoffhaltigen Chlorophyll-Moleküle direkt betroffen [58]. Insgesamt wirkt sich die Stickstofflimitierung somit durch eine Reduktion photosynthetischer Aktivität aus [80, 188]. Auch in den hier gezeigten Experimenten wurde bestätigt, dass der Nettozuwachs von Chlorophyll kurze Zeit nach Eintritt in die Limitierung stoppte (siehe z. B. Abb. A3.1).

Zur genaueren Untersuchung der Effekte der Limitierung auf die Physiologie der Mikroorganismen wurden hier die verschiedenen Biomassekomponenten bilanziert und die Veränderung der Biomassezusammensetzung dadurch systematisch untersucht. Durch analytische Methoden war die quantitative Erfassung der Biomasse-, Kohlenhydrat- und Lipidkonzentration möglich. Häufige Messungen der Konzentrationen während eines Kultivierungsverlaufes steigerten dabei die zeitliche Auflösung der Veränderungen entsprechender Konzentrationen deutlich. Es wurde hier - ähnlich wie bei der Unterteilung des gesamten Zellkohlenstoffs in einen funktionalen Anteil und einen Speicher-Anteil durch Ross und Geider [182] - die Unterscheidung zwischen aktiver Biomasse, also Biomasse ohne Speicherstoffe, und Speicherstoffen getroffen.

Die Messungen zeigten, dass der Biomassezuwachs in der nährstofflimitierten Wachstumsphase dem Zuwachs von Lipiden und Speicherkohlenhydraten entsprach. Letztere bestehen hauptsächlich aus dem Polysaccharid Chrysolaminarin, welches aus β -1,3- und β -1,6-glycosidisch verbundenen Glukosemolekülen besteht [193, 194]. Die Akkumulation beider Speicherkomponenten erfolgte insbesondere zu Beginn der Nährstofflimitierung zeitgleich (z. B. Abb. 4.2), wodurch keine Präferenz der Akkumulation eines der beiden Reservestoffe abgeleitet werden konnte.

Auf dieser Grundlage kann die Folgerung getroffen werden, dass grundsätzlich ein höherer Wirkungsgrad durch Unterdrückung der Kohlenhydratsynthese in der Phase der Lipidakkumulation erzielt werden könnte. Auch wenn die derzeitigen Kenntnisse über die Regulationsmechanismen zur Beeinflussung der weiteren intrazellulären stofflichen Nutzung des fixierten CO_2 zurzeit noch nicht ausreichen [84], bietet dies möglicherweise vielversprechende Ansätze für eine gezielte gentechnische Veränderung der Algenspezies.

Obwohl sich die Konzentration der aktiven Biomasse einer direkten Messung entzog, indiziert die Massenbilanz zu den gezeigten Probenahme-Zeitpunkten, dass in der Phase nährstofflimitierten Wachstums keine signifikante Änderung der Konzentration der aktiven Biomasse erfolgte. Dies wurde auch durch die in Kapitel 4.3 gezeigte Simulation bestätigt. Die Konzentration der aktiven Biomasse kann grundsätzlich aus der gravimetrisch/spektralphotometrisch bestimmten Biomassekonzentration zum Zeitpunkt des Eintritts in die Nährstofflimitierung oder anhand des Ausbeutekoeffizienten $Y_{X,N}$ bestimmt werden (siehe Kapitel 4.1.5).

Fraglich und von entscheidender Bedeutung für die weitere Prozessentwicklung war, ob sich die Effektivität der Limitierung von Stickstoff und Phosphor hinsichtlich der Synthese von TAGs unterscheidet. Beim Vergleich beider Prozessführungsstrategien war zu beachten, dass die Lipidbildung lichtabhängig ist [81, 195]. Daher wurden die gezeigten Versuche im Rührkesselreaktor bei gleicher Lichtintensität durchgeführt, so dass die gesamte eingestrahlte Lichtenergie in beiden Versuchen identisch war. Durch die speziell angepasste Medienzusammensetzung wurde zudem erreicht, dass in beiden Experimenten die gleiche Konzentration aktiver Biomasse während der Speicherlipidakkumulation vorlag (Kapitel 4.1.1). Damit waren identische Ausgangsbedingungen geschaffen, um die Effizienz der beiden Prozesse auf der Grundlage der volumetrischen Produktivitäten vergleichend beurteilen zu können, denn die volumetrische Produktivität der gesamten Kultur ergibt sich grundsätzlich aus der Syntheseleistung der aktiven Biomasse, wie beispielsweise in Kapitel

4.1.5 demonstriert. Sowohl die volumetrische Lipid-Produktivität als auch die volumetrische Biomasse-Produktivität war bei Stickstofflimitierung höher als bei der Limitierung von Phosphor. Daher wurde die Stickstofflimitierung als vorteilhaft eingestuft und als Strategie zur Lipidakkumulation weiterverfolgt.

Dennoch sei hier einschränkend erwähnt, dass durch die Art der Limitierung auch die Pigmentbildung beeinflusst wird. Tabelle 4-1 zeigt, dass die phosphorlimitierte Kultur deutlich höhere Konzentrationen an Chlorophyll a aufwies als die stickstofflimitierten Kulturen. Infolge der unterschiedlichen optischen Eigenschaften der Kulturen können sich aufgrund der verschiedenartigen Lichtverteilung in beiden Fällen auch bei gleicher eingestrahelter und absorbiertes Photonendichte Unterschiede ergeben. Dabei nimmt die Bedeutung der Reaktorgeometrie und der Hydrodynamik bzw. der radialen Durchmischung für die volumetrische Produktivität zu [37]. Durch die Generierung von Antennen-reduzierten Mutanten wird sogar versucht durch gezielte Beeinflussung der optischen Eigenschaften der Algenkulturen eine bessere Lichtpenetration in den Reaktor und damit eine höhere Prozesseffizienz zu erreichen [118]. Somit kann der hier gezeigte Vergleich zwischen Phosphor- und Stickstofflimitierung nicht grundsätzlich generalisiert werden, bot dennoch eine ausreichende Entscheidungsgrundlage für das Vorgehen bei der weiteren Prozessentwicklung.

5.1.3 Bestimmung der Effizienz der Lipidakkumulation von *P. tricornutum*

Trotz der hohen Relevanz waren in der Literatur keine experimentelle Daten zur Effizienz des Algenwachstums während der Speicherlipidsynthese zu finden. Dennoch wurde die PCE der TAG-Akkumulation teilweise geschätzt, um auf deren Grundlage die Wirtschaftlichkeit und technische Umsetzbarkeit der Technologie zum Einsatz in der Biodieselproduktion zu betrachten [72, 74]. Bei der Schätzung wurden experimentelle Ergebnisse berücksichtigt, die bestätigten, dass die volumetrische Produktivität des Algenwachstums bei gleichzeitiger Lipidakkumulation geringer war als in Vergleichsexperimenten, in denen ausreichend Nährstoffe im Medium verfügbar waren [34].

Die Gründe für fehlende Angaben zur PCE der Prozesse sind vielfältig. Einerseits sind die Messungen des Lipidgehalts bei Experimenten im kleinen Maßstab in der Regel auf Endpunktmessungen beschränkt, da die notwendigen Probenvolumina nicht unerheblich sind. Die Angaben beziehen sich zudem meist auf Lipid-Massenanteile in der geernteten Biomasse

[196, 197]. Andererseits ändert sich die Verbrennungsenthalpie der Biomasse während der Lipidakkumulation erheblich. Dies muss in der Berechnung der PCE berücksichtigt werden [198]. Eine exakte Quantifizierung erfordert die experimentelle Erhebung der kalorimetrischen Daten. Des Weiteren müssen bei einer Berechnung der PCE auch die spektralen Eigenschaften der Lichtquelle berücksichtigt werden [34].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methodik etabliert, um die PCE während der Lipidakkumulation zu ermitteln. Die Vorgehensweise ist in Kapitel 3.5 beschrieben. Dazu wurde einerseits die Methodik der Lipidquantifizierung weiterentwickelt. Um mit geringen Probenvolumina viele quantitative Einzelbestimmungen im Verlaufe einer Satzkultivierung durchführen zu können, wurde das in Kapitel 3.1.7.2 beschriebene Protokoll erstellt. Dieses korreliert Daten aus Fluoreszenzmessungen nach Anfärben der Proben mit dem Farbstoff Nilrot [176] mit quantitativen Ergebnissen gaschromatographischer Untersuchungen weniger Einzelproben. Dadurch konnte die zeitliche Veränderung der Lipidkonzentration im Kultivierungsverlauf exakt verfolgt werden. Zunächst wurde für Satzkultivierungen gezeigt, dass die Lipid-Produktivität P_L ((3.4) ab Beginn einer Stickstofflimitierung mehrere Tage lang konstant war, bevor sie gegen Ende der Kultivierung stetig sank (siehe z. B. Abb. 4.2). Dies ermöglichte die exakte Berechnung der PCE aus linearer Regression der zeitlichen Änderung der Biomasse- und Lipidkonzentrationen. Zudem zeigte sich, dass die PCE über einen längeren Zeitraum konstant war und dementsprechend ein gutes Maß für die Prozesseffizienz darstellt. Außerdem lässt der Parameter Vergleiche zwischen verschiedenen Kultivierungsbedingungen zu.

Andererseits wurde der Einfluss der Lipidakkumulation auf die Verbrennungsenthalpie der Biomasse in der Berechnung der PCE berücksichtigt. Experimentell konnte die Verbrennungsenthalpie der Lipide $\Delta H_{c,L}^0$ und die der verbleibenden Restbiomasse $\Delta H_{c,x'}^0$ bestimmt werden. Letztere betrug $\Delta H_{c,x'}^0 = 17,58$ kJ/g und war damit ähnlich der Verbrennungsenthalpie von Stärke, die nach Milner 17,5 kJ/g beträgt [199]. Damit stimmte das Ergebnis sehr gut mit Messungen überein, die zeigten, dass die während der Limitierung gebildete Restbiomasse im Wesentlichen einer Akkumulation von Kohlenhydraten entsprach (siehe z. B. Abb. 4.2).

Die experimentellen Ergebnisse (Kapitel 4.1.2) lassen bei einem Lipid-Massenanteil von 20 % auf eine Verbrennungsenthalpie der gesamten Biomasse von $\Delta H_c^0 = 20,9$ kJ/g schließen. Dieser Wert stimmt sehr gut mit den Angaben von Tredici überein, der einen Wertebereich

von 20 - 23 kJ/g für eine solche Algenbiomasse angibt [34]. Goldman ermittelte einen rechnerischen Wert von $\Delta H_c^0 = 22,6$ kJ/g für Mikroalgenbiomasse [198].

Zuletzt zeichnet sich die Methode der PCE-Berechnung durch die Berücksichtigung der spektralen Eigenschaften der Lichtquelle (siehe Abb. 3.10) aus. Durch die Photonenbilanzierung konnte in Verbindung mit der Kenntnis des Energiegehalts der absorbierten Photonen somit die absorbierte Energie exakt quantifiziert werden (3.16). Eine Anpassung der Berechnungsmethode an andere Lichtquellen wurde durch die Verwendung monochromatischer Lichtquellen ebenfalls demonstriert (vgl. Kapitel 4.5).

Insgesamt wurde somit eine Methodik entwickelt, womit die PCE unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen bestimmt werden kann. Sie berücksichtigt Veränderungen in der makromolekularen Zusammensetzung der Biomasse. Werden transmittierten Photonen in der Energiebilanzierung vernachlässigt, so kann die Lipidakkumulation auf die absorbierte Lichtmenge bezogen werden und die Effizienz kann auf physiologischer Ebene isoliert betrachtet werden. Wird hingegen die Energie transmittierter Photonen mitbilanziert, so erlaubt dies die Beurteilung der Effizienz der Kultivierung im spezifischen Kultivierungssystem.

5.1.4 Prozesstechnische und physiologische Beschränkungen der Effizienz der Speicherlipidakkumulation

Zur Untersuchung der physiologischen Grundlagen für eine Beschränkung der PCE wurde eine Versuchsreihe von Satzkultivierungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von NaNO_3 im Medium durchgeführt. Die volumetrische Biomasse- bzw. Lipid-Produktivität sowie die PCE wurden in allen Versuchen bestimmt (siehe Kapitel 4.1.4). Da die Konzentration aktiver Biomasse im Gegensatz zur Konzentration der Speicherstoffe die Syntheseleistung der Kultur bestimmt, wurde diese gesondert in die Betrachtung einbezogen. Sie war einer direkten Messung nicht zugänglich und wurde daher über die Aufnahme des Nitrats aus dem Kulturmedium bestimmt (Abb. 4.4). Die Stickstoffaufnahme und das Biomassewachstum im Einzelexperiment wie auch die maximal erreichten Konzentrationen aktiver Biomasse in der Versuchsreihe zeigten, dass ein strenger stöchiometrischer Zusammenhang zwischen der Synthese aktiver Biomasse und Nitrataufnahme aus dem Medium vorlag. Der über mehrere Kultivierungen konstante Ausbeutekoeffizient $Y_{X/N}$ deutete darauf hin, dass die makromolekulare Zusammensetzung der aktiven Biomasse invariabel war

oder lediglich geringen Änderungen unterworfen war. Der Massenanteil von Stickstoff in der Biomasse betrug 13,4 % (w/w). Dagegen führte die Akkumulation von Speicherstoffen, welche keinen Stickstoff enthalten, zu einem Absinken auf Werte um 3,3 % (w/w). Diese Angaben stimmen sehr gut mit Literaturwerten überein. Spoehr und Milner ermittelten einen Stickstoffgehalt von 1,2 % bis 14,1 % für *Chlorella vulgaris*. Die starke Schwankungsbreite lässt auf einen unterschiedlichen Gehalt an Speicherstoffen in den untersuchten Proben schließen. Die gezeigten Zusammenhänge veranlassten Osborne und Geider zur Beschreibung eines sinkenden Verhältnisses von Stickstoff zu Kohlenstoff (N:C) bei einer nährstofflimitierten Kultur [188].

Zur Unterscheidung physiologischer und prozesstechnischer Einflussfaktoren, die die Effizienz begrenzen, wurde versucht, die Effekte auf Reaktorebene und Zellebene zu untersuchen.

Auf Reaktorebene zeigte sich, dass bei höherer Stickstoffverfügbarkeit über die Absorptionseigenschaften der Kulturen höhere volumetrische Biomasse- und Lipid-Produktivitäten erreicht werden konnten. Die Absorptionseigenschaften der Kulturen ergaben sich wiederum aus der Konzentration aktiver Biomasse und dem spezifischen Pigmentgehalt der Zellen. Wie Abb. 4.5 zeigt, stiegen in der Versuchsreihe sowohl die Konzentration aktiver Biomasse als auch die Konzentration des gesamten Chlorophylls bei höherer Verfügbarkeit von Stickstoff im Kulturmedium an. Lediglich bei der höchsten Stickstoffverfügbarkeit, wo komplette Lichtabsorption bereits erreicht war, stieg die Chlorophyllkonzentration nicht weiter an. Durch höhere Zellzahlen, die mit der Konzentration aktiver Biomasse korreliert sind, und steigende Chlorophyllkonzentration nahm damit die Kapazität der Kulturen zu Licht zu absorbieren. Dies bestätigten auch die Messungen der Lichttransmission. Als Resultat geringer Konzentrationen aktiver Biomasse und unvollständiger Lichtabsorption waren die volumetrischen Produktivitäten bei NaNO_3 -Konzentrationen, die kleiner als 1,2 g/l waren, deutlich geringer als bei höherer Startkonzentration des Salzes im Medium. Sowohl wegen der geringen Konzentration aktiver Biomasse als auch durch die negativen Auswirkungen des beschränkten Angebots an Stickstoff auf die Pigmentierung der Zellen [200] war somit die Syntheseleistung der gesamten Kultur begrenzt. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die volumetrischen Produktivitäten der drei Experimente mit den höchsten Startkonzentrationen an NaNO_3 nicht stark, jedoch waren diese deutlich höher als bei niedrigerer Stickstoffverfügbarkeit. Es wurde eine nahezu vollständige Absorption des eingestrahnten Lichts und damit eine höhere photosynthetische Aktivität der Kulturen erreicht. Ein leichtes

Absinken der Lipid-Produktivität in den beiden Experimenten mit den höchsten NaNO_3 -Einwaagen kann aus dem höheren Energiebedarf des Erhaltungsstoffwechsels resultieren. Hier waren die Konzentrationen der aktiven Biomasse höher als bei dem Versuch, bei dem maximale volumetrische Lipid-Produktivität erzielt wurde.

Da transmittierte Photonen nicht in der Energiebilanz berücksichtigt wurden, konnte der starke Anstieg der PCE im Bereich der frühzeitigen Stickstofflimitierung bei geringen NaNO_3 -Einwaagen nicht auf Reaktorebene erklärt werden. Dementsprechend war die unvollständige Lichtabsorption nicht für Unterschiede der Effizienz verantwortlich. Hierzu musste eine Betrachtung auf der Zellebene bzw. auf physiologischer Ebene erfolgen, bei der die spezifischen Raten der Biomasse- bzw. Lipidsynthese berücksichtigt wurden. Zur Vernachlässigung des Einflusses von Lichtgradienten innerhalb der Kulturen wurde die gesamte Absorption durch die aktive Biomasse betrachtet. Dadurch konnte die Kapazität der Zellen zur Biomasse- und Lipid-Synthese in Abhängigkeit der durch sie absorbierten Photonen untersucht werden. Die spezifischen Syntheseraten (Abb. 4.6) nahmen zunächst zu, wenn zeitlich mehr Photonen pro Biomasse absorbiert wurden. Dieser Zusammenhang war konform mit der Beobachtung, dass hohe Lichtintensitäten die Akkumulation von Speicherlipiden begünstigen [81, 195]. Die höchsten spezifischen Raten der Speichermolekülsynthese wurden bei geringer NaNO_3 -Einwaage und damit bei geringer Konzentration aktiver Biomasse erreicht. Durch die geringere gegenseitige Abschattung der Zellen waren die Lichtgradienten nicht so stark ausgeprägt wie bei höheren Konzentrationen aktiver Biomasse, so dass einzelne Zellen höheren Lichtintensitäten ausgesetzt waren. Dennoch war bei diesen Experimenten die Lichtnutzung weniger effizient und die PCE reduziert im Vergleich zu den Experimenten mit höherer Zelldichte. Ursächlich dafür war der Sättigungseffekt bei der Synthese von Lipiden und Speicherkohlenhydraten, der bei hohen Lichtintensitäten zu beobachten war. Gründe hierfür sind die Beschränkung der Effizienz der Synthese von Speichermolekülen durch geschwindigkeitslimitierende Schritte in der Photosynthese selbst oder in nachgelagerten Reaktionen. Die Umsatzgeschwindigkeit von RuBisCO beträgt ca. 300 ms und ist damit vermutlich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Im Gegensatz dazu läuft der photosynthetische Elektronentransport mit einer Rate von ca. 5 ms bis 20 ms ab [39, 201]. Demnach ist davon auszugehen, dass die CO_2 -Fixierung im Calvin-Zyklus limitierend wirkt, wenn die Zellen hohen Lichtintensitäten ausgesetzt sind. Insgesamt lässt der Zusammenhang erkennen, dass auch bei der Akkumulation von Speicherstoffen ein Lichtsättigungseffekt auftritt. Dies ist auch bei unlimitiertem Wachstum

zu beobachten und wird allgemein durch die PI-Kurve beschrieben (z. B. [34, 202]). Die überschüssige Energie, die nicht zur Reduktion von NADP^+ und Phosphorylierung von ADP genutzt werden kann, jedoch durch die photosynthetischen Pigmente absorbiert wird, wird in Form von Wärme oder Fluoreszenz dissipiert und kann nicht zur Synthese von Lipiden oder Kohlenhydraten genutzt werden.

Verstärkt werden könnte die Ineffizienz durch negative Effekte der Stickstofflimitierung auf den photosynthetischen Apparat, da unter diesen Bedingungen die Photoakklimation beeinträchtigt ist [80, 203]. Dies spiegelte sich jedoch in der Produktbildungskinetik (Abb. 4.6) wider, wobei hier keine weitere Differenzierung vorgenommen werden konnte.

Zusätzlich zur geringeren Effizienz der Produktbildung führte die unvollständige Lichtabsorption zu geringen volumetrischen Produktivitäten in den Experimenten mit einer NaNO_3 -Startkonzentration, die geringer als 1,2 g/l war. Die übrigen Experimente dagegen zeigten die höchsten volumetrischen Produktivitäten, weil das Licht komplett absorbiert wurde und auch die Lichtnutzung einzelner Zellen durch stärkere gegenseitige Abschattung effizienter war. Hier waren keine Sättigungseffekte zu beobachten. Die spezifischen Produktbildungsraten waren jedoch wegen der höheren Zelldichte und geringeren zeitlichen (auf einzelne Zellen bezogenen) absorbierten Photonenmengen geringer.

Die im Zuge dieser Experimente gewonnenen Erkenntnisse sind auf andere Reaktorsysteme und eine andere Reaktorgeometrie extrapolierbar. Sie müssen bei der Prozessentwicklung berücksichtigt werden. Im Zuge der Prozessintensivierung ist es anhand dieser Ergebnisse sinnvoll durch hohe Biomassekonzentrationen und gegenseitige Abschattung der Zellen Sättigungseffekte zu vermeiden. Infolge des Energiebedarfs des Erhaltungsstoffwechsels kann es jedoch vorteilhaft sein sehr hohe Biomassekonzentrationen zu vermeiden [80].

5.1.5 PCE bei lichtlimitiertem und nährstofflimitiertem Wachstum

Aufgrund fehlender Angaben in der Literatur zur PCE nährstofflimitierter Prozesse konnten zunächst nur Angaben zur volumetrischen Produktivität der Bioprozesse mit den experimentellen Daten verglichen werden. Wegen des starken Einflusses der Lichtintensität auf die Produktbildungsrate (siehe Kapitel 5.1.4, [81, 195]) muss dabei die eingestrahlte PFD bei Vergleichen berücksichtigt werden. Zusätzlich ist der Vergleich der Daten erschwert, da das Verhältnis aus Reaktoroberfläche zum Flüssigkeitsvolumen einen erheblichen Einfluss auf die Lichtverteilung und damit indirekt auf die volumetrische Produktivität hat.

In den in Kapitel 4.1.4 gezeigten Satzkultivierungen wurden Lipid-Produktivitäten von 60 mg/(l·d) bis 200 mg/(l·d) bei Dauerbeleuchtung mit einer PFD von ca. 200 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ erreicht. Die Biomasse-Produktivität betrug in eigenen Experimenten während Akkumulation von Lipiden zwischen 112 mg/(l·d) und 397 mg/(l·d) (siehe Tabelle 4-2). Rodolfi et al. [81] erreichten bei der Kultivierung von *P. tricornutum* in Schüttelkolbenversuchen eine Lipid-Produktivität von 45 mg/(l·d). Dabei wurden die Kulturen mit einer konstanten PFD von 100 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ PAR-Photonen bestrahlt. Eine CO₂-Limitierung wurde durch Begasung der Kolben mit 5 % CO₂-Volumenanteil ausgeschlossen. Damit war *P. tricornutum* im gezeigten Screening von 30 Stämmen einer der besten Lipid-Produzenten. Im Experiment mit *Nannochloropsis sp.* wurden bei gleichen Bedingungen sogar 60 mg/(l·d) erreicht [81]. Heurliemann et al. erreichten mit anderen Spezies im 10 l-Maßstab bei einer PFD von 250 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ und Tag-Nacht Zyklen mit 12 h Tag- bzw. Nachtlänge eine maximale volumetrische Lipid-Produktivität von 23 mg/(l·d) [197]. In Outdoor-Experimenten betrug die Biomasse-Produktivität von *P. tricornutum* in einem Rohrreaktor zwischen 500 mg/(l·d) und 2700 mg/(l·d). Die Kulturen waren in diesem Fall nicht nährstofflimitiert und die Lipid-Produktivität wurde nicht angegeben. Die durchschnittliche PFD variierte im Bereich zwischen 900 und 2900 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ [204]. Griffith gibt eine durchschnittliche Biomasse-Produktivität von 340 mg/(l·d) bei einem durchschnittlichen Lipidgehalt von 21 % für *P. tricornutum* an [196]. Diese Werte wurden nach Auswertung mehrerer Literaturangaben ermittelt. Rechnerisch ergab sich in dieser Studie damit eine durchschnittliche Lipid-Produktivität von 71 mg/(l·d).

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Literaturangaben zur volumetrischen Lipid- und Biomasse-Produktivität in der gleichen Größenordnung lagen und damit eine gute Vergleichsbasis boten. In eigenen Experimenten wurden bei moderater PFD vergleichbar hohe Lipid-Produktivitäten erreicht. Die in Kapitel 4.1.4 gezeigten Daten haben jedoch auch gezeigt, dass die Angabe der volumetrischen Produktivität als Maßstab der Effizienz bzw. physiologischen Leistungsfähigkeit der Mikroalgenstämme zur Lipidproduktion nicht geeignet ist. Neben des starken Einflusses der Lichtverteilung übt auch die Prozessführung einen erheblichen Einfluss auf die volumetrische Produktivität aus. Daher sind die aufgeführten Literaturangaben sehr stark mit den spezifischen experimentellen Bedingungen verknüpft und nicht extrapolierbar.

Einen besseren Vergleichsmaßstab stellt die PCE während der Lipidbildung dar. Mit ihr kann die physiologische Leistungsfähigkeit eines Algenstammes zur Lipidproduktion beurteilt werden. Im lichtlimitierten Bereich der PI-Kurve, wo keine Lichtsättigungs- oder Photoinibierungseffekte auftreten, ist die PCE unabhängig von der eingestrahlten Lichtintensität und unabhängig von der Art des Kultivierungssystems, sofern der Energiebedarf des Erhaltungsstoffwechsels vernachlässigt werden kann. Bei höheren PFDs wirken sich wiederum – wie in Abb. 4.6 gezeigt – Sättigungseffekte auf die Lipidbildungskinetik und die PCE aus. Damit spielt auch hier die Ausgestaltung des Photobioreaktors und die daraus folgende Lichtverteilung innerhalb des Reaktors eine wichtige Rolle für den Wirkungsgrad des Prozesses. Die Rolle der Lichtverteilung konnte experimentell durch Huisman et al. im Chemostat durch Messung ortsabhängiger Unterschiede in der Effizienz der Photosynthese mittels Fluoreszenzmessungen nachgewiesen werden [205].

Eine Angabe des PCE-Wertes ist jedoch auch in diesem Fall interessant, da unter Berücksichtigung der PFD eine Aussage über die Eignung eines Photobioreaktorsystems zur effizienten Produktion von Biomasse und TAGs getroffen werden kann. Norsker berechnete z. B. die PCE bei nicht-nährstofflimitiertem Wachstum für verschiedene Reaktorsysteme auf der Grundlage publizierter Angaben zur Produktivität aus Outdoor-Experimenten. In den Basisszenarien ergaben sich PCE-Werte von 1,5 % in Open Ponds, 3 % in Rohrreaktoren und 5 % in vertikal ausgerichteten Plattenreaktoren [114]. Experimente im Labormaßstab zeigten, dass mit *Chlamydomonas reinhardtii* WT13 bei nicht-nährstofflimitiertem Wachstum PCE-Werte zwischen 1,7 % und 5,5 % erreicht wurden. Mit dem Stamm WT8b+ wurden sogar Maximalwerte um 11,2 % erreicht. Diese hohen Werte wurden allerdings bei $100 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ gemessen, bei denen die Photosynthese der Algen gemäß der PI-Kurve noch keine effizienz mindernden Sättigungseffekte zeigte [206]. Bei lichtlimitiertem Wachstum von *P. tricornutum* wurde ein PCE-Wert von 5,62 % erreicht (siehe Kapitel 4.1.6). Eine Akkumulation von Lipiden wurde dabei experimentell ausgeschlossen. Die Algen wurden mit ca. $200 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ beleuchtet. Hier zeigte die PI-Kurve allerdings bereits Sättigungseffekte (Abb. 4.12).

Man geht in der Regel davon aus, dass die Effizienz während der Akkumulation von Speichermolekülen deutlich niedriger ist als bei rein lichtlimitiertem Wachstum [74]. Wijffels rechnete in ökonomischen und energetischen Studien mit einer geschätzten PCE von 3 % [72]. In den Experimenten mit variierender NaNO_3 -Einwaage ergaben sich PCE-Werte im

Bereich zwischen 2,5 % und 5,7 %. Damit zeigte sich, dass die Prozessführung und die Produktbildungskinetik (Abb. 4.6) erheblichen Einfluss auf die PCE des Prozesses hat. Die PCE ist also keinesfalls als eine der Algenspezies inhärente Konstante zu betrachten. Physiologische Beschränkungen des Organismus bestimmen allerdings die Obergrenze der erzielbaren PCE. Durch die Steigerung der Konzentration aktiver Biomasse im Reaktor konnte durch stärkere Abschattung der Algen erreicht werden, dass Photosynthese-assoziierte Sättigungseffekte mitigiert oder gänzlich vermieden wurden. In der Folge wurde bei höheren Konzentrationen der Stickstoffquelle im Medium ein höherer Wirkungsgrad erzielt. Andererseits zeigte der experimentelle Vergleich der Effizienz der lichtlimitierten und nährstofflimitierten Kulturen, dass im Idealfall keine Effizienzunterschiede zu beobachten waren.

Bei geringer Konzentration von NaNO_3 im Medium und damit geringer Konzentration aktiver Biomasse konnten deutliche Effizienzminderungen im Vergleich zur lichtlimitierten Kultur gemessen werden. Diese beruhten – wie in Abb. 4.6 gezeigt – auf Sättigungseffekten der Produktbildungskinetik. Dagegen stimmte die maximal erreichte PCE bei Nährstofflimitierung bei hohen NaNO_3 -Startkonzentrationen sehr gut überein mit der Effizienz bei Lichtlimitierung. In beiden Kultivierungen wurden vergleichbare Konzentrationen des gesamten Chlorophylls gemessen, was auf ähnlich ausgeprägte Lichtgradienten innerhalb des Reaktors schließen lässt. Aus dieser Betrachtung werden hier Effekte ausgeschlossen, welche sich aufgrund unterschiedlicher Zellzahlen und unterschiedlicher Streuungseigenschaften der Kulturen ergeben. Infolge der ähnlichen Lichtgradienten kann gefolgert werden, dass auf Ebene der Photosynthese und CO_2 -Fixierung ein vergleichbarer Wirkungsgrad in beiden Fällen erreicht wurde. Die Unterschiede in Bezug auf die Biomasse- und Lipid-Produktivität wurde demgegenüber durch den unterschiedlichen Energiegehalt bzw. die unterschiedliche Verbrennungsenthalpie der Produkte kompensiert, so dass insgesamt ein vergleichbarer Wirkungsgrad erzielt wurde.

Interessant war, dass die Konzentration des Chlorophylls nach Eintritt der Limitierung um ca. weitere 10 mg/l anstieg und damit eine vergleichbare Konzentration wie im lichtlimitierten Fall erreicht wurde (Abb. A3.5). Alle experimentellen Ergebnisse deuten darauf hin, dass unmittelbar nach der vollständigen Aufnahme des Nitrats aus dem Medium die Lipidakkumulation eintritt (siehe z. B. Abb. 4.2), weshalb das Vorhalten eines intrazellulären Stickstoffspeichers ausgeschlossen wird. Dennoch ist es denkbar, dass durch intrazelluläre Reorganisationsprozesse eine weitere Neusynthese von Chlorophyllen auch während der

Stickstofflimitierung stattfinden kann. Dies erfordert, dass Stickstoff durch Reorganisationsprozesse aus intrazellulären Quellen bereitgestellt wird. Der Massenanteil der Pigmente in der Biomasse war in den gezeigten Messungen gering und betrug weniger als 2 %. Zudem kann mit Hilfe der Angaben in Tabelle 4-5 berechnet werden, dass dazu weniger als 1 % des intrazellulären Stickstoffs für die Synthese von Chlorophyll bereitgestellt werden musste. Daher ist es denkbar, dass auch kurze Zeit nach Eintritt der Stickstofflimitierung Photoakklimation der Kultur stattfindet. Dies findet jedoch in begrenztem Umfang statt, wie die in Anhang A 3 abgebildeten Experimente zeigten. Im Falle der lichtlimitierten Kultur war dagegen genügend Nitrat im Medium vorhanden, so dass davon auszugehen ist, dass durch Photoakklimation die für die einzelnen Zellen optimale Pigmentbeladung erreicht wurde (Abb. 4.7).

Insgesamt folgt für die Prozessentwicklung, dass durch geeignete Reaktorbauweise und ausreichende Lichtverdünnung auf konstruktiver Ebene oder durch gezielte Prozessführung auf der anderen Seite die PCE optimiert werden kann, indem Lichtsättigung und Photoinhibierung vermieden werden. Damit sind im Falle der Lichtlimitierung und der Nährstofflimitierung vergleichbare PCEs erreichbar. Die sollte sich positiv auf die weitere Entwicklung von Photobioprocessen zur Biodieselgewinnung auswirken.

5.1.6 Einfluss der zyklischen Tag-Nacht Beleuchtung auf die Prozesseffizienz

Die in den Kapiteln 4.1.1 bis 4.1.6 gezeigten Ergebnisse wurden bei konstanter Beleuchtung der Algenkulturen gewonnen, um eine Aussage über die Prozesseffizienz zu treffen. Zur Beurteilung der technischen Umsetzbarkeit der Lipidsynthese zur Biodieselgewinnung musste jedoch auch der Einfluss von Tag-Nacht Beleuchtungszyklen auf die Lipid-Produktivität untersucht werden.

In vielen Outdoor-Versuchen wurde die volumetrische Produktivität in Bioreaktoren unter realen Tag-Nacht-Beleuchtungszyklen untersucht (z. B. [81, 207]). Eine Unterscheidung zwischen der Produktivität während der Beleuchtungsphasen und dem Biomasseverlust während der Nacht-Phasen wurde z. B. von Torzillo getroffen [208]. Ein Vergleich zur Effizienz bei Dauerbeleuchtung wurde in diesen Studien jedoch nicht getroffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die Effekte von Tag-Nacht-Beleuchtungszyklen im Vergleich zur kontinuierlichen Beleuchtung untersucht, um den Einfluss der Zyklen von der weiteren Prozessentwicklung zu entkoppeln. Untersucht wurde der Einfluss der

Beleuchtungszyklen auf die volumetrische Biomasse-Produktivität und im Speziellen auf die volumetrische Lipid- und Kohlenhydrat-Produktivität. Eine Referenzkultivierung wurde durchgeführt, die bei identischer integraler Photonenflussdichte im Tagesmittel dieselbe Energiemenge absorbierte (Kapitel 4.1.7).

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass *ceteris paribus* im gesamten Verlauf beider Versuche dieselbe volumetrische Lipid- und Biomasse-Produktivität erreicht wurden. Ebenso wurden vergleichbare Lipid-Massenanteile zum Ende der Kultivierung erzielt. In Übereinstimmung mit Torzillo [208] wurde gezeigt, dass die Konzentrationen der Biomasse und der Energiespeicherstoffe während der Nacht-Phasen sanken. Im Experiment sank die Biomassekonzentration während der Nacht um 1,5 % bis 5,3 % und die Abnahme war damit vergleichbar mit den Angaben von Torzillo [208]. Durch Messung der Lipid- und Kohlenhydratkonzentration konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl Kohlenstoff als auch Lipide während der Nacht-Phase zur Atmung remobilisiert wurden. Eine präferentielle Verstoffwechslung eines der beiden Energiespeicherstoffe konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Gesamtenergiebilanzierung ergab keine Vorteile der kontinuierlichen Beleuchtung gegenüber der Tag-Nacht-Beleuchtung. Somit ist davon auszugehen, dass der Energiebedarf während der Dunkelheit demjenigen des kontinuierlich vorhandenen Energiebedarfs des Erhaltungsstoffwechsels entspricht. Demnach stellen Nacht-Phasen grundsätzlich kein Problem bei der Prozessentwicklung dar, da sie den Ertrag nicht in erhöhtem Maße mindern. Dennoch sind Dunkelphasen und die daraus resultierenden Verluste von Lipiden und Biomasse durch Atmung unter realen Produktionsbedingungen nicht zu vermeiden. Diese Verluste können nach Literaturangaben 25 % der während des Tages neu gebildeten Lipide betragen [61]. Mit den in Kapitel 4.1.7 berechneten spezifischen Produktbildungs- und Atmungsraten wäre dieser Wert bei einer Nacht-Phase der Länge 10 h tatsächlich erreicht, wobei die gezeigten Daten stark von Parametern wie der Lichtintensität und der Biomassekonzentration abhängen. Generell empfiehlt sich eine Anpassung der Prozessführung in dem Sinne, dass die Ernteprozesse am Ende der Beleuchtungsphasen stattfinden, um Atmungsverluste zu reduzieren. Außerdem sollten weitere Einflussparameter, wie etwa die Temperaturführung, geprüft werden [208].

5.2 Weiterentwicklung der Prozessführung zur effizienten Lipidsynthese

Das primäre Ziel der Prozessentwicklung zur Biodieselproduktion ist neben der hohen Lipid-Produktivität das Erreichen einer positiven Energiebilanz des Prozesses durch möglichst effiziente Lichtnutzung [91]. Der hohe Energiebedarf zur Kultivierung und zum Ernten der Biomasse belastet die Energiebilanz der Biodieselproduktion stark [74, 209]. Daher muss einerseits versucht werden, durch Weiterentwicklungen z. B. auf den Gebieten der Reaktorentwicklung und der Regelungstechnik den Energiebedarf für die Kultivierung weiter zu reduzieren [51]. Andererseits muss durch die Steigerung der Effizienz der Konversion des Sonnenlichts, also der PCE, die Produktivität der Prozesse weiter verbessert werden. Letzteres setzt voraus, dass das Licht effizient genutzt wird. Dementsprechend müssen Effizienzverluste durch Sättigung und Photoinhibierung vermieden und darüber hinaus Transmissionsverluste reduziert werden. Es ist vorteilhaft die Reaktoren bei hoher Biomassekonzentration zu betreiben, da somit komplette Lichtabsorption erreicht wird und Transmissionsverluste minimiert werden. Des Weiteren werden Sättigungseffekte durch das Erreichen hoher Biomassekonzentrationen infolge der gegenseitigen Abschattung der Zellen reduziert. Hohe Biomassekonzentrationen wirken sich des Weiteren mindernd auf die energetischen Kosten für das Ernten der Biomasse aus [61, 124, 210].

Um die hohen Transmissionsverluste und die geringe Produktivität zu Beginn des Satzbetriebes zu vermeiden wurden zwei Prozessführungsvarianten zur Produktion von *P. tricornutum* angewandt - die diskontinuierliche Kultivierung mit Erntezyklen (Kapitel 4.2.1) und ein zweistufiges kontinuierliches Verfahren (Kapitel 4.2.2). Im ersten Fall wurde durch periodisches Ernten und Auffüllen mit frischem Medium erreicht, dass stets eine ausreichend hohe Biomassekonzentration im Reaktor für die fast vollständige Lichtabsorption und Synthese von neuer Biomasse mit hoher volumetrischer Produktivität zur Verfügung stand. Die Produktivität schwankte zwischen 293 mg/(l·d) und 662 mg/(l·d) und auch die PCE war nicht in allen Perioden gleich hoch, sondern schwankte im Bereich zwischen 2,0 % und 4,7 %. Ein vergleichbares Vorgehen ist bei Rodolfi et al. beschrieben [81]. Dort wurde in einer Outdoor-Kultivierung unabhängig von der Biomassekonzentration alle 3 Tage 30 % des Mediums ausgetauscht.

Bei der Kultivierung im zweistufigen kontinuierlichen Prozess wurden auf den beiden Stufen unterschiedliche PCE-Werte erreicht. Die Biomassesynthese bei vollständiger Nährstoffversorgung erfolgte mit einer Effizienz von 8,62 % und die Lipidsynthese bei

Nährstofflimitierung bei einer PCE von 6,27 %. Die Effizienz des gesamten Prozesses betrug 7,13 % und war damit deutlich höher als bei periodischem Ernten und in den Experimenten im Satzbetrieb (Abb. 4.3).

Experimentell hat sich die zweistufige kontinuierliche Prozessführung als die effizientere Methode erwiesen. Vorteilhaft ist dabei, dass die beiden Phasen der Biomasse- und Lipidbildung entkoppelt werden können. Dabei kann durch die Abstimmung der Flüssigvolumina zwischen beiden Reaktoren oder beiden Reaktorteilen die Biomassekonzentration und somit die Lichtverteilung in beiden Reaktoren unabhängig gewählt werden. Im Idealfall können optimale Bedingungen bezüglich der Lichtverteilung innerhalb des Reaktors erreicht und über längere Zeiträume aufrechterhalten werden. Eine Anpassung der Verdünnungsrate an die Lichtintensität bzw. ein Betrieb im Turbidostat-Modus ist Voraussetzung dafür, dass das Fließgleichgewicht bei wechselnden Lichtintensitäten aufrechterhalten werden kann. Fernández et al. demonstrierten, dass eine mehrtägige kontinuierliche Prozessführung im Chemostat bei Tag-Nacht-Zyklen möglich ist, indem sie die Verdünnungsrate nachts auf null reduzierten [211]. Außerdem kann über das Verhältnis der Flüssigkeitsvolumina der Reaktoren die Verweilzeitverlängerung in der Lipidakkumulationsphase gesteuert werden. Nachteilig ist prinzipiell, dass sich aufgrund der charakteristischen Verweilzeitverteilung kontinuierlicher Prozesse einzelne Zellen auch eine wesentlich kürzere Verweilzeit im zweiten Reaktorkompartiment haben können und dadurch weniger Lipide akkumulieren.

Bei der Prozessführungsvariante mit diskontinuierlichen Erntezyklen ist von Nachteil, dass die Biomassekonzentration sprunghaften Änderungen ausgesetzt ist. Dadurch müssen sich die Zellen an geänderte Lichtintensitäten anpassen, wobei die Photo-Akklimatisation auf verschiedenen physiologischen Ebenen Zeitkonstanten zwischen Sekunden und Stunden aufweist [91, 202, 212]. Demnach ist davon auszugehen, dass die Zellen nach Ernten und Verdünnen der Kultur mit frischem Medium über einen längeren Zeitraum nicht optimal an die Bedingungen im Reaktor angepasst sind. Beim Wechsel des Wachstumsmediums induzieren zudem Temperaturdifferenzen, pH-Änderungen und weitere Faktoren Stress, die sich in einer kurzzeitigen Minderung der Wachstumsraten niederschlagen. Dies wurde auch in Chemostat-Kulturen beobachtet [156]. Durch die kurzzeitig hohen pH-Werte und verzögerte Akklimatisation unmittelbar nach dem Ernten und Verdünnen der Biomasse können demnach möglicherweise die beobachteten Minderungen in der Produktivität erklärt werden.

Zudem besteht ein höherer Investitionsbedarf durch den zusätzlichen apparativen Aufwand, da das frische Medium vor Zugabe in den Reaktor mit CO₂ gesättigt werden müsste, um starke pH-Schwankungen beim Verdünnungsprozess zu vermeiden. Dies wurde im gezeigten Experiment nicht umgesetzt. Im Falle der kontinuierlichen Kultivierung kann wegen der moderaten Verdünnungsraten auf das Vorsättigen des Mediums mit CO₂ im Zulauf verzichtet werden. Der Massentransfer im Reaktor ist in der Regel ausreichend, um eine Ausbildung von stärkeren pH-Gradienten durch den Medienzulauf zu vermeiden. Ein zweites Reaktorkompartiment ist in beiden Varianten der Prozessführung notwendig, um eine räumliche Trennung von Biomasse- und Lipidsynthese zu ermöglichen. Insgesamt hat sich somit der zweistufige kontinuierliche Prozess als vorteilhaft erwiesen.

Im zweistufigen kontinuierlichen Prozess wurden PCE-Werte erreicht, die diejenigen aus den oben gezeigten Satzkultivierungen (siehe Kapitel 4.1.4) leicht überstiegen. Im gezeigten Experiment wurde eine aktive Biomassekonzentration von ca. 1,6 g/l erreicht. Bei einer Lichtintensität von 300 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ wurden von der aktiven Biomasse ca. 9 $\mu\text{E}/(\text{g} \cdot \text{s})$ absorbiert. Nach Abb. 4.6 liegen die spezifischen Produktbildungsraten bei dieser absorbierten Photonenmenge im Übergangsbereich der Lichtlimitierung in den Sättigungsbereich der Produktbildungskinetik. Dementsprechend wurden im Fließgleichgewicht die Bedingungen so gewählt, dass der optimale Produktionspunkt erreicht wurde. Ein weiterer Grund für die höhere PCE könnte der höhere Energieeintrag durch die Begasung sein, denn auf der ersten Prozessstufe wurde das Flüssigkeitsvolumen aufgrund der technischen Umsetzung mit einer höheren Begasungsrate begast. Experimentelle Untersuchungen haben demonstriert, dass die Produktivitäten in Kulturen von *P. tricornutum* durch einen höheren Energieeintrag gesteigert werden können. Dies beruht auf der höheren Frequenzen von Hell-Dunkel-Zyklen durch stärkere radiale Durchmischung innerhalb der Flüssigphase. Dadurch sind die Zellen bei starken Lichtgradienten innerhalb des Reaktors kürzeren Dunkelphasen ausgesetzt, was bei geeigneten Frequenzen zur effizienteren Photonennutzung führt [57, 59, 60, 213].

5.3 Simulation der Speicherlipidakkumulation von *P. tricornutum*

Durch die hier vorgestellte Modellierung sollte das physiologische Verhalten und im Speziellen die Speicherlipidakkumulation von *P. tricornutum* mathematisch beschrieben werden. Das Wachstum der Mikroalgen ist durch verschiedenartige Restriktionen begrenzt, die in der Modellierung durch Bilanzgleichungen und weitere Ungleichungen abgebildet

wurden. Die Restriktionen bestehen im Wesentlichen aus der begrenzten Lichtabsorption und Nährstoffverfügbarkeit. Das Lösen des Systems der Bilanzgleichungen führt aufgrund der Anzahl physiologischer Freiheitsgrade zu keinem eindeutigen Ergebnis. Dennoch kann das Wachstum erfolgreich simuliert werden, indem man ein zellinhärentes Maximierungskalkül voraussetzt. Durch die Implementation der linearen Programmierung bzw. des Simplex-Algorithmus zur Beschreibung des vorliegenden Optimierungsproblems gelangt man zu einer Lösung und die Raten der Biomasse-, Speicherlipid- und Kohlenhydratbildung können berechnet werden.

Das Modell zeigte insbesondere die Fähigkeit zu präzisieren, dass die Akkumulation von Speicherlipiden und Speicherkohlenhydraten zeitgleich mit unterschiedlichen Raten erfolgt. Dabei beschreibt es als dynamisches Modell sehr gut das transiente Verhalten und den Übergang in die nährstofflimitierte Wachstumsphase, während viele andere Modelle lediglich die Zustände im Fließgleichgewicht simulieren und weniger auf die Dynamik des Wachstums eingehen (z. B. [35, 80, 204, 214, 215]).

Das von Droop publizierte Modell der Speicherlipidakkumulation unter Nährstofflimitierung [183] stellt die wesentliche Grundlage vieler weiterer Modelle in diesem Kontext dar (z. B. [215, 216]). Eine wesentliche Schwäche dieses Modells ist es, dass es nicht zur Simulation lichtlimitierter Kulturen angewandt werden kann [35]. Eine Erweiterung der Berechnung der Wachstumsrate in Abhängigkeit der zellinternen Quota und der Lichtintensität ist jedoch möglich [35]. Durch Integration der Wachstumsrate über die Lichtweglänge kann dabei das Wachstum der Kultur berechnet werden [35]. Im vorliegenden Modell dagegen ist die Lichtabsorption und Energiekonversion in der Photosynthese von der Berechnung der Wachstumsrate entkoppelt, wodurch eine zeitliche Überlagerung von Licht- und Nährstofflimitierung problemlos simuliert werden konnte (vgl. Abb. 4.13). Zudem verzichtet das Modell auf die Betrachtung zellinterner Quota [183], deren mechanistische Interpretation z. B. durch Lemesle in Frage gestellt wurde [217], sondern beschreibt die physiologischen Veränderungen während der Limitierung mechanistisch durch die Unterteilung in aktive Biomasse und Speicherkomponenten.

Eine integrative Modellierung eines Photobioprozesses erfordert die Betrachtung und Simulation der Vorgänge mit sehr verschiedenartigen Zeitkonstanten [35]. So laufen Prozesse der Lichtreaktion innerhalb weniger Millisekunden ab [14], während die Zirkulation durch Lichtgradienten in Abhängigkeit der radialen Durchmischung bis zu wenigen Sekunden dauern kann [37]. Darüber hinaus nimmt die Akklimatisation an neue Lichtverhältnisse

Minuten bis Stunden in Anspruch [202, 218]. Im Gegensatz zum Versuch, alle Zeitskalen in der Modellierung zu erfassen und eine mechanistische Simulation auf verschiedenen Ebenen (Photosynthese, Hydrodynamik, Wachstumskinetik) zu integrieren, wurde hier der Fokus auf die Modellierung der Physiologie unter Berücksichtigung der Restriktionen durch Energie- und Massenbilanzen betrachtet. Dementsprechend wurden einige Vereinfachungen implementiert. So wurde die Möglichkeit der Produktivitätssteigerung durch Hell/Dunkel-Zyklen [37] nicht betrachtet, dagegen jedoch die globale Lichtabsorption der Kultur.

Die Lichtverteilung innerhalb des Reaktors hängt von vielen Parametern ab. So beeinflusst die Biomassekonzentration nicht nur über die Pigmentierung und damit die Lichtabsorption die Lichtgradienten innerhalb des Reaktors, sondern abhängig von der Zellzahl und intrazellulären Strukturen werden Photonen im PAR-Bereich gestreut [219]. Die Komplexität der daraus resultierenden Lichtverteilung wurde nicht in vollem Umfang berücksichtigt, sondern die Lichtverteilung wurde durch exponentielle Abnahme der Lichtintensität entlang des Lichtwegs modelliert (vgl. [35]). Zudem wurde die Anpassung des intrazellulären Chlorophyll-Gehalts als wesentlicher Mechanismus der Photoakklimation [202, 220] nicht gesondert modelliert. In der Simulation war daher die Kalibrierung von zusätzlichen Parametern erforderlich, da die Variabilität des beobachteten Extinktionskoeffizienten durch Gleichung (4.7) berücksichtigt werden musste. Dennoch grenzte dies nicht die Aussagekraft des Modells ein, da ein separater Datensatz - die Messungen der PFD transmittierten Lichts - zur Verfügung stand, um diesen Teil des Modells vom Rest zu entkoppeln. Die phänomenologische Beschreibung des beobachteten Extinktionskoeffizienten beruhte im Modell auf einer funktionalen Abhängigkeit von der Konzentration aktiver Biomasse. Dieses Vorgehen resultierte aus der experimentellen Beobachtung, dass sich die optischen Eigenschaften der gesamten Kultur nach Eintritt der Nährstofflimitierung nicht wesentlich veränderten. Insbesondere bei Experimenten mit geringen NaNO_3 -Startkonzentrationen konnte beobachtet werden, dass die PFD des transmittierten Lichts bei unvollständiger Lichtabsorption konstant blieb und zwar bei einem ähnlichen Niveau wie bei Eintritt der Limitierung. Dementsprechend war nicht zu erwarten, dass sich die Absorptionseigenschaften und Streuungseigenschaften der Kulturen während der Akkumulation der Speicherstoffe wesentlich ändern.

Eine weitere Vereinfachung wurde dadurch getroffen, dass der zyklische Elektronentransport nicht berücksichtigt wurde. Experimentelle Ergebnisse bei nicht-nährstofflimitiertem Wachstum zeigten, dass der Anteil zyklischen Elektronentransports bei einzelligen Algen

ohnehin gering und der lineare Elektronentransport dominierend ist [221]. Die Stöchiometrie der NADPH- bzw. ATP-Synthese (4.13) und (4.14) wird durch den zyklischen Elektronentransport beeinflusst. Dieser Effekt ist nicht in der Modellierung berücksichtigt. Eine Auswirkung auf die Effizienz der Photosynthese selbst ist jedoch durch die Berechnung des Wirkungsgrades in (4.9) berücksichtigt. Auch wenn die gegebene Formel zunächst Effekte des nicht-photochemischen Quenching quantifizieren soll, fließt dennoch ein effizienzmindernder höherer Anteil des zyklischen Elektronentransports bei der Parameterkalibrierung mit experimentellen Daten ein (Abb. 4.12). Eine weitere Verbesserung der Modellierung könnte generell durch Einbeziehen des zyklischen Elektronentransports erreicht werden, wobei dies vor allem bei der Simulation von Experimenten mit hohen Lichtintensitäten sinnvoll ist [221].

Des Weiteren wurde die Annahme getroffen, dass die Zusammensetzung der aktiven Biomasse keinen zeitlichen Variationen unterworfen ist. Es ist zu erwarten ist, dass die makromolekulare Zusammensetzung der Zellen innerhalb gewisser Grenzen variiert. Dennoch wiesen die Messungen der Ausbeutekoeffizienten von Sulfat und Nitrat darauf hin, dass die elementare Zusammensetzung aktiver Biomasse konstant war. Dies wurde sowohl für das Einzelerperiment bestimmt als auch für die Ausbeutekoeffizienten aus verschiedenen Experimenten (Abb. 4.4). Die Simulation zeigte, dass die Konstanz der Zusammensetzung aktiver Biomasse grundsätzlich getroffen werden kann und dass die Simulation mit experimentellen Daten im nicht-nährstofflimitierten Bereich sehr gut übereinstimmte. Konstante Ausbeutekoeffizienten dürfen dagegen nicht in Bezug auf die Gesamtbiomassekonzentration angenommen werden, da der Massenanteil des betrachteten Elements durch die Akkumulation von Speicherstoffen drastisch reduziert werden kann [203]. Aus diesem Grund weicht auch das Modell von Droop deutlich von dem von Monod eingeführten Modell mit der Annahme konstanter Ausbeutekoeffizienten ab [156] und betrachtet stattdessen die intrazelluläre Konzentration des limitierenden Elements.

Die Simulation (Abb. 4.13) hat gezeigt, dass trotz der Unkenntnis der expliziten intrazellulären Regulationsmechanismen und unter Vernachlässigung der Modellierung des metabolischen Netzwerks mit allen Einzelreaktionen eine erfolgreiche Modellierung und Simulation durchgeführt werden konnte. Die Annahme der Zielfunktion des Organismus, nämlich Maximierung der Energiekonversion absorbierten Lichts und der Synthese von aktiver Biomasse und Speicherkomponenten, genügt, um durch Berücksichtigung von Massenbilanzen und Energiebilanzen die Physiologie von *P. tricornutum* in der

nährstofflimitierten und nicht-nährstofflimitierten Phase zu beschreiben. Obwohl das System aus linearen Restriktionen selbst, welches sich aus den Bilanzgleichungen und kinetischen Beschränkungen ergibt, unterbestimmt ist, können die verbleibenden Freiheitsgrade durch die lineare Programmierung bestimmt werden. Dadurch werden alle Synthese- und Aufnahmeraten berechnet.

Im Droop-Modell findet eine Trennung zwischen Aufnahme und Verbrauch des limitierenden Substrats für die Synthese neuer Biomasse statt [156]. Die Reduktion der Wachstumsrate ist bei Droop direktes Resultat der sinkenden Quota des limitierenden Elements. Dies unterscheidet sich von den experimentellen Ergebnissen (siehe z. B. Abb. 4.2), die zeigen, dass unmittelbar nach dem Erschöpfen des Nitrats im Medium die Akkumulation der Speicherstoffe begann. Zudem zeigte die Bilanz, dass die Synthese aktiver Biomasse direkt eingestellt wurde und die Neubildung von Biomasse lediglich auf der Akkumulation stickstofffreier Moleküle beruhte. Daher ist davon auszugehen, dass keine intrazelluläre Speicherung des limitierenden Elements stattfindet. Auch auf größere intrazelluläre Reorganisationsprozesse, wobei signifikante Mengen des limitierenden Elements intrazellulär freigesetzt und für neue Syntheseleistungen genutzt werden können, deuten die experimentellen Ergebnisse nicht hin. Darin zeigt sich die Vorteilhaftigkeit des hier verfolgten Ansatzes und der gezeigten Modellierung, die die Unterscheidung in aktive Biomasse und Speichermoleküle trifft. Die Simulation verdeutlichte, dass die Synthese aktiver Biomasse unmittelbar nach Aufbrauchen des limitierenden Elements im Medium eingestellt wurde.

Dennoch musste auch in diesem Ansatz der Modellierung berücksichtigt werden, dass die experimentell beobachteten Wachstumsraten gegen Ende der Kultivierungen bei hohem Gehalt an TAG kontinuierlich reduziert wurden. Dies wurde in der Modellierung durch die empirischen Sättigungskinetiken in Gleichung (4.19) erreicht. Hier zeigte die Simulation, dass ein weiterer Erkenntnisgewinn notwendig ist, um die zugrundeliegenden Mechanismen mathematisch zu beschreiben. Denkbar ist, dass die Akkumulation von Lipiden und Kohlenhydraten durch räumliche Restriktionen oder die Löslichkeit der Kohlenhydrate beschränkt ist. Darüber können ein hoher Umschlag der TAGs durch oxidativen Abbau und Neusynthese [39] und die thermodynamisch ungünstige Akkumulation von Produkten in Gleichgewichtsreaktionen zu einer Verringerung der Effizienz führen. Dies würde sich in derselben Weise wie Sättigungseffekte bei der Synthese von Speicherstoffen äußern.

Ähnlich wie die Bildung von Speicherlipiden, deren Synthese nicht nur der Energiespeicherung dient, sondern auch zur Vermeidung der Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff beiträgt [84, 222], werden auch Karotinoide gebildet, um solchen oxidativen Stress zu vermeiden. Dies war im Laufe der Nährstofflimitierung anhand experimenteller Daten zu erkennen (siehe Anhang A3). Eine hohe spezifische Karotinoidkonzentration trägt zur Steigerung der Energiedissipation durch nicht-photochemisches Quenching bei [223, 224]. Dadurch sinkt grundsätzlich der Wirkungsgrad der photosynthetischen Umwandlung absorbierten Lichts und der assoziierten Synthese von ATP und NADPH. Auf makroskopischer Ebene kann auch dies die spezielle Ausprägung der Lipidakkumulation bzw. der beobachteten Sättigungskinetik erklären. Jedoch ist die Akkumulation der Karotinoide eher als Effekt zu betrachten und weniger als Ursache für die Reduktion der Syntheseraten gegen Ende der Kultivierung.

Die zuletzt genannten möglichen mechanistischen Ursachen für die empirisch beobachtete Sättigung bzw. Produktinhibierung wurden in der Modellierung nicht explizit berücksichtigt, da quantitative Daten nicht vorhanden und die genannten Effekte in der Literatur nicht hinreichend beschrieben waren. Dennoch erzwingt die Modellierung, dass die Neubildung von ATP und NADPH dem Verbrauch entsprechen. Wenn gleichzeitig hohe Konzentrationen von TAGs und Speicherlipiden vorliegen, tritt demnach der Fall auf, dass ATP und NADPH nicht weiter limitieren, sondern im Überschuss vorhanden sind. Unklar ist, inwiefern bereits auf der Ebene der Photosynthese die Syntheseraten von ATP und NADPH unter diesen extremen Bedingungen reduziert sind oder ob auf der Ebene des Metabolismus ein erhöhter Energiebedarf auftritt. In der Modellierung bestehen daher Freiheitsgrade auf beiden Ebenen. Einerseits findet ein gegebenenfalls erhöhter Energiebedarf für den Erhaltungsstoffwechsel in (4.15) und (4.16) Berücksichtigung, da dieser mit der Zunahme der Gesamtbiomassekonzentration steigt. Andererseits können die photosynthetischen Raten der Synthese von ATP und NADPH geringere als die durch (4.13) und (4.14) spezifizierten Maximalwerte annehmen. Dies würde einer höheren Energiedissipation durch Karotinoide auf der Ebene der Photosynthese entsprechen.

Da die zugrundeliegenden Mechanismen unzureichend bekannt und quantifiziert sind, wurde die „Energiedissipation“ auf beiden Ebenen nicht weiter unterschieden. Ohnehin treten solche Effekte nur unter extremen Bedingungen auf, da ATP und NADPH limitieren, solange nicht beide Speicherstoffe in sehr hohen Konzentrationen vorliegen.

Die Simulation zeigt insbesondere, wie im Prozess der Lipidakkumulation die Energiebilanz die Bildung von Speicherstoffen beschränkt. Das Modell enthält zwei Schwerpunkte, die Betrachtung der Effizienz auf der Ebene der Photosynthese, wo die Raten der NADPH- und ATP-Synthese berechnet werden, und die Ressourcenallokation der Nährstoffe und Energie für die Synthese der Zellkomponenten. Auf der Ebene der Photosynthese wurden zwei Ansätze verfolgt, um die Effizienz in Abhängigkeit der Lichtintensität zu berechnen. Der Ansatz von Camacho Rubio et al. [42] beschreibt die mechanistische Modellierung auf der Ebene der Photosysteme und betrachtet die Zeitkonstanten der Übergänge der Photosysteme zwischen dem ruhenden, aktivierten und inhibierten Zustand als Basis für die Beschreibung der Lichtkinetik. Obwohl die Kalibrierung der Parameter zur guten Beschreibung der Lichtkinetik führt, wird durch die Berücksichtigung der experimentell beobachteten Photoinhibition (Abb. 4.12) die Interpretation der Parameterwerte des Modells schwieriger. Daher wurde ein zweiter Ansatz entwickelt, der aus der Beobachtung der Abhängigkeit der Wachstumsraten von der PFD den Wirkungsgrad der Lichtnutzung berechnet. Durch Kenntnis des Wirkungsgrades konnte auf Verluste durch Energiedissipation geschlossen werden. Beide Ansätze stimmten sehr gut überein und erwiesen sich als geeignet den Wirkungsgrad der Photonennutzung zu beschreiben. Dies war essentiell, um die Raten der ATP- und NADPH-Synthese, r_{ATP} und r_{NADPH} , zu berechnen. Diese Werte sind von kritischer Bedeutung für das Modell, da sie die Wachstumsrate der Biomasse begrenzen.

Berechnet man gemäß den Angaben in Tabelle 4-5 den ATP-Bedarf der Lipidsynthese und vergleicht diesen mit dem ATP-Verbrauch für die Synthese von aktiver Biomasse, so zeigt sich dass der ATP-Bedarf für die TAG-Synthese letzteren um ca. 73 % übersteigt. Dagegen zeigen die Ergebnisse aus Abschnitt 4.1.2, dass die Verbrennungsenthalpie von TAGs ca. 66 % größer ist als diejenige der aktiven Biomasse. Insgesamt ist der ATP-Verbrauch zur Steigerung der Verbrennungsenthalpie der Biomasse um 1 kJ bei der Synthese von TAGs lediglich ca. 4 % höher als bei der Bildung von aktiver Biomasse. Demnach kann die Bildung von Speicherlipiden – neben der Bedeutung bei der Vermeidung oxidativer Schädigung der Zellen [84, 222] – als effiziente Strategie der Zelle zur Energiespeicherung angesehen werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Manipulation der Lipidsynthesewege auf genetischer Ebene zur Steigerung der Prozesseffizienz nicht vielversprechend ist. Lediglich die Qualität des Biodiesels kann so durch die Manipulation der Fettsäurezusammensetzung oder Synthese modifizierter Kohlenwasserstoffe beeinflusst werden [91]. Vielmehr ist die

Energiebilanz begrenzend, so dass einerseits eine signifikante Steigerung der Lipid-Produktivität erreicht werden könnte, indem die Synthese von Reservekohlenhydraten durch Mutagenese und Selektion oder DNA-Rekombinationstechnik unterbunden werden könnte. Andererseits zeigt sich die Bedeutung der Energiedissipation auf Ebene der Photosynthese, welche die Syntheseraten von ATP und NADPH mindert [225]. Hier kann durch ausreichende Lichtverdünnung im Zuge der Reaktorentwicklung eine erhebliche Effizienzsteigerung erreicht werden [51].

5.4 Scale-up des Photobioprozesses

5.4.1 Maßstabsübertragung in den Semi-Pilotmaßstab

Im Allgemeinen können die meisten Photobioreaktoren auf eine der drei gängigen Ausführungen, Blasensäulen, Rohrreaktoren und vertikal ausgerichtete Plattenreaktoren, zurückgeführt werden [51, 119]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiger Horizontalreaktor präsentiert, der am ehesten als Plattenreaktor klassifiziert werden kann, jedoch charakteristische Unterschiede zu gängigen Prototypen aufweist (siehe Abschnitt 3.2.8). Durch die horizontale Ausrichtung und geringe Schichtdicke sollen auf der begrenzten Grundfläche im Flüssigvolumen hohe Biomassekonzentrationen erreicht werden. Außerdem soll der Bedarf an Hilfsenergie reduziert werden, da der zu überwindende hydrostatische Druck zur Blasenbegasung durch die horizontale Ausrichtung geringer ist. Eine wünschenswerte Weiterentwicklung wäre in der weiteren Entwicklungsstufe die Membranbegasung innerhalb des Reaktors, um die Notwendigkeit der Blasenbegasung komplett zu vermeiden. Durch langsame laminare Strömung innerhalb des Reaktors soll das Sedimentieren der Zellen vermieden werden und das Flüssigkeitsvolumen zur Vermeidung von Gradienten (pH, Nährstoffe) ausreichend gemischt werden. Es zeigte sich in der getesteten Ausführung, dass eine laminare Strömung in der Hauptreaktorkammer anzunehmen ist, jedoch in den Schlauchstrecken und in der Pumpe turbulente Strömungsprofile vorlagen (siehe Kapitel 4.4.1). Dabei war die Strömungsgeschwindigkeit ortsabhängig sehr unterschiedlich und reichte von $9 \cdot 10^{-3}$ m/s bis 0,5 m/s. Mikroskopische ließ sich keine Zellschädigung nachweisen. Dennoch kann diese grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden. Brindly Alías et al. wiesen Zellschädigung bei Verwendung einer Kreiselpumpe anderer

Ausführung aber bei einem vergleichbaren Volumenstrom nach [57]. Es wurde jedoch in Bezug auf die eingestrahlte PFD hohe Produktivität erreicht, was zumindest auf ein geringes Ausmaß der Zellschädigung hinweist, sofern diese vorlag. Eine Minimierung der Strömungsgeschwindigkeit bei gleichzeitiger Gewährleistung ausreichenden Massentransfers ist ein Ziel der weiteren Reaktor- und Prozessentwicklung. Dies soll außerdem der weiteren Reduktion der notwendigen Hilfsenergie dienen.

Die Untersuchung des Gastransfers zeigte, dass die erzielbaren k_{1a} -Werte stark vom Gasvolumenstrom abhängig waren. Sie waren ausreichend, um bei einem Gasvolumenstrom von 0,05 vvm und einem Volumenanteil von lediglich 2 % CO_2 in der Gasphase eine Biomasse-Produktivität von annähernd $20 \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ zu erzielen. Dabei kann der CO_2 -Volumenanteil deutlich gesteigert werden, um höhere Produktivität zu erzielen. Insgesamt zeigte sich damit, dass die CO_2 -Versorgung des Reaktors bei Blasenbegasung unkritisch ist. Auch eine kritische Akkumulation von O_2 konnte experimentell nicht beobachtet werden. Dies war wichtig festzustellen, da eine Akkumulation oder Übersättigung mit O_2 negative Auswirkungen auf die Wachstumsrate haben oder gar zur Zellschädigung führen kann [226]. Die Testkultivierungen der beiden Spezies *P. tricornutum* und *C. vulgaris* demonstrierten, dass hohe Biomassekonzentrationen – selbst bei geringen Lichtintensitäten – erzielbar waren. Für den Einsatz im Freiland ist jedoch eine weitere Oberflächenvergrößerung anzustreben, da hohe Lichtintensitäten sonst zur Lichtsättigung und Photoinhibierung führen.

5.4.2 Prozessintegration durch Kopplung heterotropher und autotropher Kultivierung von SCO-akkumulierenden Mikroorganismen

In der Literatur finden sich verschiedenartige Modelle, wie die Wirtschaftlichkeit und Energiebilanz von Prozessen zur Biodieselproduktion mit Mikroalgen durch die Etablierung integrierter Prozesse verbessert werden können. So schlägt Chisti einen integrierten Prozess vor, der die Rückführung von Nährstoffen nach der Abtrennung von Biomasse und die Verwertung von Restbiomasse vor. Letztere verbleibt nach der Extraktion der Lipide und soll als Tierfutter und zur Biogasgewinnung Verwendung finden. Zudem soll Biogas zur Gewinnung von Elektrizität und damit zur Energieversorgung der Reaktoren dienen [46].

Ein anderes Konzept der Integration sieht die heterotrophe Kultivierung von Hefe und autotrophe Kultivierung von Algen in sequentieller Abfolge vor, um Abwässer zu klären.

Dabei dient die phototrophe Stufe zur Verstoffwechslung verbleibender Stickstoffquellen und zur Aufnahme von Phosphaten [227].

Im hier gezeigten Ansatz dagegen soll die heterotrophe Kultivierung genutzt werden, um CO₂ zur Versorgung des phototrophen Wachstums von Algen zur Verfügung zu stellen. Zudem sollen beide parallele Stufen des Prozesses zur Synthese von Einzellerölen (SCO) dienen.

Algen fixieren beim phototrophen Wachstum CO₂. Dabei wird zur Bildung von 1 g Biotrockenmasse mit einem Kohlenstoff-Massenanteil von 50 % 1,83 g CO₂ fixiert. Bei höherem Lipidanteil kann dieser Wert weiter steigen und 2 g des fixierten CO₂ pro 1 g Biomasse übersteigen [74]. Im Allgemeinen wird dabei davon ausgegangen, dass CO₂ frei verfügbar ist [93]. Es kann aus verschiedenen Quellen bezogen werden. Diese sind einerseits atmosphärisches CO₂, andererseits aber auch CO₂ aus Industrieanlagen, aus Rauchgas von Kraftwerken oder aus löslichen Karbonaten [67]. Atmosphärisches CO₂ eignet sich in der Regel nicht wegen des geringen CO₂-Partialdruckes, der lediglich Wachstum mit geringer Wachstumsrate ermöglicht, wie Abb. 4.22 zeigt. Die Eignung von Rauchgas ist strittig [228], da teilweise negative Einflüsse von Stickstoffoxiden und Schwefeloxiden auf die Wachstumsraten und die Produktivität des Wachstums nachgewiesen wurden [229]. Andere Versuche attestieren die Toleranz gewisser Anteile der Stickstoff- und Schwefeloxide durch die Algen [230]. Das ökonomische Potential der Rauchgasnutzung wurde bislang lediglich durch Simulation untersucht, diese bestätigt jedoch die Vorteilhaftigkeit dieser Technologie [231]. Mata et al. schlagen vor, wegen des hohen Anteils an CO₂ im Rauchgas auf Spezies mit Toleranz hoher CO₂-Partialdrücke zu kultivieren [78]. Das Problem hoher CO₂-Partialdrücke, die vermutlich das Wachstum durch den starken pH-Effekt inhibieren, ist allerdings durch eine Mischung mit Umgebungsluft technisch leicht zu vermeiden. Obwohl eine Sequestrierung des CO₂ aus Industrieanlagen wünschenswert ist und alternative Verfahren der Sequestrierung hohe Kosten verursachen und nur mit hohem Aufwand zu realisieren sind [69, 232], liegen optimale Standorte für Anlagen phototropher Bioreaktoren oft weit von Industrieanlagen und städtischen Gebieten entfernt [233]. Da die CO₂-Gewinnung aus Rauchgas und der Transport Kosten verursachen [232], ist es sinnvoll diese in der Kostenkalkulation der Prozesse und ökonomischen Bewertung nicht zu vernachlässigen [153]. Beneman et al. schätzen, dass die Kosten der CO₂-Versorgung im Bereich von 7 % bis 16 % der Gesamtkosten des Betriebs einer Produktionsanlage liegen [234]. Die Kosten für CO₂ wurden bei Richardson et al. in die Kalkulation einbezogen und mit 0,15 \$/kg bis 0,20 \$/kg beziffert.

Bei einer Jahresproduktion von ca. 80 t/(ha·a) [72] ergibt sich somit ein Einsparungspotential von annähernd 30.000 \$/(ha·a) des sequestrierten CO₂. Dabei ist nicht berücksichtigt, dass ein treibendes Konzentrationsgefälle für den CO₂-Massentransfer notwendig ist und daher notwendigerweise ein Teil des CO₂ im Gasstrom ungenutzt bleibt. Dementsprechend fällt das Kosteneinsparungspotential deutlich höher aus.

Die Idee, den Abgasstrom einer heterotrophen Hefekultivierung zu nutzen wurde experimentell durch Puangbut [235] in Schüttelkolben umgesetzt, wobei der Abgasstrom um einen Luftstrom zur Begasung der Algenkulturen ergänzt wurde.

Betrachtet man die Kohlenstoffbilanz des Prozesses, so kann mit den beobachteten Biomasse-Produktivitäten, die im Durchschnitt 22 g/(l·d) betragen, und einem Kohlenstoff-Massenanteil von 50 % bei nicht-nährstofflimitiertem Wachstum der CO₂-Ausstoß berechnet werden. Dazu wurde ein Ausbeutekoeffizient von 0,5 g/g angenommen. Es ergibt sich aus der Bilanz, dass bei gegebenem Ausbeutekoeffizient 0,3 g des in der Glucose enthaltenen Kohlenstoffs im Katabolismus vollständig veratmet werden. Somit hat ein solcher Prozess das Potential 1,1 g CO₂ pro 1g neu gebildeter Biomasse auszustoßen, was bei der gegebenen Produktivität einer täglichen CO₂-Freisetzung von 24,2 g/(l·d) entspricht. Berechnet man den CO₂-Bedarf für die Photobioreaktoren an einem unbewölkten Sommertag, so ergibt sich mit einer Produktivität von ca. 50 g/(m²·d) [34] ein Wert von 91,5 g/(m²·d). Eine Anlage der Größe 1 ha könnte demnach mit Hefe-Fermentern mit einem gesamten Flüssigkeitsvolumen von 38 m³ mit CO₂ versorgt werden. Berücksichtigt man einerseits, dass ein Teil des in die Photobioreaktoren eingebrachten CO₂ die Anlage wieder ungenutzt verlassen muss, um das treibende Konzentrationsgefälle aufrechtzuerhalten, so ergibt sich in Abhängigkeit des k_{1a} der Algenanlage ein wesentlich größeres notwendiges Volumen der Hefekultur als in den experimentellen Bedingungen.

In der experimentellen Umsetzung (Kapitel 3.2.9) war das Flüssigkeitsvolumen der Hefekultur etwas geringer dimensioniert. Der Photobioreaktor hatte eine beleuchtete Oberfläche von ca. 1 m² und der Hefe-Fermenter ein Flüssigkeitsvolumen von 1,2 l. Damit war er etwa um den Faktor 3 kleiner dimensioniert als in der theoretischen Berechnung vorgegeben. Dagegen war allerdings auch die PFD im Vergleich zu Outdoor-Bedingungen wesentlich geringer mit 250 μE/(m²·s). Somit war die Dimensionierung der Anlagen ausreichend abgestimmt. Eine CO₂-Limitierung trat zu keinem Zeitpunkt auf (Kapitel 5.4.2).

Im Gegensatz zu den geringen CO₂-Partialdrücken, die experimentell erreicht wurden, ist davon auszugehen, dass der CO₂-Partialdruck im Abgas bei der technischen Hefekultivierung ca. 10 % erreichen kann. Ein solcher Betriebspunkt ist in Hinsicht auf den Massentransfer in Photobioreaktoren anzustreben. Im Abgas der Algenkulturen ist ein CO₂-Partialdruck von etwa 1 % einzustellen, um einen ausreichenden Massentransfer zu gewährleisten. Somit wird im gesamten Reaktor ein genügend großes Konzentrationsgefälle aufrechterhalten. Die Differenz geht aus der Gasphase zunächst in die Flüssigphase über und wird durch den phototrophen Metabolismus in O₂ umgewandelt. Auch ein vollständiges Recycling der Gasphase zwischen beiden Reaktoren ist aufgrund der Stöchiometrie prinzipiell möglich. Dazu muss durch entsprechende Regelung der Reaktoren ausreichender Massentransfer in beiden Reaktoren und eine Abstimmung auf die Verbrauchsraten von O₂ und CO₂ im jeweils anderen Reaktor gewährleistet sein. Eine weitere Prozessintensivierung wäre durch die Reduktion des Volumenanteils von N₂ und eine Steigerung der Volumenanteile von O₂ und CO₂ denkbar.

Die Herausforderung der Prozesskopplung bestand darin, den Prozess der Hefekultivierung durch gezieltes Nachfüttern und zwischenzeitlichen Medientausch an die längere Laufzeit der Algenkultivierung anzupassen. Außerdem musste durch die Einstellung des pH-Reglers gewisse pH-Schwankungen zugelassen werden, um bei zeitlich variierenden CO₂-Partialdrücken im Gasstrom nicht ständig titrieren zu müssen und damit den osmotischen Druck stark zu erhöhen.

Insgesamt hat sich gezeigt, dass diese Variante der Prozessintegration grundsätzlich die CO₂-Versorgung der phototrophen Mikroalgen-Kultivierung durch die verbundene Hefefermentation ermöglicht. Damit erlaubt diese Technologie die Biodieselproduktion auch in Gebieten, die keinen direkten Zugang zu CO₂-haltigen Abgasströmen industrieller Anlagen haben, jedoch sonst günstige Bedingungen für die phototrophe Kultivierung bieten.

5.5 Die Nutzung mono- bzw. dichromatischer Lichtquellen zur Kultivierung von Mikroalgen

Nach Tredici tritt bei Beleuchtung der Photobioreaktoren mit Sonnenlicht ein Verlust der Photonenenergie von 21 % allein dadurch auf, dass zur Anregung der Photosysteme prinzipiell Photonen der Wellenlänge 680 nm bzw. 700 nm ausreichend sind und bei der

Absorption kurzwelligerer Photonen deren höhere Energie durch Quenching dissipiert wird [34].

Yocum und Blinks zeigten bereits 1957, dass der Einfluss der Wellenlänge sowohl die Effizienz der Photosynthese als auch die Pigmentierung von Rotalgen beeinflussen. Dabei wurde die Freisetzung von molekularem Sauerstoff in der Photosynthese als Maß zum Vergleich der Effizienz genutzt. Sie fanden bei der Beleuchtung mit rotem Licht und Adaption an dessen Wellenlänge (660 nm) eine höhere Sauerstoffentwicklung als bei nicht adaptierten Zellen und bei Beleuchtung mit Licht kürzerer Wellenlänge [236]. Wallen und Green beobachteten höhere Wachstumsraten und CO₂-Fixierungsraten bei der Beleuchtung mit blauem im Vergleich zu weißem und grünem Licht [237]. In dem hier betrachteten Kontext sollte eine Bewertung der Effizienz der Lichtnutzung stehen, wobei auch der Energiegehalt der Photonen, welcher gemäß (4.28) von der Wellenlänge abhängt, in die Berechnung eingeht. Es zeigte sich, dass die PCE bei der Beleuchtung mit monochromatischem rotem Licht grundsätzlich höher war als bei der Beleuchtung mit weißem Licht (Abb. 4.18). Die Steigerung der Effizienz war bei allen untersuchten PFDs signifikant.

Experimentell wurde die Effizienz im Verlauf von Satzkultivierungen bestimmt. Dadurch wurden prozessrelevante Daten hinsichtlich der Eignung der monochromatischen Lichtquelle erhoben, denn in beiden Versuchsreihen (Beleuchtung mit rotem und weißem Licht) waren die Algen im Zeitraum der Messung der PCE an die herrschenden Lichtbedingungen adaptiert und akklimatisiert.

Da im lichtlimitierten Bereich bei nicht-sättigender PFD gearbeitet wurde, konnten Rückschlüsse direkt auf der Ebene der Effizienz der Photosynthese selbst getroffen werden, wo die Unterschiede der Effizienz der Lichtnutzung verursacht werden. Durch die Lichtlimitierung und Beleuchtung mit geringer PFD war nicht davon auszugehen, dass die nachfolgenden enzymatischen Schritte der Dunkelreaktion geschwindigkeitslimitierend waren [42]. Damit wurden Effizienzverluste durch Lichtsättigung und Photoinhibierung ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu wäre bei sättigender Lichtintensität der Energieverlust bei Beleuchtung mit blauen Photonen durch Dissipation erwartungsgemäß noch größer und die Effizienzunterschiede der Lichtquellen noch deutlicher zu erkennen. Dies ergibt sich daraus, dass die gesamte Energie eines absorbierten Photons durch nicht-photochemisches Quenching dissipiert wird, falls dieses auf ein angeregtes Photosystem trifft [42, 238]. Die Dissipation der Energie eines blauen Photons zieht eine stärkere Minderung des Wirkungsgrads nach sich

als diejenige der Energie eines roten Photons. Insgesamt kann aus den experimentellen Ergebnissen somit gefolgert werden, dass die Beleuchtung mit monochromatischem Rotlicht, dessen Wellenlänge an das Absorptionsmaximum des Chlorophyll a angepasst ist, deutliche Effizienzvorteile im Vergleich zur Beleuchtung mit weißem Licht bietet. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Effizienzvorteile bereits auf der Ebene der photosynthetischen Nutzung der Photonen entstehen. Bei gleichzeitigem Auftreten von Lichtsättigung wären die Effizienzunterschiede erwartungsgemäß noch deutlicher ausgeprägt.

Eine mögliche Anwendung bleibt jedoch zunächst auf die Herstellung hochpreisiger Produkte beschränkt, solange das monochromatische Licht durch künstliche Lichtquellen bereitgestellt werden muss. Da nur ein Teil der Energie des eingestrahnten Lichts in der Verbrennungsenthalpie neu gebildeter Biomasse wiederzufinden ist, muss zur Produktion von Biodiesel grundsätzlich das Sonnenlicht genutzt werden.

Sollten jedoch zukünftig praktikable Technologien zur Verfügung stehen, um Sonnenlicht verlustfrei in spektrale Bereiche aufzuteilen und diese verschiedenen Anwendungen zuzuführen, so könnte in Erwägung gezogen werden, lediglich den Rotanteil des Lichts für die Photosynthese zu nutzen. Dadurch könnte auch die PCE durch die Vermeidung hoher Sättigungsverluste bei hohen Lichtintensitäten gesteigert werden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob ein zusätzlicher Blauanteil im Licht über die Aktivierung von Photorezeptoren einen Einfluss auf die Morphologie, Wachstumsrate oder Effizienz ausübt. Es ist bekannt, dass die Chlorophyll-Synthese in vielen Grünalgen durch Rezeptoren reguliert wird, welche blaues Licht detektieren [239, 240]. Durch López-Figueroa wurde die Beteiligung von Phytochrom bei der Regulation der Chlorophyll-Synthese bei der Rotalge *Chondrus crispus* gefordert und eine Abhängigkeit der Phycoerythrin-Synthese von grünem Licht nachgewiesen [239].

Ein zusätzlicher Blauanteil trug zunächst nicht zur Steigerung der Wachstumsrate oder der Prozesseffizienz bei. Während die Wachstumsraten bei einem zusätzlichen Blauanteil im Vergleich zur Beleuchtung mit Rotlicht lediglich geringfügig reduziert waren, war der negative Effekt in Bezug auf die PCE etwas stärker (Abb. 4.19). Durch den höheren Energiegehalt der blauen Photonen war eine geringere PCE bei unveränderter Produktivität zu erwarten [34]. Letztere war dagegen sogar leicht reduziert, so dass die Auswirkungen des Blauanteils auf die PCE sogar noch deutlicher waren.

Ein Einfluss der Lichtqualität auf die Morphologie konnte weder bei *N. salina* noch bei *P. tricornutum* mikroskopisch beobachtet werden. Die Untersuchung des Einflusses der

Lichtqualität auf die Pigmentsynthese war in dem experimentellen System nur eingeschränkt möglich. So war beispielsweise der Vergleich des spezifischen Chlorophyll-Gehalts bei verschiedener Lichtqualität nicht möglich, da die Reaktoren im Satzbetrieb betrieben wurden und die zeitliche Variation der Biomassekonzentration zur starken Überlagerung mit Effekten der Photoakklimation geführt hat [202]. Lediglich die Verhältnisse von Chlorophyll a und Karotinoiden konnten verglichen werden. Es zeigte sich, dass *N. salina* ein statistisch signifikant höheres Verhältnis von Chlorophyll a zu Karotinoiden bei Beleuchtung mit mono- bzw. dichromatischem Licht aufwies (Abb. 4.20). Ein zusätzlicher Blauanteil beeinflusste dieses Ergebnis interessanterweise nicht. Demnach ist davon auszugehen, dass weder rotes noch blaues Licht die Synthese der Karotinoide beeinflusst. Dagegen absorbieren diese das Licht in der Grünlücke, was auf eine Regulation der Pigmentsynthese über diesen Anteil des Spektrums hindeutet. Relevanz könnte dieser Zusammenhang etwa bei der gezielten Induktion der Karotinoid-Synthese haben, falls diese etwa als Lebensmittelzusatzstoffe erzeugt werden sollen. Karotinoide tragen zur Energiedissipation durch nicht-photochemisches Quenching bei [223, 224] und könnten dadurch die Prozesseffizienz herabsetzen. Eine Steuerung der Absorptionseigenschaften der Zellen durch Kontrolle der spektralen Zusammensetzung des eingestrahnten Lichts könnte deshalb auch prozesstechnisch relevant sein, weil so etwa der spezifische Karotinoidgehalt der Zellen gezielt reduziert werden könnte.

5.6 Einfluss der Konzentration von gelöstem CO₂ auf das Wachstum von *C. vulgaris* und modellprädiktive Regelung

5.6.1 Beeinflussung der Wachstumskinetik von *C. vulgaris* durch die PFD und die Konzentration des gelösten CO₂

In Vorbereitung der Untersuchung des Einflusses von gelöstem CO₂ auf die Wachstumsrate von *C. vulgaris* wurde zunächst die Wachstumskinetik untersucht, die sich in Abhängigkeit der PFD ergibt. Es sollte eine PFD im Übergangsbereich zwischen lichtlimitiertem und lichtgesättigtem Wachstum gewählt werden, um sicherzustellen, dass maximale Wachstumsraten erreicht werden und somit der vollständige Einfluss der CO₂-Konzentration auf die Wachstumsrate der Alge beschrieben werden konnten. Eine Überlagerung der Effekte von CO₂-Limitierung und Lichtlimitierung sollte also zunächst vermieden werden. Das

Wachstum von *C. vulgaris* im Bereich geringer CO₂-Partialdrücke könnte allerdings einen signifikant höheren Energiebedarf des Wachstums durch Aktivierung der CCMs erfordern [133, 241]. Dieser könnte durch die Wahl der PFD im Übergangsbereich gegebenenfalls eine Auswirkung auf die Wachstumsrate und vor allem auf die volumetrische Produktivität haben. Experimentell wurde die höchste Wachstumsrate bei ca. 250 μE/(m²·s) gemessen. Hier waren bereits Sättigungseffekte zu beobachten. Die mathematische Beschreibung der Wachstumskinetik ergab, dass bereits bei ca. 33 μE/(m²·s) die halbmaximale Wachstumsrate erreicht war. Dennoch wurde ein deutlich ausgeprägter Übergangsbereich identifiziert und es war erkennbar, dass für die Aufnahme der CO₂-Kinetik eine PFD von 210 μE/(m²·s) nach den obigen Kriterien geeignet war. Degen et al. konnten ebenfalls bei Experimenten mit demselben Stamm um ca. 200 μE/(m²·s) die maximalen Wachstumsraten messen und gaben eine PFD bei 250 μE/(m²·s) als lichtsättigend an [242]. Eine ähnliche Abhängigkeit der photosynthetischen O₂-Bildung von der Lichtintensität konnten Doucha et al. für einen anderen Stamm von *C. vulgaris* zeigen [243].

In Bezug auf den Einfluss des gelösten CO₂ auf die Wachstumsrate von *C. vulgaris* belegen die experimentellen Ergebnisse einen starken Einfluss der Konzentration von CO₂ im Bereich sehr geringer Partialdrücke. Bei Partialdrücken von CO₂, die geringer als 0,5 % des Systemdrucks betragen, verringerte sich die Wachstumsrate deutlich. Auch eine starke Verringerung der volumetrischen Produktivität in der lichtlimitierten (und daher linearen) Wachstumsphase bei höherer Biomassekonzentration konnte beobachtet werden. Demnach sind derartig geringe Partialdrücke in der Prozessführung zu vermeiden. Reine Luftbegasung sollte vermieden werden, da in diesem Falle eine CO₂-Limitierung auftritt und eine stark verminderte volumetrische Produktivität zu erwarten ist.

Höhere Partialdrücke, die 0,5 % des Systemdrucks überstiegen, konnten die Wachstumsrate nicht weiter steigern. Es zeigte sich ein deutlicher Sättigungseffekt der CO₂-Konzentration in Bezug auf die Wachstumsrate. Galloway et al. nennen einen höheren Partialdruck von dCO₂ = 2 % als optimalen Arbeitspunkt für die Kultivierung von *Chlorella* [207, 244]. Es wurde hier zudem festgestellt, dass die Wachstumsrate bei einer weiteren Steigerung des CO₂-Partialdrucks leicht abnahm. Dies wurde in anderen Untersuchungen erst bei höherem Partialdruck um ca. 20 % bzw. 65 % des Systemdrucks beobachtet [137, 138]. Die wesentliche Schwäche dieser Untersuchungen ist, dass der Einfluss des CO₂-Partialdrucks in diesen und weiteren Studien nicht in Lösung gemessen und geregelt wurde, sondern vom CO₂-Partialdruck in der Gasphase auf die Lösung zurückgeschlossen wurde [137-139].

Dennoch ist letzterer sehr stark vom Verhältnis des systemspezifischen Parameters k_{1a} zur CO_2 -Aufnahmerate durch die Algen abhängig. Letzterer wiederum hängt von der Biomassekonzentration und der PFD ab. So ist beispielsweise bei geringem k_{1a} -Wert, hoher Biomassekonzentration und starker Strahlung in Lösung ein CO_2 -Partialdruck zu erwarten, der denjenigen in der Gasphase deutlich unterschreitet. Außerdem wurde in vielen Untersuchungen der pH nicht geregelt, so dass der Einfluss des CO_2 -Partialdrucks nicht entkoppelt von pH-Effekten untersucht wurde (z. B. [139, 245]). Die in den Kapiteln 3.2.7 und 4.6.2 beschriebene experimentelle Vorgehensweise ermöglichte es dagegen, den Einfluss der CO_2 -Konzentration unabhängig von Einflüssen des pH-Werts zu untersuchen, da beide Parameter unabhängig geregelt wurden. Da jedoch der CO_2 -Partialdruck über die chemischen Gleichgewichte zwischen gelöstem CO_2 , Kohlensäure, Hydrogencarbonat und Carbonat auch die Protonenkonzentration beeinflussen, musste der pH-Wert bei höherem CO_2 -Partialdruck mit größeren Volumina Lauge eingestellt werden. Dadurch lässt sich ein sekundärer Einfluss des osmotischen Druckes auf die Wachstumsrate nicht ausschließen. Dies erklärt möglicherweise auch die leichte Reduktion der Wachstumsraten bei höheren CO_2 -Konzentrationen. Eine weitere Stärke des experimentellen Ansatzes ist die Regelung des Partialdrucks in Lösung. Dieser kann erheblich vom Partialdruck in der Zuluft abweichen. Eine deutliche Auswirkung des CO_2 -Partialdrucks auf die volumetrische Produktivität während des lichtlimitierten Wachstums war zunächst nicht unbedingt zu erwarten. Dennoch wurde sie experimentell nachgewiesen. Die Linearität des Wachstums ergibt sich in der Lichtlimitierung dadurch, dass ATP und NADPH mit konstanten Raten synthetisiert werden und dementsprechend auch die CO_2 -Fixierung der Dunkelreaktion wie auch Reaktionen des Anabolismus lediglich mit begrenzten Raten ablaufen. Geringere volumetrische Produktivität während der Lichtlimitierung bei geringem CO_2 -Partialdruck lässt auf einen zusätzlichen Verbraucher im Stoffwechsel oder einen erhöhten Energieverbrauch der Reaktionen der CO_2 -Fixierung schließen. Obwohl die Aktivierung der CCMs nicht direkt auf molekularer Ebene untersucht werden konnten, liegt daher die Vermutung nahe, dass die Beobachtung deutlich verringerter Biomasse-Produktivität durch den erhöhten Energieverbrauch der CCMs [133, 241] verursacht wurde. Die Regulation der CCMs erfolgt in Abhängigkeit der CO_2 -Verfügbarkeit für die Zelle [246], so dass CCMs vorwiegend bei geringem CO_2 -Partialdruck aktiviert werden. Der höhere Energieverbrauch beruht etwa auf der ATP- und NADPH-Verbrauch für den aktiven Transport von CO_2 und Hydrogencarbonat-Ionen über die Plasmamembran in die Zelle und über die Membranen der Chloroplasten ins Stroma, wo

RuBisCO oft in den Pyrenoiden konzentriert ist [133, 140]. Daneben bedeutet die Expression von Carboanhydrase als Teil der CCMs einen gewissen Energieaufwand für die Zelle infolge des ATP und NADPH-Bedarfs der RNA- und Proteinbiosynthese [133]. Eine Steigerung der Biomasse-Produktivität um mehr als 400 % bei gleicher PFD zeigte, dass dieser Energieverbrauch nicht in der Prozessführung zu vernachlässigen ist, denn damit war auch die PCE bei $d\text{CO}_2 = 4,5 \%$ in Lösung ca. 400 % höher als bei $d\text{CO}_2 = 0,03 \%$. Somit zeigt sich, dass die ausschließliche Begasung mit Luft nicht ausreichend ist, um Biomasse mit hoher PCE zu erzeugen. Eine Steigerung der volumetrischen Produktivität von ca. 20 % zwischen $d\text{CO}_2 = 0,5 \%$ und $d\text{CO}_2 = 4,5 \%$ zeigt außerdem, dass es durchaus sinnvoll sein kann, eine höhere CO_2 -Konzentration für die Kultivierung zu wählen. Daher wurde für anschließende Versuche zur CO_2 -Regelung ein CO_2 -Partialdruck von 1 % des Systemdrucks in Lösung gewählt.

5.6.2 Etablierung und Test einer modellprädiktiven CO_2 -Regelung

Auch wenn phototrophe Kulturen in vielen experimentellen Arbeiten mit einem konstanten CO_2 -Volumenanteil begast werden [154, 247] oder teilweise die Begasung mit Abgasen technischer Anlagen ohne gesonderte Kontrolle des CO_2 -Volumenanteils bei der Kultivierung im technischen Maßstab vorgeschlagen wird [243], so ist die Regelung der CO_2 -Konzentration in Photobioprocessen in mehrfacher Hinsicht zu empfehlen. Zeitliche und räumliche CO_2 -Konzentrationsunterschiede bedingen über die Kopplung der Gleichgewichtsreaktionen der Kohlensäure pH-Gradienten im Reaktor [48]. Insbesondere lokale Konzentrationsunterschiede in Rohrreaktoren stellen hohe Anforderungen an die pH-Regelung in diesen Systemen [153]. Darüber hinaus wirken sich geringe CO_2 -Konzentrationen ungünstig auf die Wachstumskinetik der Mikroalgen aus (siehe 4.6.2) und müssen daher durch die Regelung vermieden werden. Zuletzt stellt die Begasung mit CO_2 einen Kostenfaktor bei der Kultivierung der Mikroalgen dar, sofern keine CO_2 -haltigen Abgase industrieller Anlagen als C-Quelle genutzt werden können [234, 248].

Die modellprädiktive Regelung bietet viele Vorteile, wie z. B. einfache Berücksichtigung von Totzeiten und Stellgrößenbeschränkungen, Integrationsmöglichkeit von Störgrößenaufschaltung und die Einbeziehungen mehrerer Kriterien in die zu optimierende Gütefunktion [153].

In Bezug auf die Regelung von Photobioprocessen ist etwa eine Regelung unter Minimierung des Verlustes von ungenutztem CO_2 denkbar. Problematisch ist, dass komplexe Zusammenhänge den biologischen Systemen zugrunde liegen, die modelltheoretisch nicht vollständig erfasst werden können. Außerdem zeigen solche Systeme nichtlineares Verhalten, wenn man das Biomassewachstum in die Betrachtung einbezieht, es also als Teil der Übertragungsfunktion der Regelstrecke gesehen wird [155, 156]. Die Regelung des pH-Werts durch ein lineares Modell ist ferner nur in direkter Umgebung des Arbeitspunktes möglich [155]. Aus diesen Gründen wurden in der Literatur überwiegend Regler beschrieben, die nur Teile des Systems modellieren, oder solche, die eine modellprädiktive Regelung auf Basis beobachteten Systemverhaltens durchführen. So ist bei Büchner eine pH-Regelung zu finden, die lediglich den lichtabhängigen CO_2 -Verbrauch der Algen in Form einer Störgrößenaufschaltung berücksichtigt, der eigentlichen Regelabweichung des pH-Werts dagegen mit einem PI-Regler gegensteuert [249]. Berenguel et al. beschreiben ein Regelungskonzept, das nicht zuletzt auch wegen der Komplexität des Reaktorsystems auf der mathematischen Beschreibung der Übergangsfunktion beruht. Physikalische Modelle der Fluidodynamik, des Gastransfers und des Biomassewachstums fanden in diesem Fall keine Anwendung [153, 155]. Ein umfangreiches physikalisches Modell als Grundlage der modellprädiktiven Regelung findet sich dagegen bei Hu et al. [157].

Um der Problematik der Nichtlinearität zu begegnen wurde das physikalische Modell auf den Massentransfer beschränkt. Dazu wurde die CO_2 -Konzentration in Lösung aus der Regelabweichung, also über die Differenz des pH-Werts von der Führungsgröße, berechnet. Die Differentialgleichung (3.14) wurde dazu mit Hilfe der Euler-Approximation gelöst, was durch die geringen Abweichungen des pH-Werts vom Sollwert zu vernachlässigbar geringen Fehlern führt. Demnach beschränkt sich die eigentliche Regelung nur noch auf den durch Gleichung (3.13) beschriebenen Massentransfer. Dieses reduzierte System ist linear und zeitinvariant. Es weist PT_1 -Verhalten auf. Der CO_2 -Verbrauch durch Wachstum wurde in die Störgrößenaufschaltung integriert. Nach Berenguel ist die Sonneneinstrahlung die Hauptstörgröße des Systems [155]. Sie kann in einer technischen Anlage durch einen zusätzlichen PAR-Sensor einfach gemessen werden, so dass die Einbeziehung in die Störgrößenaufschaltung sinnvoll ist. Während Buehner et al. für die Störgrößenaufschaltung eine Modellierung der lichtabhängigen Wachstumskinetik zugrunde legen [249], wird im hier dargestellten Regler mit Hilfe der geschätzten PCE der maximale Verbrauch des CO_2 bestimmt. Dieses Verfahren ist gekennzeichnet durch die relativ einfache Berechnung. Nur

die Reaktorgeometrie muss über das Verhältnis der berücksichtigt werden und der Parameter PCE muss geschätzt werden. Lediglich bei geringen Biomassekonzentrationen und hohen Transmissionsverlusten führt dieses Verfahren zur Überschätzung des Verbrauchs.

Ungelöst bleibt das Problem, dass der pH-Wert während des Kultivierungsverlaufs nicht ausschließlich auf die Veränderung der CO_2 -Konzentration reagiert. Auch der Verbrauch von Nitrat und weitere Effekte des Kulturmediums haben einen Einfluss auf den pH-Wert [249, 250]. Experimentell wurde im Satzbetrieb bei ausgeschaltetem pCO_2 -Regler festgestellt, dass das Ausgleichen des pH-Effekts der Nitrataufnahme mit Salpetersäure im proportionalen Verhältnis zum Wachstum erfolgte. Dies zeigte sich daran, dass die Konzentration des Nitrats bei eingeschalteter pH-Regelung und Titration mit HNO_3 konstant blieb (siehe Abb. A3.8). Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass der Verbrauch von Nitrat einen starken pH-Effekt während des Kultivierungsverlaufs hervorrief. Da die Nitrataufnahme durch die Zellen eine Erhöhung des pH-Werts nach sich zieht, kommt eine zeitgleiche Regelung des pH-Werts durch Säuretitration nicht in Frage, wenn der pH-Wert über den CO_2 -Volumenstrom geregelt wird. Aus diesem Grund stieg in den durchgeführten Experimenten (Kapitel 4.6.5) die Konzentration des gelösten CO_2 während der Tag-Phasen leicht an. Die Verringerung der Protonenkonzentration musste hier durch einen höheren CO_2 -Partialdruck ausgeglichen werden. In den anschließenden Nacht-Phasen musste der Anstieg des pH-Werts aufgrund der Aufnahme von Nitrat durch Titration mit Salpetersäure ausgeglichen werden. Eine pH-Regelung über die CO_2 -Begasung kompensiert also zwangsläufig auch weitere pH-Effekte und gleicht damit nicht ausschließlich den Verbrauch des gelösten Gases durch CO_2 -Fixierung der Mikroalgen aus.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Biomasse von Mikroalgen ist wegen des hohen Lipidgehalts und der hohen Wachstumsraten einiger Spezies ein vielversprechender Rohstoff für die Biodieselproduktion. Die energetische Nutzung der lipidreichen Biomasse gründet vorwiegend auf dem experimentellen Befund, dass die Umwandlung der durch die Mikroalgen absorbierten Lichtenergie in energiereiche Biomasse mit höherer Photokonversionseffizienz (PCE) erfolgt als im Falle lipidreicher Kulturpflanzen. Verschiedene publizierte Modelle nutzen die Kennzahl PCE um die möglichen Produktionsvolumina technischer Anlagen und den Flächenbedarf für die Produktion von Biodiesel zu berechnen sowie die Wirtschaftlichkeit der Technologie zu beurteilen. Die PCE des Wachstums von Algen während der Akkumulation von Speicherlipiden wurde bislang nicht experimentell untersucht. In dieser Arbeit wurde eine Methode vorgestellt, mit der die PCE in dieser für den Prozess entscheidenden Wachstumsphase bestimmt werden kann. Die hohe Genauigkeit dieser Energiebilanzierung beruht einerseits auf der Berücksichtigung der spektralen Eigenschaften des absorbierten Lichts. Andererseits wurde die Veränderung der Verbrennungsenthalpie während der Zunahme des spezifischen Lipidanteils in die Berechnung einbezogen. Eine weitere wichtige Voraussetzung zur Bestimmung der PCE war die Weiterentwicklung der Lipid-Quantifizierung. Mit Hilfe von fluoreszenzphotometrischen Messungen und der Kalibrierung durch die Gaschromatographie konnte die volumetrische Lipid-Produktivität in kleinen Reaktionsvolumina ermittelt werden.

Fraglich war außerdem, inwiefern die maximal erzielbare PCE durch die Physiologie der Zellen beschränkt ist. In einer experimentellen Reihe wurden die Konzentrationen des limitierenden Substrats variiert, so dass die Kulturen bei verschiedenen Biomassekonzentrationen in die Limitierung eintraten. Die Zellen waren folglich in allen Experimenten unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt, wobei sich insbesondere die Lichtgradienten innerhalb der Kulturen stark unterschieden. Somit konnte die Kinetik der Lipidbildung in Abhängigkeit der durch die Zellen absorbierten Lichtmenge gemessen werden. Die spezifische Lipidbildungsrate konnte im Falle des Modellorganismus *P. tricorutum* nicht weiter über einen maximalen Wert von 220 mg/(g·d) gesteigert werden. Wurden mehr als 9 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{s})$ Photonen durch die Biomasse absorbiert, so wurde die

zusätzlich absorbierte Energiemenge vollständig dissipiert. Die Produktbildungskinetik zeigt damit eine deutliche Analogie zur Lichtsättigung nicht-nährstofflimitierten Wachstums, welche in der Photobiotechnologie üblicherweise durch die PI-Kurve abgebildet wird. Die maximal in den Experimenten erzielbare PCE betrug 5,65 % in Bezug auf die Energie der durch die LED-Lichtquelle eingestrahlenen Photonen. Die in einigen Publikationen vertretene Annahme, dass die PCE bei der Lipidakkumulation deutlich geringer ist als die im Falle der Lichtlimitierung, konnte hier nicht bestätigt werden. Bei sonst gleichen experimentellen Bedingungen wurde bei der Lichtlimitierung eine PCE von 5,62 % ermittelt. Diese weicht damit lediglich geringfügig von der maximalen PCE bei Lipidakkumulation ab.

Die Modellierung der Physiologie der Mikroorganismen und die Validierung mit experimentellen Daten ergaben insbesondere, dass die Dissipation eines Großteils der absorbierten Energie bereits auf der Stufe der photosynthetischen Erzeugung von ATP und NADPH erfolgt. Damit konnte auch die Ursache für den speziellen Verlauf der Produktbildungskinetik auf die Lichtsättigung der Photosynthese zurückgeführt werden. Die Modellierung des Wachstums und der Akkumulation von Speichermolekülen erfolgte unter strikter Berücksichtigung linearer Restriktionen, welche die Energie- und Massenbilanzen repräsentierten. Dem Problem der Unterbestimmtheit des Gleichungssystems und der verbleibenden physiologischen Freiheitsgrade wurde durch die lineare Programmierung begegnet. Dazu wurde angenommen, dass die Organismen ihren Metabolismus auf die optimale Energiekonversion und maximales Wachstum ausrichten, und dies wurde in der zugehörigen Zielfunktion des Simplex-Algorithmus formuliert.

Durch die Etablierung eines zweistufigen kontinuierlichen Prozesses konnte die PCE des gesamten Prozesses bei räumlicher Trennung von Biomasse- und Lipidbildung weiter auf einen Wert von 7,13 % gesteigert werden. Das Verfahren wurde als Chemostat betrieben. In der ersten Stufe wurde im Fließgleichgewicht Biomasse mit hoher volumetrischer Produktivität erzeugt, während in der zweiten Stufe bei der Limitierung der Stickstoffquelle Lipide akkumulierten.

Der Einfluss von Tag-Nacht-Beleuchtungszyklen auf die Prozesseffizienz und die volumetrische Lipid-Produktivität wurde gesondert untersucht. Hierzu wurden zwei Satzkultivierungen mit gleicher zeitlich integraler Photonenflussdichte beleuchtet, wobei die Beleuchtung in einem Versuch einem Tag-Nacht-Zyklus folgte. In beiden Fällen wurden identische maximale Biomasse- und Lipidkonzentrationen erreicht. Zudem zeigten sich keine Unterschiede im Hinblick auf die durchschnittlichen volumetrischen Produktivitäten. Infolge

der Atmung wurden in der Nachtphase sowohl Reservelipide als auch Reservekohlenhydrate mobilisiert, um den Energiebedarf der Mikroorganismen zu decken. Durch Berechnung spezifischer Produktbildungs- und Verbrauchsraten konnten (nicht experimentell belegte) Literaturangaben bestätigt werden, wonach während der Nachtphase 25 % der während des Tages neu synthetisierten Lipide zur Energiegewinnung oxidiert werden. Dies ergibt sich rechnerisch bei einer Dauer der Nachtphase von 10 h.

Verschiedene Induktionsstrategien führen zur Speicherlipidakkumulation bei lipidreichen Mikroalgen. Während im Allgemeinen die Nährstofflimitierung als effizienteste Strategie gilt, wurde hier die Art der Nährstofflimitierung als weiterer möglicher Steuerungsparameter untersucht. Die Überlegenheit der Stickstofflimitierung im Vergleich zur Phosphorlimitierung wurde experimentell nachgewiesen, indem die Synthese von Speichermolekülen bei gleichen Konzentrationen aktiver Biomasse initiiert wurde und die volumetrischen Produktivitäten verglichen wurden. Von weiterer Bedeutung war die dabei, dass sich eine reproduzierbare Veränderung der Fettsäurezusammensetzung bei verschiedenen Induktionsstrategien erfassen ließ. Dies erlaubt – in beschränktem Maße - die gezielte Beeinflussung der Qualität des Biodiesels und der Konzentrationen hochpreisiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren, wie etwa der Eicosapentaensäure.

Im Rahmen des Scale-up des Bioprozesses wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Einerseits wurde ein Horizontalreaktor am Institut für Bioverfahrenstechnik entwickelt. In Satzkultivierungen wurde die Funktionalität des Systems belegt und weiter optimiert. Andererseits wurde ein integrierter Bioprozesses entwickelt. Durch die Kopplung von heterotropher Hefefermentation und phototropher Algenkultivierung wurde lipidreiche Biomasse in beiden gekoppelten Modulen produziert und dabei das CO₂-haltige Abgas der Hefekultur zur Versorgung des phototrophen Prozesses genutzt.

Nicht hinreichend bekannt war zu Beginn der Arbeit der Einfluss der Konzentration von gelöstem CO₂ auf die Wachstumsrate des Modellorganismus *C. vulgaris*. Durch Messung des CO₂-Partialdrucks im Medium und Regelung desselben konnte der Effekt auf die Wachstumsrate unter Entkopplung des Einflusses der CO₂-Konzentration auf den pH-Wert ermittelt werden. Hier ergab sich, dass die Algen bei einem CO₂-Partialdruck zwischen 0,5 % und 1 % des Systemdrucks im offenen System mit maximaler Rate wuchsen. Das Lösen von CO₂ im wässrigen Medium bewirkt eine Änderung des pH-Werts. Die quantitative Erfassung dieses Effekts erlaubte die Entwicklung und den erfolgreichen Einsatz einer modellprädiktiven Regelung. Auf Basis der Modellierung des Massentransfers prädizierte der

Algorithmus Zustände im zeitdiskretisierten System und minimierte durch Manipulation des CO₂-Volumenstroms die verbleibende Regelabweichung innerhalb des Prädiktionshorizonts. Die Regelgüte konnte durch die Implementierung einer zusätzlichen Störgrößenaufschaltung weiter verbessert werden. Hierbei diente die Messung der Lichtintensität, die als wesentliche Störgröße aufgefasst wurde, zur Berechnung der lichtabhängigen CO₂-Aufnahmerate der Mikroalgen. Die Berücksichtigung der geänderten CO₂-Aufnahmerate im Modell führte zur zeitnahen Kompensation bei sprunghaften Änderungen der Lichtintensität und zu einem günstigen dynamischen Verhalten des Reglers.

Insbesondere Daten aus Pilotanlagen und aus technischen Produktionsanlagen werden in naher Zukunft belegen müssen, ob die energetische Nutzung von Algenbiomasse einen signifikanten Beitrag zur Biodieselproduktion leisten kann. Dazu muss auch bei wechselnden Wetterbedingungen und bei signifikanten Temperaturschwankungen dauerhaft eine hohe Produktivität erzielt werden können, während viele publizierte Daten unter idealisierten Laborbedingungen erzeugt wurden. Die Vorgänge auf der physiologischen Ebene der Zellen müssen verstanden und die daraus abgeleiteten Anforderungen bei der Entwicklung von Prozessen und Photobioreaktoren berücksichtigt werden. Insbesondere auch die Integration einer umfassenden Regelungstechnik wird einen signifikanten Beitrag zur Effizienzverbesserung leisten und zu einer Weiterentwicklung der Technologie führen.

Abstract

Algae biomass is considered as a promising feedstock for biodiesel production because of the high specific lipid content and growth rates of several species. Algae can convert the absorbed light energy with higher photoconversion efficiency (PCE) to biomass than crop plants, which gives a promising outlook on energy-generation by use of microalgae biomass. Even though the PCE of algal growth during lipid accumulation was not known or experimentally proved some published models are based on this important key performance indicator and predict the output of plants and production volumes. Moreover, these models are often used for assessment of the economic viability of these processes. A method for determination of the PCE under lipid accumulation was developed in this work. The methodology gains high accuracy through the thorough energy balancing and consideration of the spectrum of the light source as well as the physiologic changes of the algae during growth. The latter was taken into account by measuring and calculating the change of the enthalpy of combustion of the biomass with changing specific lipid contents. Another key to successfully measuring the PCE was the improvement of the underlying lipid quantification method. Fluorescence photometry was applied and calibrated with data from gas chromatography to quantify the volumetric lipid productivity in small sample volumes with high accuracy.

Beside the quantification of the PCE itself it was unknown to what extent the PCE is restricted by the physiology of the cells. Therefore, a series of batch cultivations with varying concentrations of the limiting nutrient was conducted. The different cultures entered the limitation at different biomass concentrations leaving the cultures with fundamentally different light gradients. It was proved that lipid synthesis is kinetically dependent on the light intensity single cells are exposed to. The specific lipid synthesis rate reached a maximum of 220 mg/(g·d) in the case of *P. tricornutum*. Further increase of the light intensity – exceeding the optimal production point, where 9 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{s})$ photons are absorbed by the biomass – leads to high dissipation of absorbed energy. Kinetics of product processing can be considered analogous to the PI-curve that is representative for nutrient-replete growth of algae.

The maximum PCE which was attained amounted to 5.65 % of the energy of absorbed photons emitted by a LED-light source. A general assumption stated that the PCE of light limited growth must be considerably higher than that during lipid accumulation. This could not be confirmed by the experimental results of this work. Light limited growth resulted in

growth with a PCE of 5.62 % when all other conditions were identical to the cultivations with nutrient limitations.

Modeling of the algal growth and validation with experimental data demonstrated that dissipation of energy occurs mainly at the level of photosynthesis, where ATP and NADPH are synthesized. In this respect the model gave further evidence for the characteristic shape of the specific product processing kinetics. It supports the assumption that the saturation can be ascribed to light saturation of the photosynthetic apparatus. Modeling and simulation of the growth and storage molecule accumulation was based on linear restrictions imposed by energy and mass balances. Since the system of equations was underconstrained a linear programming approach was followed to handle the remaining physiologic degrees of freedom. The objective function of the simplex algorithm was formulated on the basis of the assumption that algae optimize sunlight to biomass conversion and maximize their growth rates.

Process efficiency could be further improved by the development of a two stage continuous process, where biomass and lipid synthesis are spatially separated. The PCE of the overall process amounted to 7.13 % in the chemostat mode, where biomass was synthesized under nutrient-replete conditions at the first stage and the nitrogen limitation induced lipid accumulation at the second stage.

The influences of day-night-cycles on the volumetric productivity and process efficiency are of specific importance. They need to be considered when biodiesel feedstock is to be produced at outdoor conditions. Therefore, two batch cultivations with constant illumination and day-night-cycles were compared. The photon flux densities impinging on the reactors on a daily base were identical so that the total energy absorbed by cultures was comparable. In both cases comparable maximal biomass and lipid concentrations were attained. Furthermore, daily volumetric lipid productivities showed no disparities. Respiration during the night was maintained by consumption of storage lipids and carbohydrates. The specific lipid synthesis and consumption rates affirmed that 25 % of the lipids synthesized during the day could be consumed at night if the length of the night was 10 h, an assumption which was published in literature but not supported by experimental evidence so far.

Different strategies can be applied to induce lipid accumulation in microalgae. While the limitation of nutrients is generally assumed to be the most effective method, effects of the nature of the nutrient limitation were not sufficiently investigated on. In this work, however, the limitation of nitrogen proved to be advantageous compared to a limitation of phosphorus,

because volumetric productivities were higher in these cultures. To ensure comparability the limitation was initiated at similar biomass concentrations in both experiments. Moreover, it was observed that the temporal changes of the fatty acid composition were identical in all experiments independent of the nature of the nutrient limitation. Therefore, the quality of the biodiesel feedstock and the concentration of high value polyunsaturated fatty acids at the time point of harvesting can be controlled to some extent.

Two different approaches were followed with respect to the scale-up of the process. On the one hand a photobioreactor with a horizontal orientation was developed at the institute and the functionality of the reactor concept was demonstrated in several batch cultivations. On the other hand an integrated process was established by combination of heterotrophic yeast fermentation and the phototrophic cultivation of algae. Single cell oils were produced at the two combined stages while the CO₂-enriched exhaust gas from the yeast fermentation was recycled to supply the algae with the gas.

At last the influence of the concentration of dissolved CO₂ on the growth rate of the model organism *C. vulgaris* was experimentally examined. In contrast to several published approaches the CO₂ partial pressure was measured with a sensor in the medium and the CO₂ partial pressure and pH-value were controlled independently. Therefore, both process parameters were uncoupled and the optimal range of the CO₂ partial pressure between 0.5 % and 1.0 % (of the system pressure) was identified. Algae grew with maximal specific growth rates in this range. Based on the pH-effects of changing concentrations of CO₂ in the aqueous medium a model predictive controller was developed and successfully implemented. The underlying time discretized mass transfer model is capable of predicting the future values of state variables of the system. Minimization of the control deviation within the predicted horizon leads to an optimal adjustment of the CO₂ volume flow rate. A further improvement was achieved by implementation of an additional feed-forward control. The changing light intensities, the measured disturbance of the feed-forward control, were recorded and served as basis to calculate the changing CO₂ uptake rates of the microalgae, which are then considered in the model. The controller showed robust dynamic behavior when tested under cyclic light intensity fluctuations.

Data of pilot and production plants will be required in the future to prove the applicability of the energetic utilization of microalgae biomass and assess whether this novel technology can substantially contribute to the diesel production for the transport sector. High productivities must be attainable and sustained during longer periods even under changing weather

conditions and at fluctuating temperatures, while currently most data are gained under idealized experimental conditions. Understanding the physiologic fundamentals on a cellular level is essential for successful process development. This knowledge must also be taken into account when novel reactors are designed. Finally, comprehensive control engineering will be required to sustain optimal growth conditions and ensure high productivities in large-scale plants. This will significantly contribute to improve economics and the energy balance of the overall process and promote this novel technology.

7 Literaturverzeichnis

1. Die Bundesregierung. 2013. Die Energiewende kommt voran. URL: <http://www.bundesregierung.de/Content/DE/Artikel/2013/05/2013-05-14-bilanzpapier-energiewende-kommt-voran.html> (25.10.2013)
2. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz; Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. 2010. Nationaler Biomasseaktionsplan für Deutschland. URL: http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/BiomasseaktionsplanNational.pdf?__blob=publicationFile (25.10.2013).
3. Bundesministerium für Bildung und Forschung. 2010. Nationale Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030. URL: <http://www.bmbf.de/pub/biooekonomie.pdf> (25.10.2013).
4. Singh, A., P.S. Nigam, J.D. Murphy. 2011. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*, **102**(1), 10-16.
5. Ragan, M. 1998. On the delineation and higher-level classification of algae. *European Journal of Phycology*, **33**(1), 1-15.
6. Huisman, J.M., G.W. Saunders. 2007. Phylogeny and classification of the algae. In: *Algae of Australia: Introduction*, (Eds.) P.M. McCarthy and A. Orchard, E., CSIRO Publishing, Melbourne, 66-103.
7. Entwisle, T.J., J. Huisman. 1998. Algal systematics in Australia. *Australian Systematic Botany*, **11**(2), 203-214.
8. Tomaselli, L. 2004. The Microalgal Cell. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, 3-19.
9. Liang, Y., N. Sarkany, Y. Cui. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, **31**(7), 1043-1049.
10. Whitmarsh, J., Govindjee. 2003. Photosynthesis. In: *digital Encyclopedia of Applied Physics*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
11. Blankenship, R. 1992. Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynthesis Research*, **33**(2), 91-111.
12. Horton, P., A. Ruban. 2005. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *Journal of experimental botany*, **56**(411), 365-373.
13. Bassham, J.A., A.A. Benson, M. Calvin. 1950. The Path of Carbon in Photosynthesis VIII. The Role of Malic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, **185**, 781-787.
14. Eberhard, S., G. Finazzi, F.-A. Wollman. 2008. The Dynamics of Photosynthesis. *Annual Review of Genetics*, **42**(1), 463-515.
15. Haehnel, W. 1984. Photosynthetic Electron Transport in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **35**(1), 659-693.
16. Hohmann-Marriott, M.F., R.E. Blankenship. 2011. Evolution of Photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, **62**(1), 515-548.
17. Raines, C. 2003. The Calvin cycle revisited. *Photosynthesis Research*, **75**(1), 1-10.
18. Hope, A.B. 1993. The chloroplast cytochrome bf complex: a critical focus on function. *Biochimica et Biophysica Acta*, **10**(1), 1-22.
19. Horton, P., A.V. Ruban, R.G. Walters. 1996. Regulation of Light Harvesting in Green Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**, 655-684.

-
20. Wingler, A., P.J. Lea, W.P. Quick, R.C. Leegood. 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **355**(1402), 1517-1529.
 21. Allen, J.F. 1992. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **22**(3), 275-335.
 22. Wraight, C.A., A.R. Crofts. 1970. Energy-dependent quenching of chlorophyll alpha fluorescence in isolated chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*, **17**(2), 319-27.
 23. Moller, I.M., P.E. Jensen, A. Hansson. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, **58**, 459-81.
 24. Osmond, B., B. Förster. 2006. Photoinhibition: Then and Now. In: *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment*, (Eds.) B. Demmig-Adams, W. Adams, III, and A. Mattoo, Vol. 21, Springer Netherlands, 11-22.
 25. Scheibe, R. 1987. NADP⁺-malate dehydrogenase in C3-plants: Regulation and role of a light-activated enzyme. *Physiologia Plantarum*, **71**(3), 393-400.
 26. Tarantino, D., C. Vannini, M. Bracale, M. Campa, C. Soave, I. Murgia. 2005. Antisense reduction of thylakoidal ascorbate peroxidase in Arabidopsis enhances Paraquat-induced photooxidative stress and Nitric Oxide-induced cell death. *Planta*, **221**(6), 757-765.
 27. Miyake, C., K. Asada. 1992. Thylakoid-Bound Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts and Photoreduction of Its Primary Oxidation Product Monodehydroascorbate Radicals in Thylakoids. *Plant and Cell Physiology*, **33**(5), 541-553.
 28. Falkowski, P.G., T.G. Owens. 1980. Light-Shade Adaptation : Two Strategies in Marine Phytoplankton. *Plant Physiology*, **66**(4), 592-5.
 29. Melis, A. 1991. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1058**(2), 87-106.
 30. Chen, M., T.S. Bibby, J. Nield, A. Larkum, J. Barber. 2005. Iron deficiency induces a chlorophyll d-binding Pcb antenna system around Photosystem I in *Acaryochloris marina*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **15**(3), 367-74.
 31. Dubinsky, Z., P.G. Falkowski, A.F. Post, U.M. van Hes. 1987. A system for measuring phytoplankton photosynthesis in a defined light field with an oxygen electrode. *Journal of Plankton Research*, **9**(4), 607-612.
 32. Genty, B., J.-M. Briantais, N.R. Baker. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **990**(1), 87-92.
 33. Jacobi, A., C. Steinweg, R.R. Sastre, C. Posten. 2012. Advanced photobioreactor LED illumination system: Scale-down approach to study microalgal growth kinetics. *Engineering in Life Sciences*, **12**(6), 621-630.
 34. Tredici, M.R. 2010. Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. *Biofuels*, **1**(1), 143-162.
 35. Bernard, O. 2011. Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO₂ mitigation and biofuel production. *Journal of Process Control*, **21**(10), 1378-1389.
 36. Perner-Nochta, I., C. Posten. 2007. Simulations of light intensity variation in photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, **131**(3), 276-285.
 37. Molina, E., F.G. Acién Fernández, F. García Camacho, F. Camacho Rubio, Y. Chisti. 2000. Scale-up of tubular photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, **12**(3-5), 355-368.

38. Duarte, P. 1995. A mechanistic model of the effects of light and temperature on algal primary productivity. *Ecological Modelling*, **82**(2), 151-160.
39. Wilhelm, C., T. Jakob. 2011. From photons to biomass and biofuels: evaluation of different strategies for the improvement of algal biotechnology based on comparative energy balances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **92**(5), 909-919.
40. Bolton, J.R., D.O. Hall. 1991. The Maximum Efficiency of Photosynthesis. *Photochemistry and Photobiology*, **53**(4), 545-548.
41. Onno Feikema, W., M.A. Marosvolgyi, J. Lavaud, H.J. van Gorkom. 2006. Cyclic electron transfer in photosystem II in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **7**, 829-34.
42. Camacho Rubio, F., F.G. Camacho, J.M.F. Sevilla, Y. Chisti, E.M. Grima. 2003. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnology and Bioengineering*, **81**(4), 459-473.
43. Fan, L.-H., Y.-T. Zhang, L. Zhang, H.-L. Chen. 2008. Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Membrane Science*, **325**(1), 336-345.
44. Cogne, G., J.F. Cornet, J.B. Gros. 2005. Design, operation, and modeling of a membrane photobioreactor to study the growth of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* in space conditions. *Biotechnology Progress*, **21**(3), 741-750.
45. Keys, A.J. 1986. Rubisco: Its Role in Photorespiration. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, **313**(1162), 325-336.
46. Chisti, Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, **26**(3), 126-131.
47. Pulz, O. 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**(3), 287-293.
48. Camacho Rubio, F., F.G.A. Fernández, J.A.S. Pérez, F.G. Camacho, E.M. Grima. 1999. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. *Biotechnology and Bioengineering*, **62**(1), 71-86.
49. Sukenik, A., R. Levy, Y. Levy, P. Falkowski, Z. Dubinsky. 1991. Optimizing algal biomass production in an outdoor pond: a simulation model. *Journal of Applied Phycology*, **3**(3), 191-201.
50. Brown, T.E., F.L. Richardson. 1968. The Effect of Growth Environment on the Physiology of Algae: Light Intensity. *Journal of Phycology*, **4**(1), 38-54.
51. Posten, C. 2009. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*, **9**(3), 165-177.
52. Zittelli, C.G., L. Rodolfi, M.R. Tredici. 2003. Mass cultivation of *Nannochloropsis sp.* in annular reactors. *Journal of Applied Phycology*, **15**(2), 107-114.
53. Zittelli, C.G., L. Rodolfi, N. Biondi, M.R. Tredici. 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, **261**(3), 932-943.
54. Sánchez Mirón, A., F. García Camacho, A. Contreras Gómez, E.M. Grima, Y. Chisti. 2000. Bubble-column and airlift photobioreactors for algal culture. *AIChE Journal*, **46**(9), 1872-1887.
55. Suzuki, T., T. Matsuo, K. Ohtaguchi, K. Koide. 1995. Gas-Sparged bioreactors for CO₂ fixation by *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **62**(4), 351-358.
56. Camacho Rubio, F., A. Sánchez Mirón, M.C. Cerón García, F. García Camacho, E. Molina Grima, Y. Chisti. 2004. Mixing in bubble columns: a new approach for

-
- characterizing dispersion coefficients. *Chemical Engineering Science*, **59**(20), 4369-4376.
57. Brindley Alías, C., M.C. García-Malea López, F.G. Acién Fernández, J.M. Fernández Sevilla, J.L. García Sánchez, E. Molina Grima. 2004. Influence of power supply in the feasibility of *Phaeodactylum tricornutum* cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, **87**(6), 723-733.
58. Terry, K.L. 1986. Photosynthesis in modulated light: quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**(7), 988-95.
59. Matthijs, H.C.P., H. Balke, U.M. van Hes, B.M.A. Kroon, L.R. Mur, R.A. Binot. 1996. Application of light-emitting diodes in bioreactors: Flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). *Biotechnology and Bioengineering*, **50**(1), 98-107.
60. Kok, B. 1956. Photosynthesis in flashing light. *Biochimica et Biophysica Acta*, **21**(2), 245-258.
61. Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**(3), 294-306.
62. Kruse, O., J. Rupprecht, K.-P. Bader, S. Thomas-Hall, P.M. Schenk, G. Finazzi, B. Hankamer. 2005. Improved Photobiological H₂ Production in Engineered Green Algal Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(40), 34170-34177.
63. Hankamer, B., F. Lehr, J. Rupprecht, J.H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse. 2007. Photosynthetic biomass and H₂ production by green algae: from bioengineering to bioreactor scale-up. *Physiologia Plantarum*, **131**(1), 10-21.
64. Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101**(2), 87-96.
65. Sialve, B., N. Bernet, O. Bernard. 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, **27**(4), 409-416.
66. Gui, M.M., K.T. Lee, S. Bhatia. 2008. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. *Energy*, **33**(11), 1646-1653.
67. Brennan, L., P. Owende. 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**(2), 557-577.
68. Righelato, R., D.V. Spracklen. 2007. Environment. Carbon mitigation by biofuels or by saving and restoring forests? *Science*, **317**(5840), 902.
69. Schenk, P., S. Thomas-Hall, E. Stephens, U. Marx, J. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse, B. Hankamer. 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, **1**(1), 20-43.
70. Weyer, K., D. Bush, A. Darzins, B. Willson. 2010. Theoretical Maximum Algal Oil Production. *BioEnergy Research*, **3**(2), 204-213.
71. Heaton, E.A., F.G. Dohleman, S.P. Long. 2008. Meeting US biofuel goals with less land: the potential of *Miscanthus*. *Global Change Biology*, **14**(9), 2000-2014.
72. Wijffels, R.H., M.J. Barbosa. 2010. An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science*, **329**(5993), 796-799.
73. Ramos, M.J., C.M. Fernandez, A. Casas, L. Rodriguez, A. Perez. 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, **100**(1), 261-8.
74. Schlagermann, P., G. Göttlicher, R. Dillschneider, R. Rosello-Sastre, C. Posten. 2012. Composition of algal oil and its potential as biofuel. *Journal of Combustion*, **2012**.

-
75. Dunstan, G.A., J.K. Volkman, S.M. Barrett, C.D. Garland. 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal of Applied Phycology*, **5**(1), 71-83.
 76. Greenwell, H.C., L.M.L. Laurens, R.J. Shields, R.W. Lovitt, K.J. Flynn. 2009. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of The Royal Society Interface*, **7**(46), 703-726.
 77. Harwood, J.L., I.A. Guschina. 2009. The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, **91**(6), 679-684.
 78. Mata, T.M., A.A. Martins, N.S. Caetano. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**(1), 217-232.
 79. Spoehr, H.A., a.H.W. Milner. 1949. The chemical composition of *Chlorella*; effect of environmental conditions. *Plant Physiology*, **24**, 120-149.
 80. Pruvost, J., G. Van Vooren, B. Le Gouic, A. Couzinet-Mossion, J. Legrand. 2010. Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. *Bioresource Technology*, **102**(1), 150-158.
 81. Rodolfi, L., G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, M.R. Tredici. 2008. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **102**(1), 100-112.
 82. Tedesco, M., E. Duerr. 1989. Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. *Journal of Applied Phycology*, **1**(3), 201-209.
 83. Widjaja, A., C.-C. Chien, Y.-H. Ju. 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **40**(1), 13-20.
 84. Hu, Q., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, A. Darzins. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, **54**(4), 621-639.
 85. Larson, T.R., T.A.V. Rees. 1996. Changes in Cell Composition and Metabolism mediated by Sodium and Nitrogen Availability in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, **32**(3), 388-393.
 86. Roessler, P.G. 1988. Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **267**(2), 521-8.
 87. Ohlrogge, J., J. Browse. 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, **7**(7), 957-70.
 88. Jaworski, J.G., R.C. Clough, S.R. Barnum. 1989. A Cerulenin Insensitive Short Chain 3-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase in *Spinacia oleracea* Leaves. *Plant Physiology*, **90**(1), 41-4.
 89. Riekhof, W.R., B.B. Sears, C. Benning. 2005. Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr. *Eukaryotic Cell*, **4**(2), 242-52.
 90. Borowitzka, M.A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *Progress in industrial microbiology*, **35**, 313-321.
 91. Scott, S.A., M.P. Davey, J.S. Dennis, I. Horst, C.J. Howe, D.J. Lea-Smith, A.G. Smith. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**(3), 277-286.
 92. Amaro, H.M., A. Guedes, F.X. Malcata. 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, **88**(10), 3402-3410.

93. Singh, A., P.S. Nigam, J.D. Murphy. 2011. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. *Bioresource Technology*, **102**(1), 26-34.
94. McGarry, M., C. Tongkasame. 1971. Water reclamation and algae harvesting. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, **43**(5), 824-835.
95. Lee, S., S. Kim, J. Kim, G. Kwon, B. Yoon, H. Oh. 1998. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. *Letters in Applied Microbiology*, **27**(1), 14-18.
96. Liu, J., Y. Zhu, Y. Tao, Y. Zhang, A. Li, T. Li, M. Sang, C. Zhang. 2013. Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease. *Biotechnology for Biofuels*, **6**(1), 98.
97. Levin, G.V., J.R. Clendenning, A. Gibor, F.D. Bogar. 1962. Harvesting of algae by froth flotation. *Applied microbiology*, **10**(2), 169-175.
98. Bare, W.R., N.B. Jones, E.J. Middlebrooks. 1975. Algae removal using dissolved air flotation. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, **47**(1), 153-169.
99. Molina Grima, E., E.H. Belarbi, F.G. Ación Fernández, A. Robles Medina, Y. Chisti. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, **20**(7-8), 491-515.
100. Lazarova, V., P. Rougé, V. Sturny, J. Arcangeli. 2006. Evaluation of economic viability and benefits of urban water reuse and its contribution to sustainable development. *Water Practice & Technology*, **1**(2).
101. Sander, K., G.S. Murthy. 2010. Life cycle analysis of algae biodiesel. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, **15**(7), 704-714.
102. Sheehan, J., V. Camobreco, J. Duffield, M. Graboski, H. Shapouri. 1998. Life cycle inventory of biodiesel and petroleum diesel for use in an urban bus. Final report, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO (US).
103. Kadam, K.L. 2001. Microalgae production from power plant flue gas: Environmental implications on a life cycle basis, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO (US).
104. Soh, L., J. Zimmerman. 2011. Biodiesel production: the potential of algal lipids extracted with supercritical carbon dioxide. *Green Chemistry*, **13**(6), 1422-1429.
105. Brentner, L.B., M.J. Eckelman, J.B. Zimmerman. 2011. Combinatorial Life Cycle Assessment to Inform Process Design of Industrial Production of Algal Biodiesel. *Environmental Science & Technology*, **45**(16), 7060-7067.
106. Gouveia, L., A.C. Oliveira. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **36**(2), 269-274.
107. Fukuda, H., A. Kondo, H. Noda. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **92**(5), 405-416.
108. Liu, B., Z. Zhao. 2007. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **82**(8), 775-780.
109. Gryglewicz, S. 1999. Rapeseed oil methyl esters preparation using heterogeneous catalysts. *Bioresource Technology*, **70**(3), 249-253.
110. Suppes, G.J., M.A. Dasari, E.J. Doskocil, P.J. Mankidy, M.J. Goff. 2004. Transesterification of soybean oil with zeolite and metal catalysts. *Applied Catalysis A: General*, **257**(2), 213-223.
111. Demirbas, A. 2008. Biodiesel - A realistic fuel alternative for diesel engines. *Springer, London*.
112. Amin, S. 2009. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management*, **50**(7), 1834-1840.
113. Campbell, M.N. 2008. Biodiesel: algae as a renewable source for liquid fuel. *Guelph Engineering Journal*, **1**, 2-7.

114. Norsker, N.-H., M.J. Barbosa, M.H. Vermuë, R.H. Wijffels. 2011. Microalgal production—a close look at the economics. *Biotechnology Advances*, **29**(1), 24-27.
115. Benemann, J.R., W.J. Oswald. 1996. Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO₂ to biomass. Final report, California Univ., Berkeley, CA (United States). Dept. of Civil Engineering.
116. Gallagher, B.J. 2011. The economics of producing biodiesel from algae. *Renewable Energy*, **36**(1), 158-162.
117. Rosenberg, J.N., G.A. Oyler, L. Wilkinson, M.J. Betenbaugh. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, **19**(5), 430-6.
118. Polle, J.W., S.-D. Kanakagiri, A. Melis. 2003. tla1, a DNA insertional transformant of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with a truncated light-harvesting chlorophyll antenna size. *Planta*, **217**(1), 49-59.
119. Dillschneider, R., C. Posten. 2013. Closed Bioreactors as Tools for Microalgae Production. In: *Advanced Biofuels and Bioproducts*, (Ed.) J.W. Lee, Springer New York, 629-649.
120. Zijffers, J.-W., M. Janssen, J. Tramper, R. Wijffels. 2008. Design Process of an Area-Efficient Photobioreactor. *Marine Biotechnology*, **10**(4), 404-415.
121. Holland, L., G. Siddall. 1958. Heat-reflecting windows using gold and bismuth oxide films. *British Journal of Applied Physics*, **9**(9), 359.
122. Yatabe, T., T. Nishihara, N. Suzuki. 1987. Optical laminar structure, US Patent No: 4.639.069.
123. Rosenberger, S., G. Olbers, D. Heinz. 2008. Infrared-reflective material comprising interference pigments having higher transmission in the visible region than in the NIR region, US Patent No: 7410685 B2.
124. Cerff, M., M. Morweiser, R. Dillschneider, A. Michel, K. Menzel, C. Posten. 2012. Harvesting fresh water and marine algae by magnetic separation: screening of separation parameters and high gradient magnetic filtration. *Bioresource Technology*, **118**, 289-95.
125. Safarik, I., M. Safarikova. 2009. Magnetic nano- and microparticles in biotechnology. *Chemical Papers*, **63**(5), 497-505.
126. Poelman, E., N. De Pauw, B. Jeurissen. 1997. Potential of electrolytic flocculation for recovery of micro-algae. *Resources, conservation and recycling*, **19**(1), 1-10.
127. Levine, R.B., T. Pinnarat, P.E. Savage. 2010. Biodiesel production from wet algal biomass through in situ lipid hydrolysis and supercritical transesterification. *Energy & Fuels*, **24**(9), 5235-5243.
128. Burton, T., H. Lyons, Y. Lerat, M. Stanley, M.B. Rasmussen. 2009. A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland, Dublin: Sustainable Energy Ireland-SEI.
129. Pulz, O., W. Gross. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65**(6), 635-648.
130. Wijffels, R.H., M.J. Barbosa, M.H.M. Eppink. 2010. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, **4**(3), 287-295.
131. Dickson, A.G., F.J. Millero. 1987. A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, **34**(10), 1733-1743.
132. Yongmanitchai, W., O.P. Ward. 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricorutum* under different culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**(2), 419-425.

-
133. Giordano, M., J. Beardall, J.A. Raven. 2005. CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology*, **56**, 99-131.
 134. Douskova, I., J. Doucha, K. Livansky, J. Machat, P. Novak, D. Umysova, V. Zachleder, M. Vitova. 2009. Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **82**(1), 179-185.
 135. García Camacho, F., A. Contreras Gómez, F.G. Acién Fernández, J. Fernández Sevilla, E. Molina Grima. 1999. Use of concentric-tube airlift photobioreactors for microalgal outdoor mass cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**(3-4), 164-172.
 136. Borkenstein, C.G., J. Knobloch, H. Frühwirth, M. Schagerl. 2011. Cultivation of *Chlorella emersonii* with flue gas derived from a cement plant. *Journal of Applied Phycology*, **23**(1), 131-135.
 137. Powell, E.E., M.L. Mapiour, R.W. Evitts, G.A. Hill. 2009. Growth kinetics of *Chlorella vulgaris* and its use as a cathodic half cell. *Bioresource Technology*, **100**(1), 269-74.
 138. Watts Pirt, M., S.J. Pirt. 1980. The Influence of Carbon Dioxide and Oxygen Partial Pressures on *Chlorella* Growth in Photosynthetic Steady-state Cultures. *Journal of General Microbiology*, **119**(2), 321-326.
 139. Morais, M., J. Costa. 2007. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina sp.* cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnology Letters*, **29**(9), 1349-1352.
 140. Badger, M.R., T.J. Andrews, S.M. Whitney, M. Ludwig, D.C. Yellowlees, W. Leggat, G.D. Price. 1998. The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO₂-concentrating mechanisms in algae. *Canadian Journal of Botany*, **76**(6), 1052-1071.
 141. Raven, J.A., J. Beardall. 2003. Carbon acquisition mechanisms of algae: carbon dioxide diffusion and carbon dioxide concentrating mechanisms. In: *Photosynthesis in Algae*, Springer, 225-244.
 142. Kaplan, A., L. Reinhold. 1999. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Biology*, **50**(1), 539-570.
 143. Raven, J. 1997. Putting the C in phycology. *European Journal of Phycology*, **32**(4), 319-333.
 144. Raven, J. 1997. Inorganic carbon acquisition by marine autotrophs. *Advances in Botanical Research*, **27**, 85-209.
 145. Mitra, M., S.M. Lato, R.A. Ynalvez, Y. Xiao, J.V. Moroney. 2004. Identification of a new chloroplast carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, **135**(1), 173-182.
 146. Moroney, J., S. Bartlett, G. Samuelsson. 2001. Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant, Cell & Environment*, **24**(2), 141-153.
 147. Beardall, J., M. Giordano. 2002. Ecological implications of microalgal and cyanobacterial CO₂ concentrating mechanisms, and their regulation. *Functional Plant Biology*, **29**(3), 335-347.
 148. Kübler, J.E., J.A. Raven. 1994. Consequences of light limitation for carbon acquisition in three rhodophytes. *Marine Ecology Progress Series*, **110**, 203-209.
 149. Kübler, J.E., J.A. Raven. 1995. The Interaction between Inorganic Carbon Acquisition and Light Supply in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, **31**(3), 369-375.

-
150. Bitaubé Pérez, E., I. Caro Pina, L. Pérez Rodríguez. 2008. Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, **40**(3), 520-525.
 151. Hogetsu, D., S. Miyachi. 1977. Effects of CO₂ concentration during growth on subsequent photosynthetic CO₂ fixation in *Chlorella*. *Plant and Cell Physiology*, **18**(2), 347-352.
 152. Fan, L.H., Y.T. Zhang, L.H. Cheng, L. Zhang, D.S. Tang, H.L. Chen. 2007. Optimization of Carbon Dioxide Fixation by *Chlorella vulgaris* Cultivated in a Membrane Photobioreactor. *Chemical engineering & technology*, **30**(8), 1094-1099.
 153. García Sánchez, J.L., M. Berenguel, F. Rodríguez, J.M. Fernández Sevilla, C. Brindley Alias, F.G. Acién Fernández. 2003. Minimization of carbon losses in pilot-scale outdoor photobioreactors by model-based predictive control. *Biotechnology and Bioengineering*, **84**(5), 533-543.
 154. Zhang, K., N. Kurano, S. Miyachi. 2002. Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **25**(2), 97-101.
 155. Berenguel, M., F. Rodríguez, F.G. Acién, J.L. García. 2004. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. *Journal of Process Control*, **14**(4), 377-387.
 156. Mailleret, L., J.L. Gouze, O. Bernard. 2005. Nonlinear control for algae growth models in the chemostat. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **27**(5), 319-27.
 157. Hu, D., H. Liu, C. Yang, E. Hu. 2008. The design and optimization for light-algae bioreactor controller based on Artificial Neural Network-Model Predictive Control. *Acta Astronautica*, **63**(7-10), 1067-1075.
 158. Camacho, E.F., C. Bordons. 2004. Model predictive control. *Springer London*.
 159. Lewin, J.C. 1958. The taxonomic position of *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of General Microbiology*, **18**(2), 427-432.
 160. Dyerberg, J. 1986. Linolenate-derived Polyunsaturated Fatty Acids and Prevention of Atherosclerosis. *Nutrition reviews*, **44**(4), 125-134.
 161. Mortensen, J., E. Schmidt, A. Nielsen, J. Dyerberg. 1983. The effect of N-6 and N-3 polyunsaturated fatty acids on hemostasis, blood lipids and blood pressure. *Thrombosis and haemostasis*, **50**(2), 543-546.
 162. Robinson, D.R., J.D. Prickett, G.T. Makoul, A.D. Steinberg, R.B. Colvin. 1986. Dietary fish oil reduces progression of established renal disease in (NZB× NZW) F1 mice and delays renal disease in BXSB and MRL/1 strains. *Arthritis & Rheumatism*, **29**(4), 539-546.
 163. Lands, W.E. 1986. The Fate of Polyunsaturated Fatty Acids. In: *Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods*, (Eds.) A.P. Simopoulos, R.R. Kifer, and R.E. Martin, Academic Press. Orlando, 33-48.
 164. Kosakowska, A., J. Lewandowska, J. Stoń, K. Burkiewicz. 2004. Qualitative and quantitative composition of pigments in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) stressed by iron. *Biometals*, **17**(1), 45-52.
 165. Boussiba, S., A. Vonshak, Z. Cohen, Y. Avissar, A. Richmond. 1987. Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass*, **12**(1), 37-47.
 166. Brown Js. 1987. Functional Organization of Chlorophyll a and Carotenoids in the Alga *Nannochloropsis salina*. *Plant Physiology*, **83**(2), 434-437.
 167. Seyfabadi, J., Z. Ramezanzpour, Z. Amini Khoeyi. 2011. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of Applied Phycology*, **23**(4), 721-726.

-
168. Mann, J.E., J. Myers. 1968. On pigments, growth and photosynthesis of *Phaeodactylum tricornerutum*. *Journal of Phycology*, **4**(4), 349-355.
 169. Ritchie, R.J. 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis Research*, **89**(1), 27-41.
 170. Lichtenthaler, H.K., C. Buschmann. 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, **F4.3**, 1-8.
 171. Hedge, J.E., B.T. Hofreiter. 1962. Carbohydrate Chemistry. In: *Carbohydrate Chemistry*, (Eds.) W.R. L. and M.J. N., Academic Press. New York, 1-19.
 172. Zulkowsky, K. 1880. Verhalten der Stärke gegen Glycerin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **13**(2), 1395-1398.
 173. Meesters, P.A.E.P., G.N.M. Huijberts, G. Eggink. 1996. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **45**(5), 575-579.
 174. Gessner, M.O., P.T. Neumann. 2005. Total lipids. In: *Methods to Study Litter Decomposition*, (Eds.) M.A.S. Garca, F. Bärlocher, and M.O. Gessner, Springer, 91-95.
 175. Folch, J., M. Lees, S.G.H. Sloane. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**(1), 497-509.
 176. Chen, W., C. Zhang, L. Song, M. Sommerfeld, Q. Hu. 2009. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, **77**(1), 41-47.
 177. Lewis, W.K., W.G. Whitman. 1924. Principles of Gas Absorption. *Industrial & Engineering Chemistry*, **16**(12), 1215-1220.
 178. Fylstra, D., L. Lasdon, J. Watson, A. Waren. 1998. Design and Use of the Microsoft Excel Solver. *Interfaces*, **28**(5), 29-55.
 179. Lagarias, J.C., J.A. Reeds, M.H. Wright, P.E. Wright. 1998. Convergence Properties of the Nelder--Mead Simplex Method in Low Dimensions. *SIAM Journal on Optimization*, **9**(1), 112-147.
 180. Williams, P.J.I.B., L.M.L. Laurens. 2010. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, **3**(5), 554-590.
 181. Leitão, J.M., L. B, B. N, W. C, M. WEG, S. HC. 1995. Osmotic-stress-induced synthesis and degradation of inorganic polyphosphates in the alga *Phaeodactylum tricornerutum*. *Marine Ecology Progress Series*, **121**, 279-288.
 182. Ross, O.N., R.J. Geider. 2009. New cell-based model of photosynthesis and photo-acclimation: accumulation and mobilisation of energy reserves in phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, **383**, 53-71.
 183. Droop, M.R. 1968. Vitamin B12 and Marine Ecology. IV. The Kinetics of Uptake, Growth and Inhibition in *Monochrysis lutheri*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **48**(3), 689-733.
 184. Masojídek, J., M. Koblížek, G. Torzillo. 2007. Photosynthesis in Microalgae. In: *Handbook of Microalgal Culture*, (Ed.) S. Richmond, Blackwell Publishing Ltd, 20-39.
 185. Fleck-Schneider, P., F. Lehr, C. Posten. 2007. Modelling of growth and product formation of *Porphyridium purpureum*. *Journal of Biotechnology*, **132**(2), 134-41.
 186. Brown, M.R. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **145**(1), 79-99.

-
187. Raven, J.A. 1982. The Energetics of Freshwater Algae; Energy Requirements for Biosynthesis and Volume Regulation. *New Phytologist*, **92**(1), 1-20.
 188. Geider, R.J., B.A. Osbonie, J.A. Raven. 1986. Growth, Photosynthesis and Maintenance Metabolic Cost in the Diatom *Phaeodactylum tricorutum* at very low Light Levels. *Journal of Phycology*, **22**(1), 39-48.
 189. Dantzig, G.B., A. Orden, P. Wolfe. 1955. The generalized simplex method for minimizing a linear form under linear inequality restraints. *Pacific Journal of Mathematics*, **5**(2), 183-195.
 190. Knothe, G., A.C. Matheaus, T.W. Ryan Iii. 2003. Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester. *Fuel*, **82**(8), 971-975.
 191. Jang, E.S., M.Y. Jung, D.B. Min. 2005. Hydrogenation for Low Trans and High Conjugated Fatty Acids. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **4**(1), 22-30.
 192. Dijkstra, A.J. 2006. Revisiting the formation of trans isomers during partial hydrogenation of triacylglycerol oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **108**(3), 249-264.
 193. Mirón, A.S., M.C.C. García, A.C. Gómez, F.G.a. Camacho, E.M. Grima, Y. Chisti. 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricorutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, **16**(3), 287-297.
 194. Zaslavskaja, L.A., J.C. Lippmeier, C. Shih, D. Ehrhardt, A.R. Grossman, K.E. Apt. 2001. Trophic Conversion of an Obligate Photoautotrophic Organism Through Metabolic Engineering. *Science*, **292**(5524), 2073-2075.
 195. Roessler, P.G. 1990. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *Journal of Phycology*, **26**(3), 393-399.
 196. Griffiths, M., S.L. Harrison. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, **21**(5), 493-507.
 197. Huerlimann, R., R. de Nys, K. Heimann. 2010. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnology and Bioengineering*, **107**(2), 245-57.
 198. Goldman, J.C. 1979. Outdoor algal mass cultures—II. Photosynthetic yield limitations. *Water Research*, **13**(2), 119-136.
 199. Milner, H.W. 1953. The chemical composition of algae. In: *Algal culture from laboratory to pilot plant*, (Ed.) J.S. Burlew, Vol. 600, Carnegie Institution of Washington Publication. Washington D. C., 285-302.
 200. Terry, K.L., J. Hirata, E.A. Laws. 1985. Light-, nitrogen-, and phosphorus-limited growth of *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin strain TFX-1: Chemical composition, carbon partitioning, and the diel periodicity of physiological processes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **86**(1), 85-100.
 201. Wilhelm, C., A. Wild. 1984. The Variability of the Photosynthetic Unit in *Chlorella* II. The Effect of Light Intensity and Cell Development on Photosynthesis, P-700 and Cytochrome f in Homocontinuous and Synchronous Cultures of *Chlorella*. *Journal of Plant Physiology*, **115**(2), 125-135.
 202. Grobbelaar, J. 2010. Microalgal biomass production: challenges and realities. *Photosynthesis Research*, **106**(1-2), 135-144.
 203. Geider, R.J., J.L. Roche. 2002. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*, **37**(01), 1-17.

-
204. Fernandez, F.G., F.G. Camacho, J.A. Perez, J.M. Sevilla, E.M. Grima. 1997. A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnology and Bioengineering*, **55**(5), 701-14.
 205. Huisman, J., H.P. Matthijs, P. Visser, H. Balke, C.M. Sigon, J. Passarge, F. Weissing, L. Mur. 2002. Principles of the light-limited chemostat: theory and ecological applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**(1-4), 117-133.
 206. Jacobi, A. 2012. Optimierung der Lichtverteilung in Photobioreaktoren - Potentiale „Antennen-reduzierter“ Mikroalgen-Mutanten als biologischer Ansatz und transparenter Schwammstrukturen als technisches Konzept. *Verlag Dr. Hut, München*.
 207. Doucha, J., K. Lívanský. 2009. Outdoor open thin-layer microalgal photobioreactor: potential productivity. *Journal of Applied Phycology*, **21**(1), 111-117.
 208. Torzillo, G., A. Sacchi, R. Materassi. 1991. Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Bioresource Technology*, **38**(2-3), 95-100.
 209. Borowitzka, M. 1992. Algal biotechnology products and processes — matching science and economics. *Journal of Applied Phycology*, **4**(3), 267-279.
 210. Chen, C.-Y., K.-L. Yeh, R. Aisyah, D.-J. Lee, J.-S. Chang. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, **102**(1), 71-81.
 211. Fernández, F.G.A., F.G. Camacho, J.A.S. Pérez, J.M.F. Sevilla, E.M. Grima. 1998. Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: Effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, **58**(6), 605-616.
 212. Melis, A., J. Neidhardt, J. Benemann. 1998. *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells. *Journal of Applied Phycology*, **10**(6), 515-525.
 213. Sobczuk, T.M., F.G. Camacho, E.M. Grima, Y. Chisti. 2006. Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricorutum* and *Porphyridium cruentum*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **28**(4), 243-250.
 214. Grima, E.M., F.G. Camacho, J.A.S. Pérez, J.M.F. Sevilla, F.G.A. Fernández, A.C. Gómez. 1994. A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **61**(2), 167-173.
 215. Mairet, F., O. Bernard, P. Masci, T. Lacour, A. Sciandra. 2011. Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis aff. galbana* under nitrogen limitation. *Bioresource Technology*, **102**(1), 142-149.
 216. Packer, A., Y. Li, T. Andersen, Q. Hu, Y. Kuang, M. Sommerfeld. 2010. Growth and neutral lipid synthesis in green microalgae: A mathematical model. *Bioresource Technology*, **102**, 111-117.
 217. Lemesle, V., L. Mailleret. 2008. A mechanistic investigation of the algae growth "Droop" model. *Acta Biotheoretica*, **56**(1-2), 87-102.
 218. Bukhov, N.G. 2004. Dynamic Light Regulation of Photosynthesis (A Review). *Russian Journal of Plant Physiology*, **51**(6), 742-753.
 219. Kalashnikov, M., W. Choi, C.-C. Yu, Y. Sung, R.R. Dasari, K. Badizadegan, M.S. Feld. 2009. Assessing light scattering of intracellular organelles in single intact living cells. *Optics Express*, **17**(22), 19674-19681.
 220. Jørgensen, E.G. 1968. The Adaptation of Plankton Algae. *Physiologia Plantarum*, **21**(2), 423-427.

-
221. Alric, J. 2010. Cyclic electron flow around photosystem I in unicellular green algae. *Photosynthesis Research*, **106**(1-2), 47-56.
222. Lacour, T., A. Sciandra, A. Talec, P. Mayzaud, O. Bernard. 2012. Neutral Lipid and Carbohydrate Productivities as a Response to Nitrogen Status in *Isochrysis Sp.* (T-iso; Haptophyceae): Starvation versus Limitation. *Journal of Phycology*, **48**(3), 647-656.
223. Szabo, I., E. Bergantino, G.M. Giacometti. 2005. Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO Reports*, **6**(7), 629-634.
224. Mimuro, M., T. Katoh. 1991. Carotenoids in photosynthesis: absorption, transfer and dissipation of light energy. *Pure and Applied Chemistry*, **63**(1), 123-139.
225. Mussnug, J.H., S. Thomas-Hall, J. Rupprecht, A. Foo, V. Klassen, A. McDowall, P.M. Schenk, O. Kruse, B. Hankamer. 2007. Engineering photosynthetic light capture: impacts on improved solar energy to biomass conversion. *Plant Biotechnology Journal*, **5**(6), 802-814.
226. Babcock, R., J. Malda, J. Radway. 2002. Hydrodynamics and mass transfer in a tubular airlift photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, **14**(3), 169-184.
227. Chi, Z., Y. Zheng, A. Jiang, S. Chen. 2011. Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **165**(2), 442-53.
228. Clarens, A.F., E.P. Resurreccion, M.A. White, L.M. Colosi. 2010. Environmental Life Cycle Comparison of Algae to Other Bioenergy Feedstocks. *Environmental Science & Technology*, **44**(5), 1813-1819.
229. Lee, J.S., D.K. Kim, J.P. Lee, S.C. Park, J.H. Koh, H.S. Cho, S.W. Kim. 2002. Effects of SO₂ and NO on growth of *Chlorella sp.* KR-1. *Bioresource Technology*, **82**(1), 1-4.
230. Brown, L.M. 1996. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. *Energy Conversion and Management*, **37**(6-8), 1363-1367.
231. Pokoo-Aikins, G., A. Nadim, M. El-Halwagi, V. Mahalec. 2010. Design and analysis of biodiesel production from algae grown through carbon sequestration. *Clean Technologies and Environmental Policy*, **12**(3), 239-254.
232. Feron, P., H.M., C. Hendriks, A. 2005. Les différents procédés de capture du CO₂ et leurs coûts. *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP*, **60**(3), 451-459.
233. Ratledge, C., Z. Cohen. 2008. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technology*, **20**(7), 155-160.
234. Benemann, J.R., D.M. Tillett, J.C. Weissman. 1987. Microalgae biotechnology. *Trends in Biotechnology*, **5**(2), 47-53.
235. Mutiyaporn, P., L. Ratanaporn. 2012. Integrated Cultivation Technique for Microbial Lipid Production by Photosynthetic Microalgae and Locally Oleaginous Yeast. *World Academy of Science, Engineering and Technology* **64**.
236. Yocum, C.S., L.R. Blinks. 1958. Light-Induced Efficiency and Pigment Alterations in Red Algae. *The Journal of General Physiology*, **41**(6), 1113-1117.
237. Wallen, D.G., G.H. Geen. 1971. Light quality in relation to growth, photosynthetic rates and carbon metabolism in two species of marine plankton algae. *Marine Biology*, **10**(1), 34-43.
238. Horton, P., A.V. Ruban, R.G. Walters. 1994. Regulation of Light Harvesting in Green Plants (Indication by Nonphotochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence). *Plant Physiology*, **106**(2), 415-420.
239. López-Figueroa, F. 1991. Red, green and blue light photoreceptors controlling chlorophyll a, biliprotein and total protein synthesis in the red alga *Chondrus crispus*. *British Phycological Journal*, **26**(4), 383-393.

-
240. Senger, H., B. Bauer. 1987. The Influence of Light Quality on Adaptation and Function of the Photosynthetic Apparatus. *Photochemistry and Photobiology*, **45**, 939-946.
 241. Beardall, J., A. Johnston, J. Raven. 1998. Environmental regulation of CO₂-concentrating mechanisms in microalgae. *Canadian Journal of Botany*, **76**(6), 1010-1017.
 242. Degen, J., A. Uebele, A. Retze, U. Schmid-Staiger, W. Trösch. 2001. A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. *Journal of Biotechnology*, **92**(2), 89-94.
 243. Doucha, J., F. Straka, K. Lívanský. 2005. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae *Chlorella sp.* in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, **17**(5), 403-412.
 244. Galloway, R.A., H.G. Gauch, C.J. Soeder. 1964. Effects of inhibitory levels of CO₂ on *Chlorella*. *Plant Physiology*, **39**(R8).
 245. Bhola, V., R. Desikan, S.K. Santosh, K. Subburamu, E. Sanniyasi, F. Bux. 2011. Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **111**(3), 377-382.
 246. Price, G.D., M.R. Badger, F.J. Woodger, B.M. Long. 2008. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, C_i transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *Journal of experimental botany*, **59**(7), 1441-1461.
 247. Chiu, S.Y., C.Y. Kao, M.T. Tsai, S.C. Ong, C.H. Chen, C.S. Lin. 2009. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology*, **100**(2), 833-838.
 248. Zittelli, C.G., F. Lavista, A. Bastianini, L. Rodolfi, M. Vincenzini, M.R. Tredici. 1999. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis sp.* cultures in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, **70**(1-3), 299-312.
 249. Buehner, M.R., P.M. Young, B. Willson, D. Rausen, R. Schoonover, G. Babbitt, S. Bunch. 2009. Microalgae growth modeling and control for a vertical flat panel photobioreactor. *Proceedings of the American Control Conference*, 2301-2306.
 250. Goldman, J.C., P.G. Brewer. 1980. Effect of Nitrogen Source and Growth Rate on Phytoplankton-Mediated Changes in Alkalinity. *Limnology and Oceanography*, **25**(2), 352-357.

Anhang

A 1 Nährmedien

Tabelle A1-1: Zusammensetzung der Standardnährmedien.

Organismus	<i>P. tricornutum</i>	<i>N. salina</i>	<i>C. vulgaris</i>
Salzkonzentration [g/l]			
NaCl	27,0	27,0	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,6	0,6	0,6
KCl	0,6	0,6	0,6
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,4	0,4	0,4
NaNO ₃	1,0	1,0	1,0
K ₂ HPO ₄	0,15	0,15	0,15
Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O	0,03	-	-
Spurenelementlösung		10 ml/l	

Tabelle A 1-2: Zusammensetzung der Spurenelementlösung.

Komponente	Konzentration [mg/l]
Na ₂ EDTA	3000
H ₃ BO ₃	600
FeSO ₄ ·7H ₂ O	200
MnCl ₂	140
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	33
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,7
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,2

A 2 Kalibrierungen

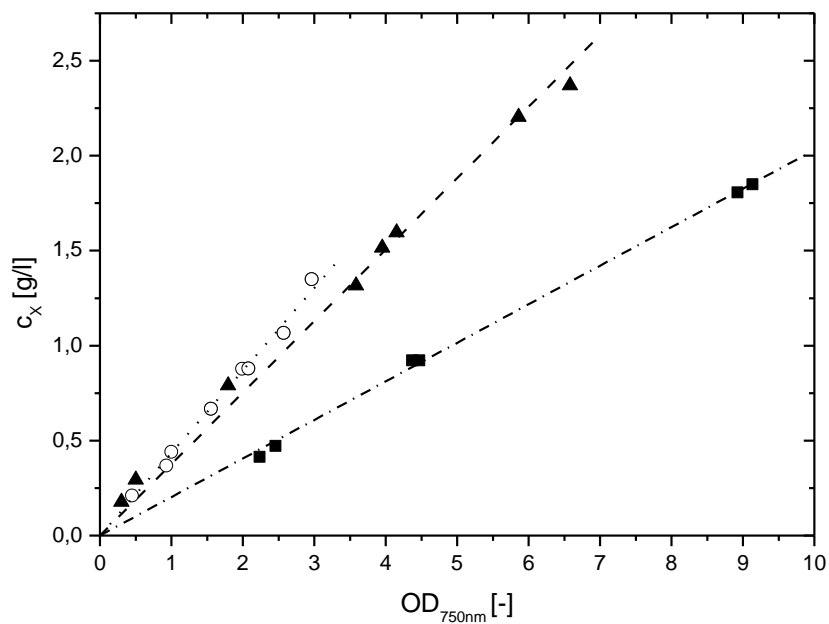


Abb. A2.1: Lineare Korrelation zwischen optischer Dichte bei 750 nm OD_{750nm} und Biotrockenmassekonzentration c_x [g/l] für verschiedene Organismen. ■ *C. vulgaris* (SAG 211-12), lineare Korrelation mit Steigung $b = 0,203$ g/l, $R^2=0,9981$; ▲ *P. tricornutum* (SAG 1090-1a), $b = 0,376$ g/l, $R^2=0,9868$; ○ *P. tricornutum* (SAG 1090-1b), $b = 0,376$ g/l, $R^2=0,9903$.

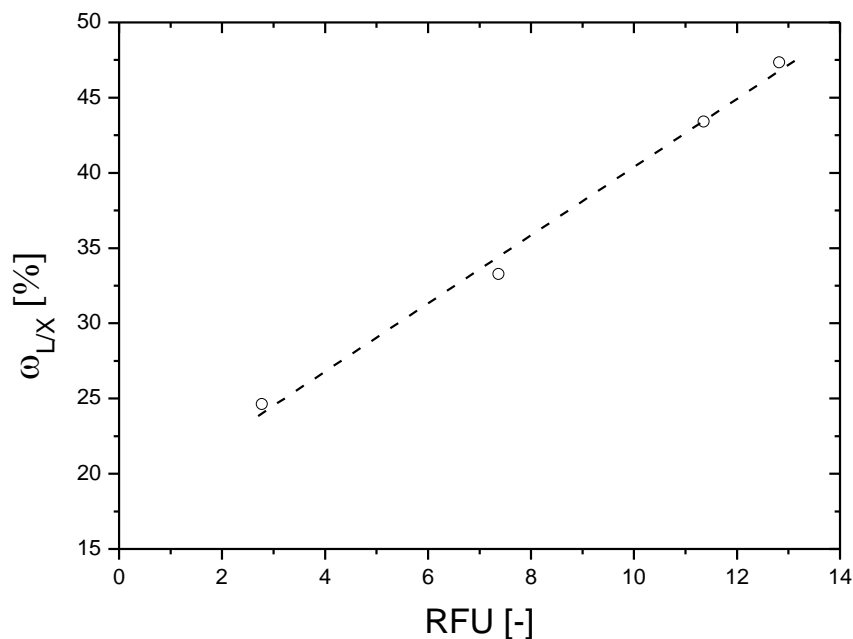


Abb. A2.2: Lineare Regression zur Kalibrierung der Nilrot-Fluoreszenzmessung. ω_{LX} [%] bezeichnet den spezifischen Lipidgehalt von Biomasseproben und RFU [-] die relativen Fluoreszenzeinheiten, normiert auf die OD_{750nm} . $R^2=0,994$.

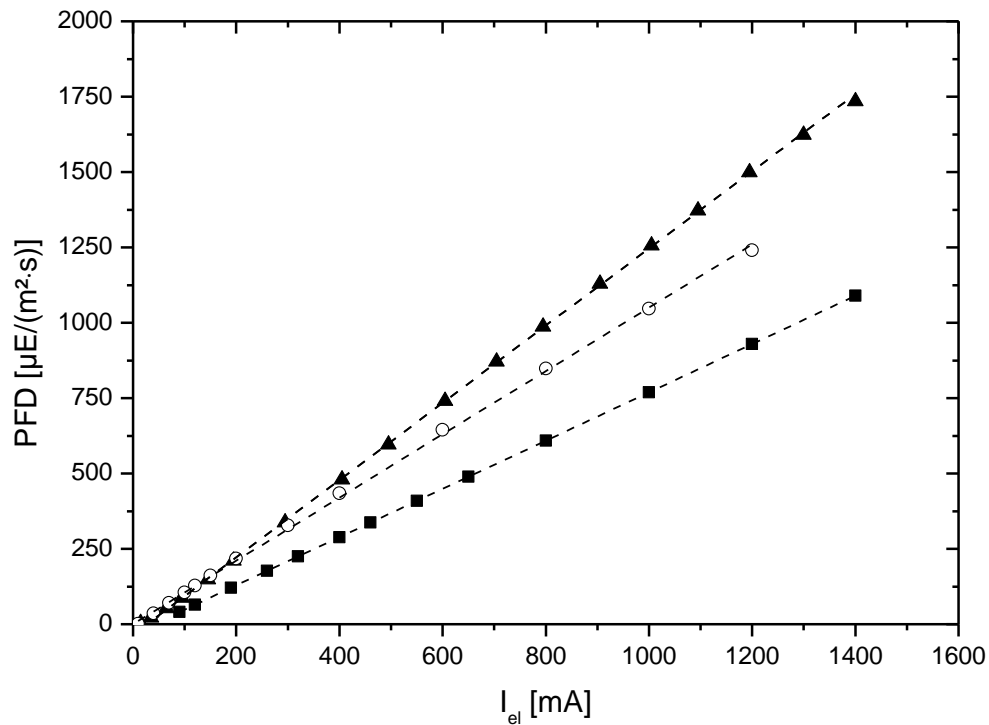


Abb. A2.3: Lichtkalibrierung im Modell-Photobioreaktor. --■--: *P. tricornutum*; --▲--: *N. salina*; --○--: *C. vulgaris*. PFD [$\mu E/(m^2 \cdot s)$]: Photonenflussdichte im Kulturmedium; I_{el} [mA]: Stromstärke.

Tabelle A2-1: Lichtkalibrierung des Modell-Photobioreaktors. OD_{750nm} bezeichnet die optische Dichte bei 750nm bei der sich die Abschattung der Algen und die Lichtfokussierung aufgrund der zylindrischen Geometrie gerade kompensieren. Dadurch wird eine homogene Lichtverteilung im Reaktor erreicht.

Organismus	Kalibriergerade	OD_{750nm}
<i>P. tricornutum</i>	$PFD = 0,801 \frac{\mu E}{m^2 \cdot s \cdot mA} \cdot I - 31,8 \frac{\mu E}{m^2 \cdot s}$	0,69
<i>N. salina</i>	$PFD = 1,281 \frac{\mu E}{m^2 \cdot s \cdot mA} \cdot I - 34,2 \frac{\mu E}{m^2 \cdot s}$	0,62
<i>C. vulgaris</i>	$PFD = 1,050 \frac{\mu E}{m^2 \cdot s \cdot mA} \cdot I$	0,74

PFD [$\mu E/(m^2 \cdot s)$]: Photonenflussdichte; I [mA]: Stromstärke

A 3 Experimentelle Ergebnisse

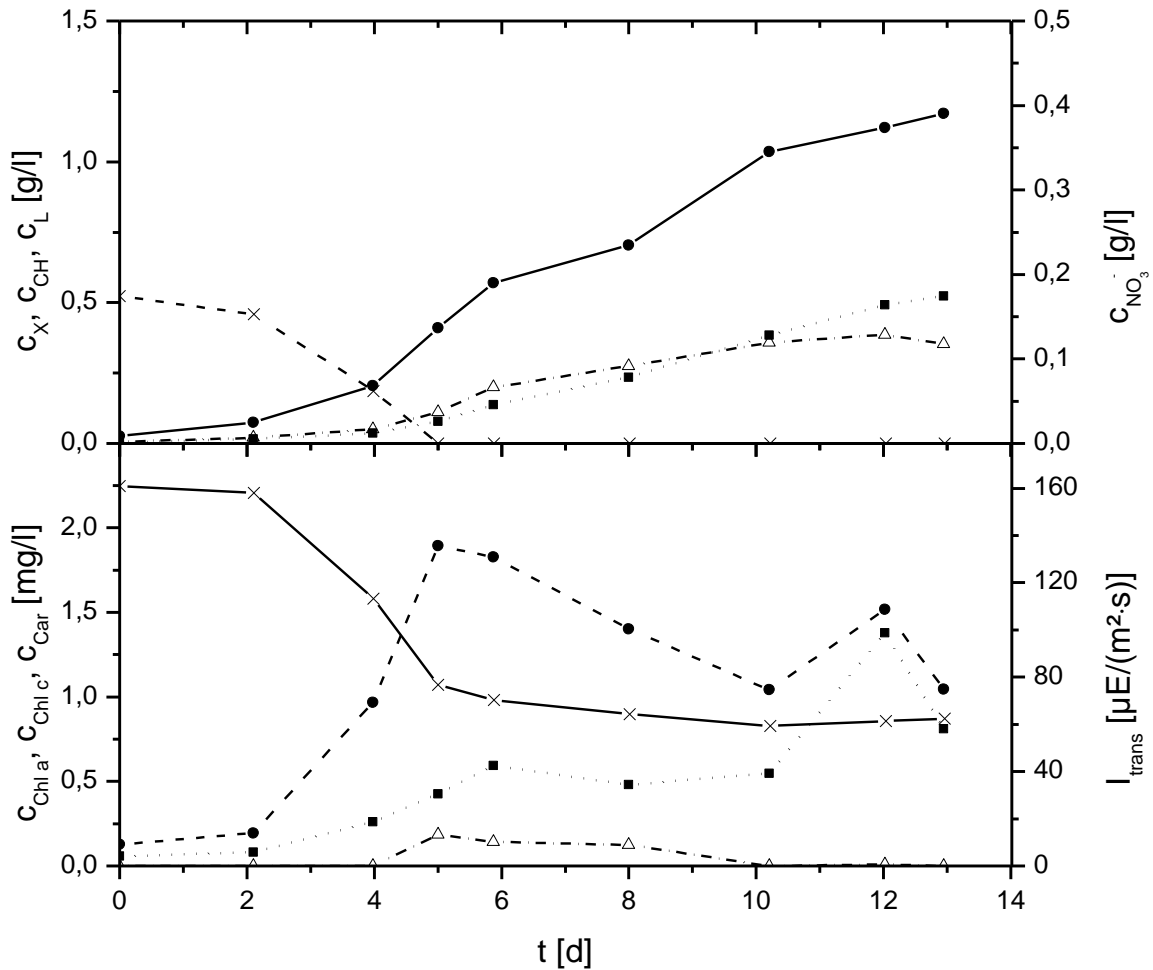


Abb. A3.1: Satzkultivierung von *P. tricornutum* mit 0,24 g/l NaNO_3 -Startkonzentration. Oben: -●- Biomassekonzentration c_X ; -△- Kohlenhydratkonzentration c_{CH} ; ··■·· Lipidkonzentration c_L ; --×-- Nitratkonzentration $c_{\text{NO}_3^-}$. Unten: --●-- Chlorophyll a-Konzentration $c_{\text{Chl a}}$; ··△·· Chlorophyll c-Konzentration $c_{\text{Chl c}}$; -■- Karotinoidkonzentration c_{Car} ; -×- PFD des transmittierten Lichts I_{trans} .

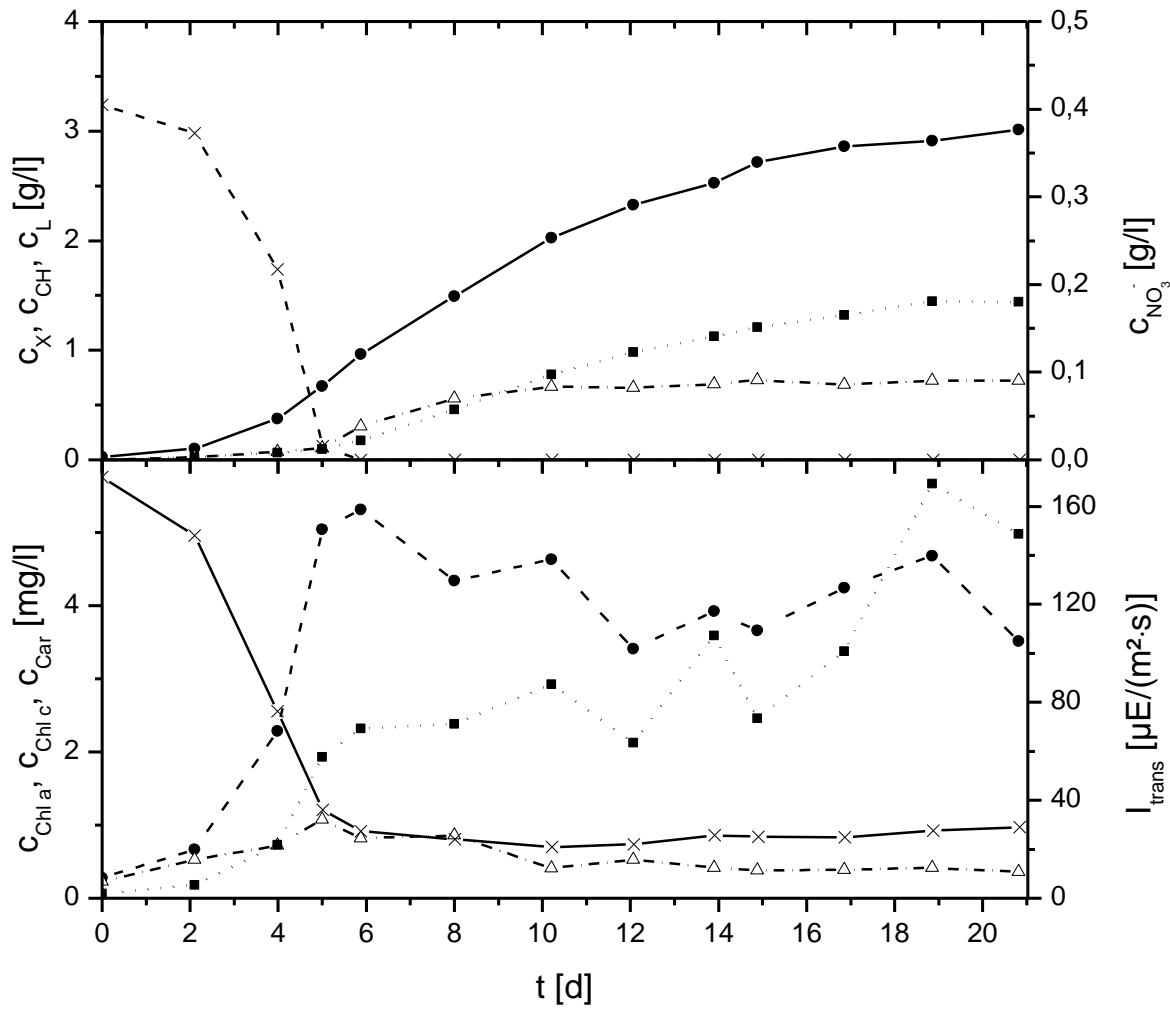


Abb. A3.2: Satzkultivierung von *P. tricornutum* mit 0,56 g/l NaNO_3 -Startkonzentration. Oben: \bullet - Biomassekonzentration c_X ; Δ - Kohlenhydratkonzentration c_{CH} ; \blacksquare - Lipidkonzentration c_L ; \times - Nitratkonzentration $c_{\text{NO}_3^-}$. Unten: \bullet - Chlorophyll a-Konzentration $c_{\text{Chl a}}$; Δ - Chlorophyll c-Konzentration $c_{\text{Chl c}}$; \blacksquare - Karotinoidkonzentration c_{Car} ; \times - PFD des transmittierten Lichts I_{trans} .

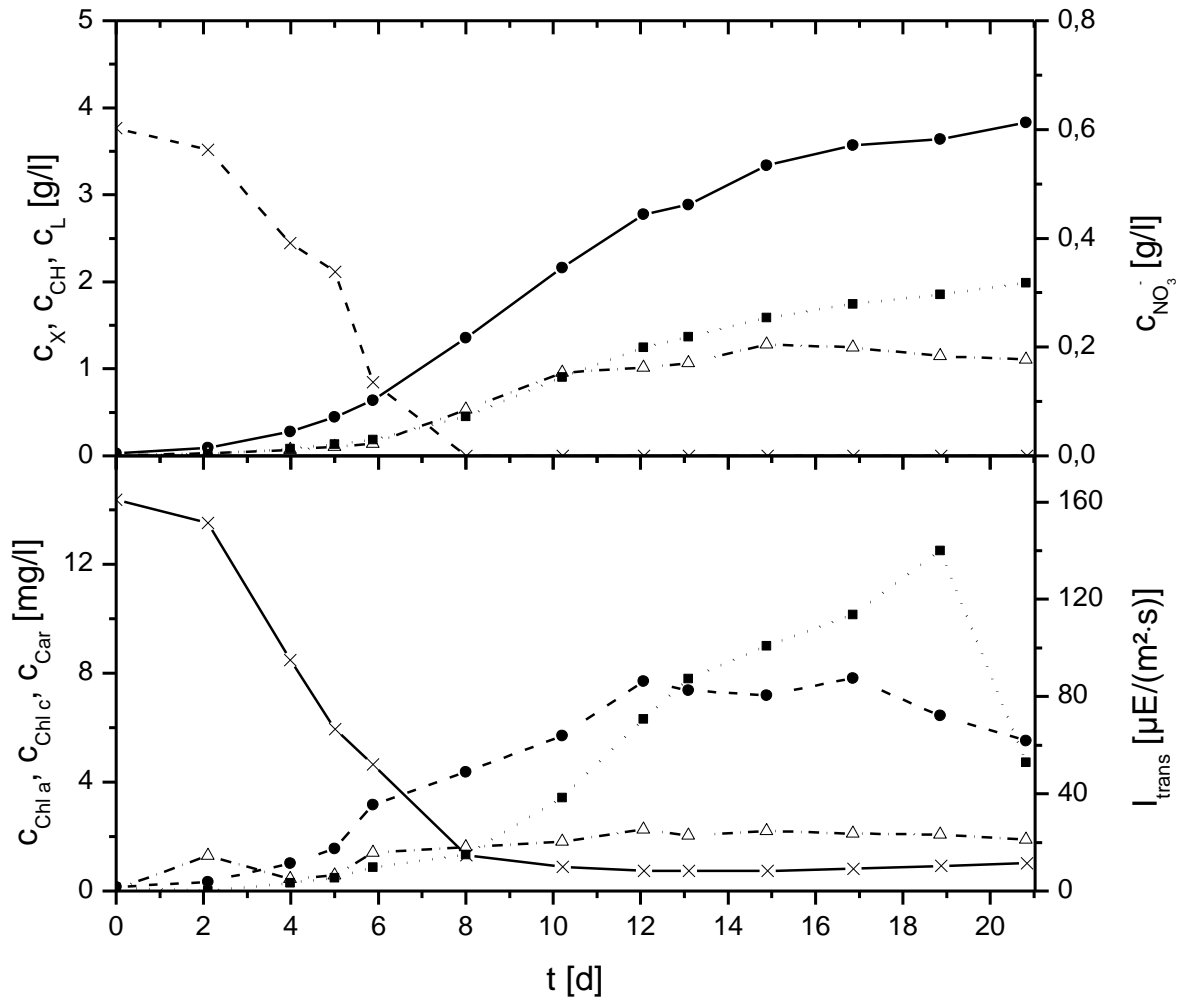


Abb. A3.3: Satzkultivierung von *P. tricornutum* mit 0,83 g/l $NaNO_3$ -Startkonzentration. Oben: -●- Biomassekonzentration c_X ; -△- Kohlenhydratkonzentration c_{CH} ; ··■·· Lipidkonzentration c_L ; --×-- Nitratkonzentration $c_{NO_3^-}$. Unten: --●-- Chlorophyll a-Konzentration $c_{Chl a}$; ··△·· Chlorophyll c-Konzentration $c_{Chl c}$; -■- Karotinoidkonzentration c_{Car} ; -×- PFD des transmittierten Lichts I_{trans} .

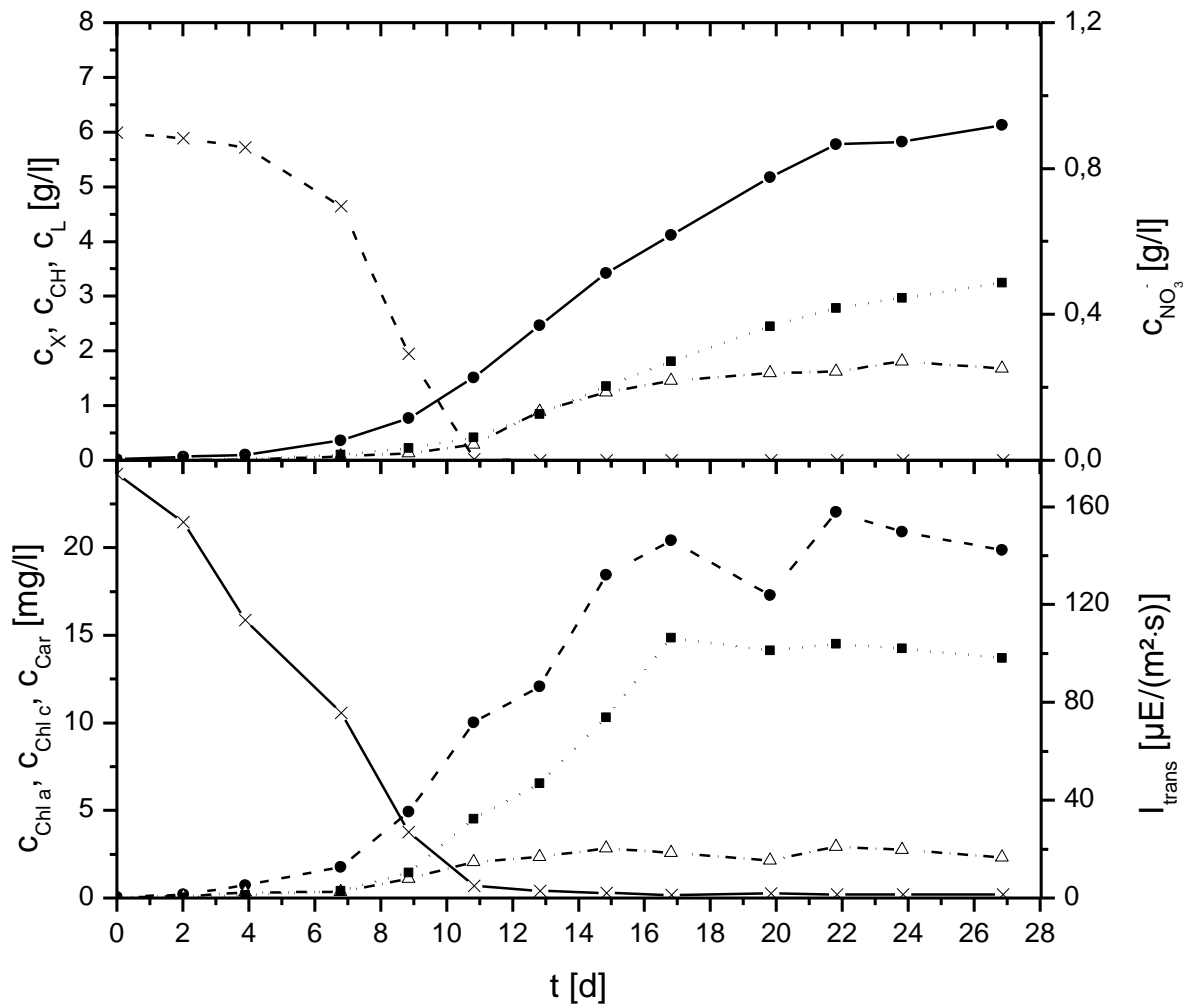


Abb. A3.4: Satzkultivierung von *P. tricornutum* mit 1,23 g/l NaNO_3 -Startkonzentration. Oben: -●- Biomassekonzentration c_X ; -△- Kohlenhydratkonzentration c_{CH} ; ··■·· Lipidkonzentration c_L ; --x-- Nitratkonzentration $c_{\text{NO}_3^-}$. Unten: --●-- Chlorophyll a-Konzentration $c_{\text{Chl a}}$; ··△·· Chlorophyll c-Konzentration $c_{\text{Chl c}}$; -■- Karotinoidkonzentration c_{Car} ; -x- PFD des transmittierten Lichts I_{trans} .

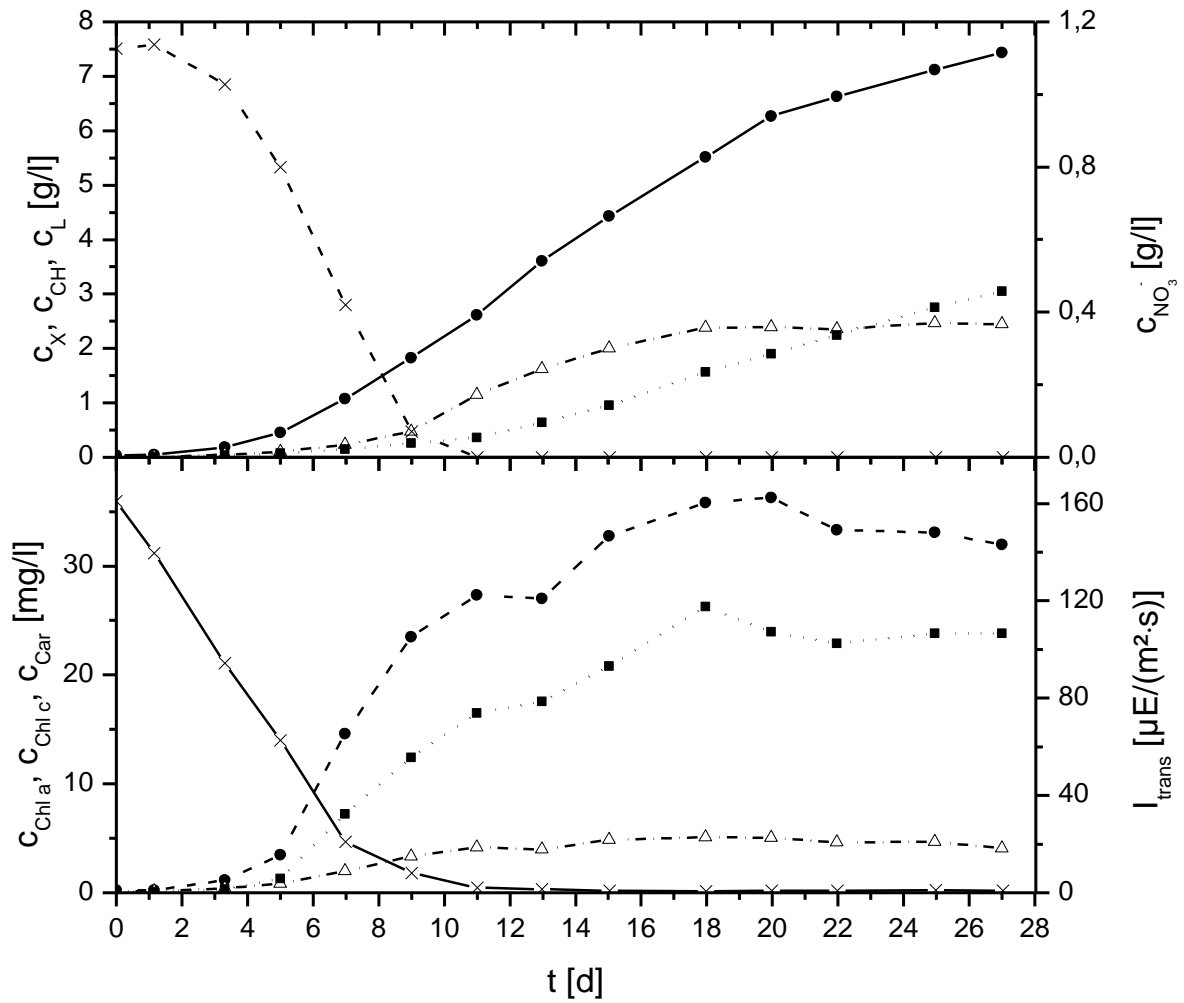


Abb. A3.5: Satzkultivierung von *P. tricornutum* mit 1,56 g/l $NaNO_3$ -Startkonzentration. Oben: -●- Biomassekonzentration c_X ; -△- Kohlenhydratkonzentration c_{CH} ; ··■·· Lipidkonzentration c_L ; --×-- Nitratkonzentration $c_{NO_3^-}$. Unten: --●-- Chlorophyll a-Konzentration $c_{Chl a}$; ··△·· Chlorophyll c-Konzentration $c_{Chl c}$; -■- Karotinoidkonzentration c_{Car} ; -×- PFD des transmittierten Lichts I_{trans} .

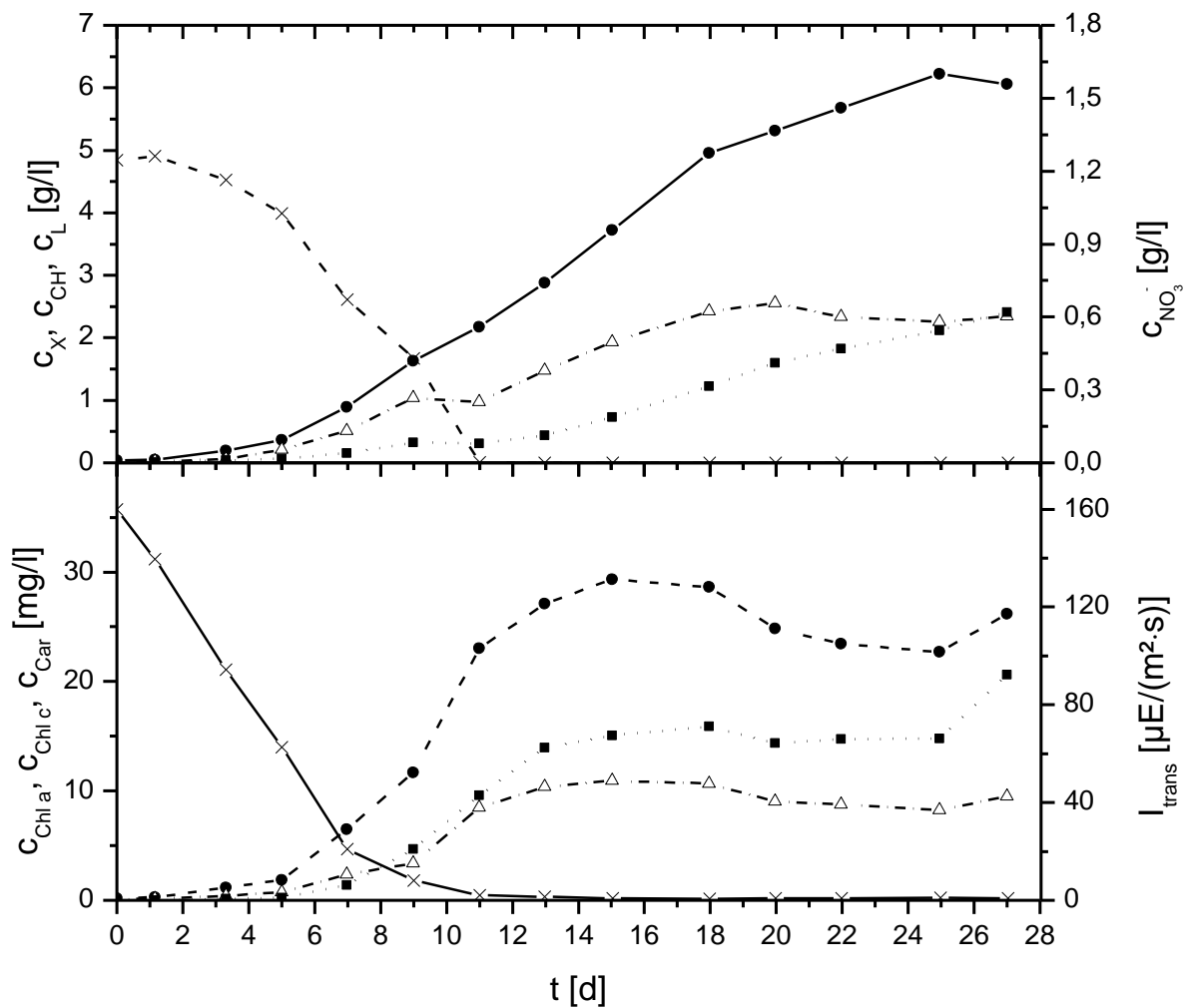


Abb. A3.6: Satzkultivierung von *P. tricornutum* mit 1,72 g/l $NaNO_3$ -Startkonzentration. Oben: -●- Biomassekonzentration c_X ; -△- Kohlenhydratkonzentration c_{CH} ; ··■·· Lipidkonzentration c_L ; --×-- Nitratkonzentration $c_{NO_3^-}$. Unten: --●-- Chlorophyll a-Konzentration $c_{Chl a}$; ··△·· Chlorophyll c-Konzentration $c_{Chl c}$; -■- Karotinoidkonzentration c_{Car} ; -×- PFD des transmittierten Lichts I_{trans} .

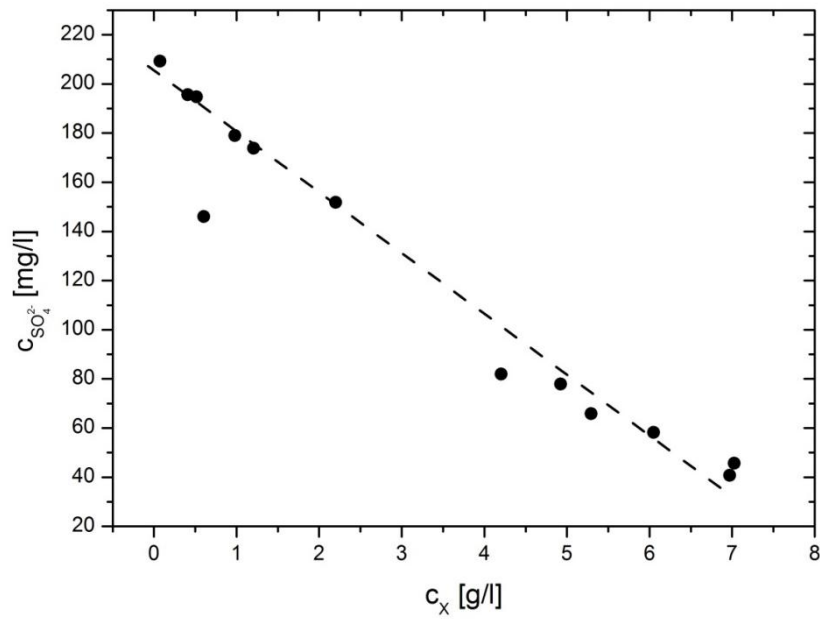


Abb. A3.7: Sulfatverbrauch bei der Kultivierung von *C. vulgaris* im Rührkessel-Photobioreaktor.

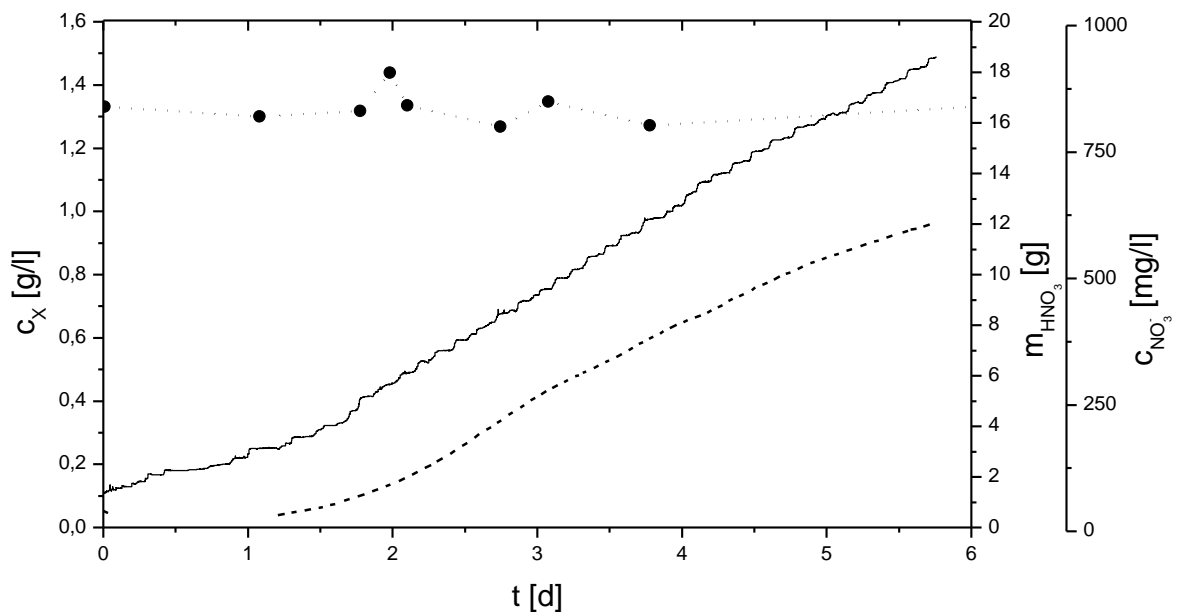


Abb. A3.8: Satzkultivierung von *C. vulgaris*. Titration mit HNO_3 bei konstantem $pH = 7,5$.; —: Gesamtmasse zugegebener Salpetersäure m_{HNO_3} ; ●: Nitratkonzentration $c_{NO_3^-}$; ---: Biomassekonzentration c_x .

Tabelle A3-1: CO-Partialdrücke zur Bestimmung der CO₂-Kinetik. μ : Wachstumsrate; P_x : volumetrische Biomasseproduktivität. Die Berechnung des Partialdrucks [kPa] erfolgte unter Annahme von Normaldruck in der Umgebung und unter Vernachlässigung der Druckschwankungen in der Umgebung. Die Eintauchtiefe des CO₂-Sensors in die Zellsuspension betrug 16 cm.

CO ₂ -Partialdruck		μ	P_x
[% des Systemdrucks]	[kPa]	[d ⁻¹]	[g/(l·d)]
0,03	0,03	0,79	0,09
0,04	0,04	1,02	0,26
0,5	0,51	1,35	0,34
1,5	1,54	1,32	0,26
3	3,09	1,25	0,34
4,48	4,61	1,23	0,40

A 4 Matlab Programmierung

Modellierung des Wachstums und der Speicherlipidakkumulation

```
function [y] = StoichMod(DataForValidation, opt_para, non_opt_para,
sensitivityrange)

w_TAG_X_max = non_opt_para(1);
w_SC_X_max  = non_opt_para(2);
nInhSC      = non_opt_para(3);
cX_active   = opt_para(4);
eps_a       = opt_para(1);
eps_b       = opt_para(2);
tlag        = opt_para(3);    % [d]

load('DataMidi_1_8.mat')
load('DataMidi_1_6.mat')
load('DataMidi_1_2.mat')
load('DataMidi_0_8.mat')
load('DataMidi_0_5.mat')
load('DataMidi_0_2.mat')

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
DataVal      = DataForValidation;    % experimental data
StopTime     = DataVal(numel(DataVal(:,1)),1); % last sampling time of
                                        experimental data

StepSize     = 1;                    % [min]
StepSize     = StepSize/60/24;       % conversion of [min] to [d]
PFD_0        = DataVal(1,12);        % [ $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \text{s})$ ]
d_reactor    = 2;                    % [cm] light path length

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%% Elemental composition of molecules (w/w): [C H N O P S] %%%
DNA_comp     = [0.3793  0.0466  0.1599  0.3131  0.1010      0];
RNA_comp     = [0.3565  0.0436  0.1532  0.3499  0.0968      0];
Protein_comp = [0.5262  0.0736  0.1817  0.2086      0  0.0299];
MLIP_comp    = [0.6497  0.0969  0.01    0.2425  0.0109      0];
Pigment_comp = [0.7726  0.0816  0.0601  0.0858      0      0];
Carbohydrate_comp = [0.4445  0.0622      0  0.4934      0      0];
TAG_comp     = [0.7703  0.1158      0  0.1139      0      0];

w_prot_X     = 0.593;    % mass fraction of proteins in Biomass X
w_MLIP_X     = 0.158;
w_structCH_X = 0.1843;
w_RNA_X      = 0.02124;
w_DNA_X      = 0.02947;
w_Pigm_X     = 0.0147;  % experimental ratio of Chla:Chlc:Car = 0.6:0.1:0.3

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%% Macromolecular composition of biomass %%%
X_molec_comp = [w_prot_X;
                w_MLIP_X;
                w_structCH_X;
                w_RNA_X;
                w_DNA_X;
                w_Pigm_X];
```

```

##### Elemental composition of biomass #####
X_comp = X_molec_comp(1,1) * Protein_comp...
        + X_molec_comp(2,1) * MLIP_comp...
        + X_molec_comp(3,1) * Carbohydrate_comp...
        + X_molec_comp(4,1) * RNA_comp...
        + X_molec_comp(5,1) * DNA_comp...
        + X_molec_comp(6,1) * Pigment_comp;

##### Yield coefficients [g] on the basis of 1 mol NADPH and 1 mol ATP
Y_Pigm      = [3.7836 5.4555];           % [g/mol]
Y_MLIP      = [5.5648 2.7062];           % [g/mol] Raven (1982)
Y_DNA       = [12.50 7.4074];           % [g/mol]
RNACostPerGram = [12.0482 7.0423];       % [g/mol]
Y_Prot      = [5.8824 4.6339];           % [g/mol] Raven (1982), includes CCM
Y_TAG       = [5,5648 2,7064];           % [g/mol] Raven (1982), includes CCM
Y_CH        = [13.7501 7.4571];         % [g/mol] Raven (1982), includes CCM
Y_maint     = [231,4815 154.3210];       % [(g*L*d)/mol]
Y_X = X_molec_comp(1,1) * Y_Prot...
      + X_molec_comp(2,1) * Y_MLIP...
      + X_molec_comp(3,1) * Y_CH...
      + X_molec_comp(4,1) * RNACostPerGram...
      + X_molec_comp(5,1) * Y_DNA...
      + X_molec_comp(6,1) * Y_Pigm;           % [g/mol]

w_N_NO3 = 0.2258; % Mass fraction "e" of nitrogen in NO3 (e = M_N/M_NO3)
w_P_PO4 = 0.3261; % Mass fraction "e" of phosphorous in PO4
w_S_SO4 = 0.3338; % Mass fraction "e" of sulfur in SO4

##### Initialization, starting conditions #####
cX      = cX_active*2;           % assumption: inoculum with storage molecules 50%
SC      = 0.5*cX_active;
TAG     = 0.5*cX_active;
c_NO3   = DataVal(1,3)/1000;     % original data in [mg/L]
c_SO4   = DataVal(1,5)/1000;     % original data in [mg/L]
c_PO4   = DataVal(1,13)/1000;    % original data in [mg/L]

##### End Initialization #####

##### Start of Simulation / Loop #####
for i = 0:StepSize:StopTime;

##### Start Light Absorption & Photosynthesis #####

##### model according to Camacho Rubio et al. (2001) #####
alpha = 65.98;
kappa = 0.042;
restingPSUfraction = 1-(1/2*((1-kappa-alpha/PFD_0)+((1-kappa-alpha/PFD_0)^2+4*kappa).^ (1/2)));

##### Phenomenological description of optical properties of the culture #####
epsilon = 1/(eps_a*cX_active) + eps_b * cX_active^(1/2);
PFD_trans = PFD_0 * exp(-d_reactor * epsilon * cX_active);

PFD_abs_tot = PFD_0 - PFD_trans;

```

```

PFD_abs_PSur = restingPSUfraction * PFD_abs_tot;

r_NADPH = 1/cX_active * 2/8 * PFD_abs_PSur * 3600 * 24 * 10^(-6) *
0.001/(d_reactor/100); % [mol/(L d)]
r_ATP    = 1/cX_active * 3/8 * PFD_abs_PSur * 3600 * 24 * 10^(-6) *
0.001/(d_reactor/100); % [mol/(L d)]
%%%%%%%%%% End Light Absorption & Photosynthesis %%%%%%%%%%%

%%%%%%%%%% Start Linear Programming %%%%%%%%%%%
coder.extrinsic('optimset', 'linprog');

if c_NO3 < 0
    c_NO3 = 0;
end

if c_SO4 < 0
    c_SO4 = 0;
end

if c_PO4 < 0
    c_PO4 = 0;
end

r_SC_max = min(Y_CH(1) * (r_NADPH- 1/Y_maint(1) * cX/cX_active), Y_CH(2) *
(r_ATP- 1/Y_maint(2) * cX/cX_active) );
r_TAG_max = min(Y_TAG(1) * (r_NADPH- 1/Y_maint(1) * cX/cX_active),
(Y_TAG(2) * (r_ATP- 1/Y_maint(2) * cX/cX_active)));

r_NO3_max = 1;
r_SO4_max = 1;
r_PO4_max = 1;

K_NO3 = 0.001;
K_SO4 = 0.001;
K_PO4 = 0.001;

r_NO3 = r_NO3_max * c_NO3/(c_NO3+K_NO3);
r_SO4 = r_SO4_max * c_SO4/(c_SO4+K_SO4);
r_PO4 = r_PO4_max * c_PO4/(c_PO4+K_PO4);

maxSC = w_SC_X_max * cX_active;
maxTAG = w_TAG_X_max * cX_active;

% rNADPH rATP rmNADPH rmATP r_actBDM r_TAG r_SC r_NO3 r_PO4 r_SO4
g = - [0 0 0 0 5 2.2 1 0 0 0];
A = [0 0 0 -1 0 0 0 0 0 0;
     0 0 -1 0 0 0 0 0 0 0;
     0 0 0 0 -1 0 0 0 0 0;
     0 0 0 0 0 -1 0 0 0 0;
     0 0 0 0 0 0 -1 0 0 0;
     0 0 0 0 0 0 0 -1 0 0;
     0 0 0 0 0 0 0 0 1 0;
     0 0 0 0 0 0 0 0 0 1;
     0 0 0 0 0 0 0 0 0 1;
     0 0 0 0 0 0 1 0 0 0;
     1 0 0 0 0 0 0 0 0 0;
     0 1 0 0 0 0 0 0 0 0];

```


Modellprädiktive Regelung

```

% Initialisierung
N_past      = 200;
if toggle_clear
    clear past_us cCO2_soll y fmincon_output
    past_us = zeros(N_past,1);
end

if exist('y','var') else y = 0; end
if exist('du','var') else du = 0; end
if exist('y_show','var') else y_show = zeros(N, 1); end

% Parameter
T_control    = T_input/60;           % [min] Zeitschritt des Controllers,
                                       % Eingabe in [s]
t_del        = t_delay/60;          % [min] Totzeit, Eingabe in [s]
ratio_A_V    = 0.042;               % [m²/l] BE4: V = 1.7 l, h = 24 cm;
                                       % d = 9.5 cm
E_BTM        = 20;                  % [kJ/g]
E_Photons    = 210.4 * 10^(-6);     % [kJ/µmol]
kla_control  = 0.042;               % [1/min]
KH           = 0.034;               % [mol/l/bar];
MCO2         = 44.01;               % [g/mol]
p            = 1;                   % [bar]
K1           = 10^(-6.381);          % [mol/l]
K2           = 10^(-10.377);        % [mol/l]
Kw           = 10^(-14);             % [mol/l]
qLuft        = 100;                 % [ml/min]
k1           = KH*MCO2*p;

%Initialisierung
if exist('f','var') else f = zeros(Ny,1); end
if exist('yCO2','var') else yCO2 = dCO2_set/k1; end

% Start des Regelalgorithmus
ym = dCO2_set + 44.01 * (10^(-pH)-10^(-pH_set))/((K1/10^(-pH_set)+2*K1*K2/((10^(-pH_set))^2)) / (1+Kw/(10^(-pH_set))^2+K1*(dCO2_set/44.01)/(10^(-pH_set))^2+8*K1*K2*(dCO2_set/44.01)/(10^(-pH_set))^3));
w  = ones(Ny,1) * dCO2_set;         % Führungsgröße/Trajektorie

% Systembeschreibende Matrix
h = zeros(Ny,1);
for hi = 1:1:Ny
    h(hi) = max((1-exp(-kla_control*(T_control*hi-t_del))),0);
end

H = zeros(Ny,N);
H(:,1) = h(:,1);
for zi = 2:1:N
    H(zi:Ny,zi) = H(zi-1:Ny-1,zi-1);
end

Hpast= zeros((N_past + Ny),1);
for m = 1:1:(N_past+Ny)
    Hpast(m) = (1-exp(-kla_control*T_control*m));
end

```

```

% Berechnung der freien Antwort
f = zeros(Ny,1);
for ii = 1:1:Ny
    f(ii) = ym;
    for ji = 1:1:N_past
        f(ii) = f(ii) + past_us(ji) * (Hpast(ji+ii)-Hpast(ji));
    end
end

d = PFD * ratio_A_V * 60 * PCE/100 * E_Photons/E_BTM * 1.8; % Störgröße

u = zeros(N,1); % Stellgrößenänderung
options = optimset('MaxFunEvals', 1e9, 'TolX', 10^(-22), 'Algorithm',
'sqp', 'ObjectiveLimit', 10^-22 );
lb = 0.004*k1 - k1*yCO2;
ub = 0.078*k1 - ym;
[u, fval, exitflag] = fmincon(@(u) (sum((H*(u-d/kla_control) + f - w).^2) +
sum((lambda*u).^2)), zeros(N,1), [], [], [], [], lb,ub, [], options);

yCO2 = yCO2 + u(1)/k1;
qCO2 = yCO2/(1-yCO2)*qLuft;

past_us(2:1:N_past) = past_us(1:1:(N_past-1));
past_us(1) = u(1);

end

```