

**Effizienzsteigerung mikroalgenbasierter Energiegewinnung durch
Prozessintegration – Prozessauslegung und Modellierung der
Glycolatproduktion und Konstruktion eines Biofilmreaktors**

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

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

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl. Ing. Mark Fresewinkel
aus Wuppertal

Referent: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten

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

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2016



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung –
Weitergabe unter gleichen Bedingungen 3.0 Deutschland Lizenz
(CC BY-SA 3.0 DE): <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>

Danksagung

Zunächst möchte ich mich besonders bei Herrn. Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in seiner Gruppe anzufertigen. Die wissenschaftlichen Diskussionen und die Freiheiten bei der Bearbeitung der Projekte haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Christoph Syltatk möchte ich für die freundliche Übernahme des Korreferats danken.

Herzlichen Dank für die Diskussionen und die positive, innovative Atmosphäre an die Projektpartner der Universitäten Leipzig und Bremen sowie des SIAB; insbesondere danke ich den Doktoranden Anja Günther, Theresa Quaas, Susann Reinert und Susanne Heithoff für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Danken möchte ich den Studierenden, die das Gelingen dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben. Dies waren Ana Pereira, Adriana Wagner, Noemi Gutierrez Carmona, Denis Jester, Eva-Maria Wanka, Tobias Behr, Anna-Lena Walde, Johannes Sood, Tatjana Schönfelder, Babak Aghahassani und Jeromé Grenier.

Vielen Dank an die Mitarbeiter des Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Bei Christian Steinweg und Thomasz Duzmal, die stets Rat im Technikum wussten, möchte ich mich für die Unterstützung bedanken. Dr. Meike Dössel danke ich für die fruchtbaren Diskussionen und die guten Ratschlägen. Ich hoffe, dass die besonderen Freundschaften, die sich über die Jahre entwickelt haben, von Dauer sein werden.

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

Mark Fresewinkel

Inhaltsverzeichnis

1. Ausgangssituation und Zielsetzung	1
2. Theoretische Grundlagen	4
2.1. Kultivierung photoautotropher Organismen	4
2.1.1. Die Kohlenstofffixierung von photoautotrophen Organismen	4
2.1.2. Die <i>in situ</i> RuBisCO-Reaktion	9
2.1.3. Die Lichtreaktion	12
2.1.4. Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismen	15
2.2. Mikroalgen als Quelle erneuerbarer Energien	16
2.2.1. Konstruktive und prozesstechnische Anforderungen an Photobioreaktoren	16
2.2.2. Der Wirkungsgrad von Photobioreaktoren	19
2.2.3. Wirkungsgrad von mikroalgenbasierten Prozessen	22
3. Materialien und Methoden	24
3.1. Algenstämme und Medium	24
3.2. Kultivierungsbedingungen	25
3.2.1. Stammhaltung	25
3.2.2. Kultivierung in Mini-Plattenreaktoren	26
3.2.3. Kultivierung im Rührkessel	27
3.2.4. Kultivierung der Algen im Biofilm-Reaktor	32
3.3. Herstellung und Einsatz lichtleitender Einbauten	32
3.4. Analytische Methoden	34
3.4.1. Biomassekonzentration	34
3.4.2. Chlorophyllanteil der Biomasse	34
3.4.3. Stärkegehalt der Biomasse	35
3.4.4. Glycolat-Konzentration	35
3.4.5. Konzentration anorganischer Ionen	36

Inhaltsverzeichnis

3.4.6.	Fluoreszenzmessung (PAM)	36
3.4.7.	Extinktion der Algensuspension	37
3.5.	Berechnungen	38
3.5.1.	Biomassespezifische Produktionsraten	38
3.5.2.	Stofftransportkoeffizienten	38
3.5.3.	Reglerauslegung	39
3.5.4.	Varianzanalyse	40
3.5.5.	Energetischer Vergleich von Bioreaktoren	41
3.5.6.	Verwendete Software	42
4.	Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion	43
4.1.	Auswahl und Charakterisierung des Modellorganismus	43
4.1.1.	pCO ₂ -Kinetik des Wildtyps WT 11-32 b	44
4.1.2.	Nährstoffbedarf von CC1860	46
4.1.3.	Lichtkinetik des Organismus CC1860	46
4.1.4.	Abhängigkeit der Wachstumsrate vom O ₂ -Partialdruck	48
4.2.	Glycolatproduktion in kurzzeitigen Batch-Experimenten	49
4.2.1.	Glycolatproduktion in einem Mini-Plattenreaktor mit Online-Messtechnik zur Prozessvalidierung	50
4.2.2.	Kurzzeitige Glycolatproduktion von <i>C. reinhardtii</i> CC1860	52
4.3.	Glycolatproduktion in quasistationärem Zustand	53
4.3.1.	Entwicklung einer Methodik zur Aufnahme einer pCO ₂ /pO ₂ -Kinetik unter konstanten Lichtbedingungen	53
4.3.2.	pCO ₂ -/pO ₂ -Kinetik von <i>C. reinhardtii</i> CC1860	55
4.3.3.	Energetische Betrachtung des Einflusses des CO ₂ - und O ₂ -Partialdrucks auf den Gesamtorganismus	59
4.3.4.	pCO ₂ -/pO ₂ -Kinetik der CCM-Mutante bei Zusatz des Hemmstoffs Ethoxylolamid	62
4.4.	Diskussion der Ergebnisse zur Prozessauslegung der Glycolatproduktion	65
4.4.1.	Bewertung der Methodik zur Aufnahme einer pCO ₂ -/pO ₂ -Kinetik im quasistationärem Zustand	65
4.4.2.	pCO ₂ -/pO ₂ -Kinetik der Wildtypalge <i>C. reinhardtii</i> WT 11-32b	66
4.4.3.	pCO ₂ -/pO ₂ -Kinetik von <i>C. reinhardtii</i> CC1860	67
5.	Modellbildung der Glycolatproduktion	73
5.1.	Zielsetzung der Modellbildung	73

Inhaltsverzeichnis

5.2. Modellstruktur	74
5.2.1. Kinetik des Gesamtorganismus	75
5.2.2. Bilanzierung der Stoffströme	76
5.2.3. Bilanzierung der Energieströme	79
5.3. Anpassung der Modell-Parameter	81
5.3.1. Sensitivitätsanalyse der RuBisCO-Kinetik	82
5.3.2. RuBisCO-limitierte Kinetik	85
5.3.3. Energetische Ausbeute des Organismus	92
5.4. Diskussion des Modells	100
6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat	108
6.1. Stoffliche Auslegung des Reaktorbetriebs	108
6.2. Vergleich der Betriebsleistung von Photobioreaktoren	109
6.3. Auswahl einer Membran für die Be- und Entgasung des Kultivierungssegments	111
6.4. Auswahl einer Immobilisierungsmatrix	114
6.5. Homogenisierung der Lichtintensität in Photobioreaktoren	115
6.5.1. Herstellung und Charakterisierung von lichtleitenden Einbauten . . .	115
6.5.2. Kultivierung mit lichtleitenden Einbauten in Plattenreaktoren	117
6.6. Konstruktion eines Reaktors zur Kultivierung eines phototrophen Biofilms . .	120
6.6.1. Kultivierung und Produktion von Glycolat im Biofilm-Reaktor	124
6.7. Diskussion des Reaktorkonzepts für die Kultivierung im Biofilm	126
7. Zusammenfassung und Ausblick	132
8. Abstract	137
Anhang	141
A. Materialien	142
A.1. Zusammensetzung Medium	142
B. Ergebnisse	144
B.1. Ergebnisse der pCO ₂ -Kinetik	144
B.2. Ergebnisse der pO ₂ -Kinetik	145
B.3. Kurzzeitige Glycolatproduktion mit CC1860	146

Inhaltsverzeichnis

C. Kalibrierungen	149
C.1. Kalibrierung der LED-Module	149
C.2. Kalibrierung der OD-Biomassekonzentration	150
D. Rechnungen	151
D.1. Herleitung der Reaktionskinetik der RuBisCO	151
D.2. Anpassung der kinetischen Konstanten der RuBisCO	155
D.3. Parameteranpassung der Photosynthese/Photorespiration (gekoppelte Licht- und RuBisCO-Kinetik)	158
D.4. Parameteranpassung der Photosynthese/Photorespiration (nur RuBisCO-Kinetik)	164
Literatur	169

Abkürzungsverzeichnis

χ	Sensitivität einer Rate hinsichtlich eines Parameters	[–]
ϵ	Extinktionskoeffizient	[l/g/m]
η	Dynamische Viskosität	[–]
λ	Rohrreibungsbeiwert	[–]
Φ	Aufteilungskoeffizient der Oxygenierungs- und Carboxylierungsreaktion des Enzyms RuBisCO	[–]
ρ_i	Dichte des Mediums i	[kg/m ³]
τ	Integrationszeit des PI-Reglers	[s]
A_i	Absorption bei der Wellenlänge i	[AU]
A_{LED}	Fläche des LED-Panels für die Beleuchtung	[m]
C	Covarianzmatix	
c_i	Konzentration der Komponente	[g/l]
D	Verdünnungsrate \dot{V}/V	[1/h]
D_i	Diffusionskoeffizient der Komponente i	[m ² /s]
$e_{i,j}$	Anteil von Komponente i in j	[g/g]
$e_{C,X}$	Anteil von Kohlenstoff in der Biomasse	[g/g]
$e_{X,j}$	Biomasseanteil	[g _j /g _x]
F	Fisher-Informationsmatrix	[–]
g	Erdbeschleunigung	[m/s ²]
H_i	Henry-Koeffizient der Komponente i	[mol/l/atm]
I_0	Lichtintensität	[μE/m/s]
k_i	Kinetische Konstante der Reaktion i	[mol/l]
k_C	Kinetische Konstante für die Carboxylierungsreaktion der RuBisCO	[mol/l]
k_l	Stofftransportkoeffizient	[m/s]

Inhaltsverzeichnis

$k_{l,a}$	Volumetrischer Stofftransportkoeffizient	[1/s]
k_O	Kinetische Konstante für die Oxygenierungsreaktion der RuBisCO	[mol/l]
K_i	Integral-Anteil eines Reglers, Einheit abhängig von der zu regelnden Größe	
K_p	Proportional-Anteil eines Reglers, Einheit abhängig von der zu regelnden Größe	
k_{RuBP}	Kinetische Konstante der RuBisCO-Reaktion mit RuBP	[mol/l]
l	Länge	[m]
n_i	Brechungsindex des Materials i	[-]
p	Druck	[bar]
$P_{X,A}$	Flächenbezogene Produktivität	[g/m ² /d]
$P_{X,V}$	Volumenbezogene Produktivität	[g/l/d]
PCE	Photonenkonversionseffizienz	[J/J]
ppi	Poren pro Inch	[1/inch]
R	Innenradius des zylindrischen Rührkessels	[m]
r_A	spezifische Kohlenstoffassimilierungsrate des Organismus in Biomasse und Glycolat	[g/g/h]
r_D	Tagrespiration	[mol/g/h]
r_R	Recyclingrate von Glycolat	[mol/g/h]
$r_{C,max}$	Maximale Carboxylierungsrate der RuBisCO <i>in situ</i>	[mol/g/h]
$r_{O,max}$	Maximale Oxygenierungsrate der RuBisCO <i>in situ</i>	[mol/g/h]
r_{RuBP}	spezifische Verbrauchsrate von Ribulose-1,5-Bisphosphat	[mol/g/h]
Re	Reynoldszahl	[-]
S	Selektivität	[-]
V	Volumen	[l]
v	molares Volumen	[m ³ /mol]
Y_{ATP,CH_2O}	Ausbeutekoeffizient der Biomasse aus dem DAHP	[-]
$Y_{ATP,PhNZ}$	Ausbeutekoeffizient von ATP im nichtzyklischen Elektronentransport	[-]
$Y_{ATP,PhZ}$	Ausbeutekoeffizient von ATP im zyklischen Elektronentransport	[-]
$Y_{NADPH,PhNZ}$	Ausbeutekoeffizient von NADPH im Nichtzyklischen Elektronentransport	[-]
$Y_{X,ATP}$	Ausbeutekoeffizient der Biomasse bezüglich ATP	[-]
$Y_{X,j}$	Ausbeutekoeffizient	[g _x /g _j]
\dot{V}	Volumenfluss	[l/h]

Inhaltsverzeichnis

ATP ...	Adenosintri-phosphat
CCM ..	Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismus
ETR ...	Elektronen Transport Rate
EZA ...	Ethoxazolamid
Fd	Ferredoxin
GAP ..	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GDH ..	Glycolatdehydrogenase
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PAM ..	Puls-Amplituden-Modulation
PAR ...	Photosynthetisch aktive Strahlung
PG	Phosphoglycolat
PGA ..	3-Phosphoglycerat
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
RuBP ..	Tagrespiration
TAP ...	Tris-Acetat-Phosphat Nährmedium

1. Ausgangssituation und Zielsetzung

Mikroalgen haben als Produktionsorganismus ein hohes Interesse gewonnen. Sie können hochpreisige Metaboliten, wie Pigmente und rekombinante Proteine, oder organische Grundchemikalien produzieren, aber auch in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt werden [1]. Ein Forschungsschwerpunkt ist die Verwendung von Mikroalgen als regenerative Energiequelle. Angetrieben von politischen Beschlüssen wird die Energieversorgung zunehmend auf erneuerbare Energiequellen umgestellt [2]. Durch diese Fortschritte sind erste Erfolge bei der Reduktion der Treibhausgas-Emission zu verzeichnen. Im Jahr 2014 gingen die Emissionen um 4,3 % im Vergleich zum Vorjahr und sogar 27 % im Vergleich zum internationalen Referenzjahr 1990 zurück [3]. Auch in Zukunft werden die Bemühungen verstärkt, diesen Trend fortzusetzen. Die Europäische Kommission hat als Ziel beschlossen, bis zum Jahr 2020 Kraftstoffe zu einem Anteil von mindestens 10 % aus regenerativen Energien zu gewinnen [4]. Insbesondere Algen und Abfälle aus der Landwirtschaft stehen im Fokus der Direktive. Durch die Nutzung von Agrarflächen für sogenannte Energiepflanzen entbrannte die öffentliche Diskussion "Tank vs. Teller"[5]. Dem kann die Nutzung von Mikroalgen, durch die Möglichkeit der Kultivierung in geschlossenen Reaktoren auch auf landwirtschaftlich nicht nutzbaren Flächen, entgegnet werden. Ein weiterer Vorteil der Algen ist ihre schnelle Wachstumsrate und ihr höherer energetischer Wirkungsgrad im Vergleich zu höheren Landpflanzen [6]. Mikroalgen können dazu eingesetzt werden Lipide, Methan, Wasserstoff oder Ethanol zu bilden. Die Produkte können direkt im Organismus gebildet werden oder durch die Verarbeitung der Biomasse (z.B. durch eine weitere Vergärung) gewonnen werden [7].

Das technische und wirtschaftliche Potential der Forschungsergebnisse wird stark diskutiert [8, 9, 10, 11, 12]. Prozesse mit einer wirtschaftlichen energetischen Nutzung sind bisher selten [13]. Große Fortschritte konnten bezogen auf einzelne Prozessschritte erreicht werden z.B. durch die Entwicklung effizienter Reaktoren [14, 15], durch Verbesserung der Ausbeute aus dem Organismus mit Hilfe von Gentechnik oder durch neuere Verfahren [16, 17]. Wichtig

1. Ausgangssituation und Zielsetzung

ist die umfassende Betrachtung des Gesamtprozesses [18]. Nur durch Integration verschiedener Prozesse ist eine nachhaltige Produktion von Energieträgern mit Mikroalgen möglich. Hierauf zielt das Konzept der „New Green Chemistry“ [19], bei der das Zielprodukt durch den Organismus in das Medium exkretiert und so verfügbar gemacht wird. Beispielprozesse sind die Produktion von Ethanol mittels Cyanobakterien durch SolixBioSystems (Fort Collins, CO, USA) und weiterer Plattformchemikalien von Glycos Biotechnologies Inc. (Houston, TX, USA). Durch die Exkretion des Produkts ist es möglich den Prozess sowohl technisch als auch biologisch zu optimieren. So kann die von der Zelle benötigte Energie für die Neubildung von Biomasse reduziert werden [6]. Besonders energieintensive Aufkonzentrierungsschritte sind unnötig, da das Produkt durch den Austrag von Medium in Lösung verfügbar ist [20]. Auch in der Reaktortechnik bietet dieser Ansatz Vorteile. Da nicht der Organismus selbst das Zielprodukt der Kultivierung ist, kann dieser im Reaktor verbleiben und als „Photokatalysator“ dauerhaft genutzt werden. Dies ermöglicht die Kultivierung im energieeffizienten Biofilm. Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Prozesses zur Produktion von Glycolat im Sinne der „New Green Chemistry“. Hierzu soll durch die Einstellung geeigneter Prozessbedingungen Glycolat von den Mikroalgen exkretiert werden. Das Glycolat kann, nach Abtrennung von Sauerstoff aus dem Medium, in einem nachfolgenden Prozessschritt beispielsweise zu Biogas fermentiert werden (s. Abbildung 1.1). Um den Prozess umfassend zu betrachten und mög-

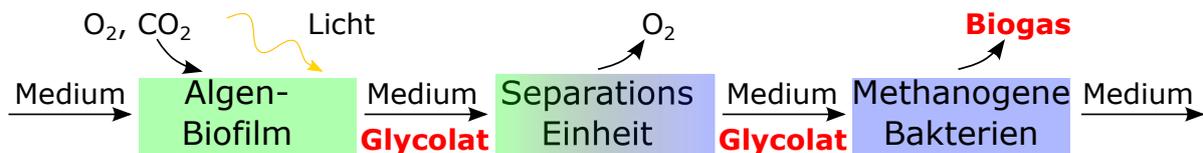


Abbildung 1.1.: Innovativer Prozess für die Produktion von Biogas mittels Mikroalgen. Durch die Einstellung geeigneter Prozessbedingungen wird Glycolat von immobilisierten Mikroalgen exkretiert. Die glycolathaltige Lösung wird aus dem Photobioreaktor abgeführt und O_2 abgetrennt. In einem weiteren Prozessschritt wird das Glycolat anaerob in einem Biogas-Modul zu CH_4 und CO_2 fermentiert.

lichst effektiv auszulegen, wurde das Konzept in zwei Bereiche unterteilt. Zum einen wird ein Prozess für die kontinuierliche Produktion von Glycolat entwickelt und optimiert. Zentrales Enzym ist hier die Ribulose-1,5-bisphosphat-Oxygenase/Carboxylase (RuBisCO). Abhängig von den Prozessparametern kann dieses Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylieren (Biomasse-Bildung) oder oxygenieren (Glycolatproduktion). Die Reaktionsraten sind abhängig von dem Partialdruckverhältnis von O_2 und CO_2 [21]. Die RuBisCO-Kinetik sowie die Photosynthese und die Photorespiration wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen genauer untersucht. Alle Untersuchungen zielten darauf ein grundlegendes Verständnis der Stoffwechselwege in der Zelle [22, 23] zu erhalten, um so die Photorespiration zu unterdrücken, etwa

1. Ausgangssituation und Zielsetzung

für die Optimierung der Produktion von Landpflanzen [24, 25]. Die Nutzung von Glycolat als Edukt für weitere Prozesse ist ein bisher kaum verfolgter Ansatz. Vílchez schlug einen Prozess zur Glycolatproduktion vor, in dem jedoch nur wenige Stunden Glycolat gebildet wurde. Danach stellte sich der Organismus auf die neuen Prozessbedingungen ein und verhinderte die weitere Exkretion von Glycolat durch Aktivierung entsprechender Stoffwechselwege [26]. In dieser Arbeit wurde mit einem geeigneten Produktionsstamm ein kontinuierlicher Prozess zur Glycolatbildung mit einer hohen Produktionsrate über einen langen Zeitraum realisiert. Modellierung und Simulation vertiefen das Prozessverständnis und tragen zu einer optimalen Auslegung bei. Es wurde ein systembiologisches Modell entwickelt, welches die Kinetik der *in situ* RuBisCO in den Kontext der Stoffwechselwege von Photosynthese und Photorespiration setzt. Die Kinetik des Photosystems für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten und Energieträgern ist in dem Modell implementiert. Die entscheidenden Kinetiken von RuBisCO und Photosystem werden stöchiometrisch mit Energie- und Stoffflüssen gekoppelt. Verbleibende Freiheitsgrade von nicht direkt messbaren spezifischen Raten entscheidender Stoffwechselwege können durch die statistische Auswertung der Ergebnisse von Kultivierungen aus einem Modellreaktor bestimmt werden. So kann die Kinetik der RuBisCO organismusspezifisch ermittelt und Bottlenecks des Prozesses identifiziert werden. Die Bestimmung der Ausbeutekoeffizienten des Organismus ermöglicht die optimale Auslegung des Prozesses zur Erhöhung des Wirkungsgrads.

Zur Umsetzung des integrierten Prozesses wurde ein Photobioreaktor entwickelt, der für den Betrieb einen minimalen Leistungseintrag erfordert. Hierzu wurden verschiedene Reaktorkonzepte bezüglich ihrer Betriebsleistung miteinander verglichen. Die Auslegung der Stoffströme erfolgte auf Grundlage der Erkenntnisse aus den Modellreaktorversuchen. Ein horizontaler Photobioreaktor für die Kultivierung von Mikroalgen in einem Biofilm wurde konzipiert und getestet. Für die Etablierung eines Biofilms in dem Reaktor wurde aus verschiedenen Immobilisierungsmethoden diejenige ausgewählt, die einen hohen Zellrückhalt aufwies sowie eine vollständige Absorption der auftreffenden photosynthetisch aktiven Photonen gewährleistete. Durch eine Membranbegasung kann in dem Reaktor ein energieeffizienter Gasaustausch zwischen Gas und Flüssigphase sichergestellt werden. Es wurden verschiedene Membranen in einer Testkammer bezüglich ihres Stofftransports von CO₂ und O₂ charakterisiert. Zur Verteilung des auftreffenden Lichts über die Reaktortiefe wurde das Konzept der lichtleitenden Einbauten aufgegriffen und weiterentwickelt [27]. Dadurch wurde eine effizientere Verteilung der Photonen über die Reaktortiefe ermöglicht und so eine höhere Photonenausbeute erreicht. Der Prozess der Glycolatproduktion wurde auf den entwickelten Biofilm-Reaktor übertragen und so das Konzept dieses Prozesses validiert.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Kultivierung photoautotropher Organismen

2.1.1. Die Kohlenstofffixierung von photoautotrophen Organismen

Im lichtunabhängigen Teil der Photosynthese, der Dunkelreaktion, wird Kohlenstoffdioxid organisch gebunden. Reduktionsmittel und Energielieferanten der Dunkelreaktion werden in der Lichtreaktion gebildet. Zentrales Enzym der Dunkelreaktion ist die RuBisCO. Sie katalysiert die Fixierung des sonst reaktionsträgen CO₂.

Das zentrale Enzym der Dunkelreaktion: RuBisCO

Die RuBisCO, Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase, ist mit einer molekularen Masse von 560 kDa eines der größten Enzyme. Insgesamt sind vier Formen und 20 Strukturen der RuBisCO in unterschiedlichen Organismen bekannt. In Grünalgen sowie grünen Pflanzen und Cyanobakterien ist die Form I zu finden [28, 29]. Diese Form der RuBisCO besteht aus insgesamt 16 Untereinheiten [30]. Im Organismus *Chlamydomonas reinhardtii* liegt die RuBisCO in dem Chloroplasten-Stroma und dem Pyrenoid vor. Mit steigendem CO₂-Partialdruck im Pyrenoid nimmt die Konzentration von RuBisCO im Chloroplasten-Stroma zu, wobei die genaue Verteilung noch diskutiert wird [31, 32, 33]. Die RuBisCO katalysiert die kompetitive Reaktion von CO₂ oder O₂ mit Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP). Für diese Reaktion muss die RuBisCO zunächst aktiviert werden. Dies erfolgt in einem ersten Schritt durch die Bindung von CO₂ an eine aktive Seite des Lysin 201-Restes (Carbamylierung) [34]. Durch die Carbamylierung dieses Lysin-Restes entsteht eine anionische Gruppe. An diese

2. Theoretische Grundlagen

kann ein divalentes Metallion (Mg^{2+}) binden und die RuBisCO in ihrer aktivierten Form stabilisieren [35]. Die beiden Aktivierungsschritte werden *in vivo* durch das Enzym RuBisCO-Aktivase begünstigt. Die Aktivase wird wiederum durch das intrazelluläre ADP/ATP- sowie NADP/NADPH-Verhältnis reguliert [36, 37, 38]. Die aktivierte RuBisCO kann Ribulose-1,5-bisphosphat binden. In einem nächsten Reaktionsschritt erfolgt die Enolisierung der Ribulose (s. Abbildung 2.1). Mit der Enol-Gruppe kann entweder CO_2 oder O_2 nukleophil reagieren. Dabei erfolgt keine Bindung der Gase an das Enzym. Eine Berechnung der Bildungsenthalpien zeigt, dass die Übergangszustände der CO_2 - bzw. der O_2 -Addition reversibel sind. Die weiteren Reaktionen zu den Produkten Glycolat und Glycerat hingegen sind irreversibel. Als Reaktionsprodukt entstehen zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat (PGA) bzw. ein PGA und ein Phosphoglycolat (PG) [39]. Die einzelnen kinetischen Konstanten k_{E-ES} , k_{ES-E} , k_{ES-ESC}

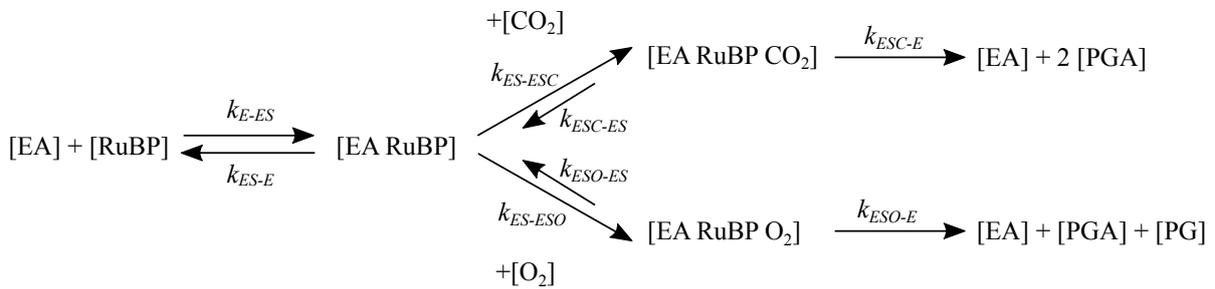


Abbildung 2.1.: Mechanismus der RuBisCO-Kinetik nach Tcherkez [39]. Das aktivierte Enzym [EA] reagiert mit Ribulose-1,5-bisphosphat [RuBP] zu einem Enzym-Substrat-Komplex [EA RuBP]. Die Addition von CO_2 und O_2 erfolgt durch direkte nukleophile Reaktion. Die gebildeten Übergangszustände [EA RuBP CO_2] und [EA RuBP O_2] reagieren irreversibel zu den Produkten 3-Phosphoglycerat [PGA] und Phosphoglycolat [PG]. Die jeweiligen kinetischen Konstanten sind mit k_i bezeichnet.

, k_{ESC-ES} , k_{ES-ESO} , k_{ESO-ES} , k_{ESC-E} und k_{ESO-E} sowie die Konzentrationen der quasistationären Übergangszustände [EA RuBP], [EA RuBP CO_2] und [EA RuBP O_2] können in Anlehnung an Michaelis-Menten-Konstanten für Ribulose-1,5-bisphosphat (k_{RuBP}), CO_2 (k_C) und O_2 (k_O) sowie den maximalen Umsatzraten der Carboxylierung ($r_{C,max}$) und Oxygenierung ($r_{O,max}$) zusammengefasst werden [39]. Eine Herleitung findet sich u.a. in Farquhar et al. [22, 40, 39]. Daraus ergeben sich die Gleichungen 2.1 und 2.2 für die Carboxylierungs- und Oxygenierungsreaktion der RuBisCO. Diese Gleichungen sind abhängig von der Konzentration bzw. mit Gleichung 3.10 von dem Partialdruck von CO_2 und O_2 .

$$r_C = \frac{r_{C,max} \cdot c_{CO_2}}{c_{CO_2} + k_C \cdot \left(1 + \frac{c_{O_2}}{k_O}\right)} \cdot \frac{c_{RuBP}}{c_{RuBP} + k_{RuBP}} \quad (2.1)$$

2. Theoretische Grundlagen

$$r_O = \frac{r_{O,max} \cdot c_{O_2}}{c_{O_2} + k_O \cdot \left(1 + \frac{c_{CO_2}}{k_C}\right)} \cdot \frac{c_{RuBP}}{c_{RuBP} + k_{RuBP}} \quad (2.2)$$

Für eine Substratsättigung mit Ribulose-1,5-bisphosphat ($c_{RuBP} \gg k_{RuBP}$) kann die Kinetik vereinfacht werden, da der letzte Term gleich eins wird (Gleichungen 2.3 und 2.4). Die Michaelis-Konstante für Ribulose-1,5-bisphosphat liegt in C_3 -Pflanzen bei $k_{RuBP} = 25 \mu\text{mol/l}$.

$$r_C = \frac{r_{C,max} \cdot c_{CO_2}}{c_{CO_2} + k_C \cdot \left(1 + \frac{c_{O_2}}{k_O}\right)} \quad (2.3)$$

$$r_O = \frac{r_{O,max} \cdot c_{O_2}}{c_{O_2} + k_O \cdot \left(1 + \frac{c_{CO_2}}{k_C}\right)} \quad (2.4)$$

Das Verhältnis Φ von Carboxylierungsrate zu Oxygenierungsrate ist proportional zu dem Verhältnis der Konzentrationen bzw. Partialdrücke von CO_2 zu O_2 (Gleichung 2.5).

$$\Phi = \frac{r_C}{r_O} = \frac{r_{C,max} \cdot k_O}{r_{O,max} \cdot k_C} \cdot \frac{c_{CO_2}}{c_{O_2}} \quad (2.5)$$

Für die Beschreibung des Verhältnisses zwischen Carboxylierungs- und Oxygenierungsrate ist die Selektivität S nach Gleichung 2.6 definiert.

$$S = \frac{r_{C,max} \cdot k_O}{r_{O,max} \cdot k_C} \quad (2.6)$$

Die Selektivität der RuBisCO bezüglich CO_2 und O_2 ist in verschiedenen Organismen unterschiedlich. Aufgereinigte RuBisCO aus verschiedenen Organismen wurden von Jordan und Ogren [41] auf ihre Umsatzraten und die kinetischen Konstanten k_O und k_C untersucht. Hierbei wurde Ribulose-1,5-bisphosphat in einer solchen Konzentration vorgelegt, dass sie die Kinetik nicht limitiert ($c_{RuBP} = 0,4 \text{ mmol/l} \gg k_{RuBP}$). Für *C. reinhardtii* sind die Ergebnisse von Jordan und Ogren in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Die relativen Raten der Carboxylierungs- und Oxygenierungsrate nach den Gleichungen 2.3 und 2.4, normiert auf die maximale Umsatzrate $r_{C,max}$, sind in Abbildung 2.4a dargestellt.

Da *C. reinhardtii* die heterotrophe Kohlenstoff-Quelle Acetat nutzen kann, ist sie ein guter Modellorganismus für eine RuBisCO-Mutagenese. Es wurden viele Mutanten mit meist geringeren Selektivitäten erzeugt. Eine ausführliche Übersicht über die verschiedenen Mutationen gibt Harris [42]. Die Verbesserung der RuBisCO-Effektivität durch genetische Veränderungen

2. Theoretische Grundlagen

ist nur geringfügig möglich, da die RuBisCO im Rahmen des Reaktionsmechanismus schon optimal auf die Gas- und Temperaturbedingungen des jeweiligen Organismus angepasst ist [43].

Die Produkte der Reaktion, PGA für die Carboxylierung bzw. jeweils ein Molekül PGA

Tabelle 2.1.: Kinetische Konstanten aufgereinigter RuBisCO aus *C. reinhardtii*, nach Jordan und Ogren [44]

Kinetische Konstante	Wert	Einheit
k_C	2,90E-05	mol/l
k_O	4,80E-04	mol/l
$r_{C,max}/r_{O,max}$	3,7	—
Selektivität	61,2	(mol l)/(mol l)

und PG für die Oxygenierungsreaktion, stehen der weiteren Kohlenstofffixierung im Calvin-Benson Zyklus und der weiteren Photosynthese bzw. der Photorespiration zur Verfügung. Eine Beschreibung erfolgt in den folgenden Abschnitten.

Photosynthese und Kohlenstofffixierung

Die Carboxylierung von Ribulose-1,5-bisphosphat durch die RuBisCO leitet den ersten Schritt der Photosynthese ein. Die zwei entstehenden Moleküle 3-Phosphoglycerat werden durch eine Reihe hintereinandergeschalteter Reaktionen in dem Chloroplasten-Stroma wieder zu Ribulose-1,5-bisphosphat regeneriert. Die Reaktionsabfolge des Calvin-Benson-Zyklus ist in Abbildung 2.2 dargestellt. In der Abbildung sind die wichtigsten Zwischenprodukte aufgeführt sowie der Bedarf an Reduktionsäquivalenten und Energieträgern. Für die einzelnen Reaktionsschritte sei auf weiterführende Literatur verwiesen [45]. Ribulose-1,5-bisphosphat steht für eine erneute Reaktion mit der RuBisCO zur Verfügung. Der zusätzliche fixierte Kohlenstoff verlässt diesen Zyklus nach drei Carboxylierungen als ein Molekül Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP). Die aufzuwendende Energie für die Fixierung von Kohlenstoff wird mit dem in der Lichtreaktion gebildeten ATP und NADPH bereitgestellt (s. Abschnitt 2.1.3). Insgesamt werden pro fixiertem Kohlenstoffatom drei Mol ATP und zwei Mol NADPH in dem Calvin-Benson-Zyklus benötigt. Das gebildete Triose-Phosphat hat mehrere Funktionen in dem Stoffwechselweg der photosynthetischen Organismen. Neben dem Chloroplasten steht es durch Überführung mittels eines Phosphat-Transporters in den weiteren Kompartimenten

2. Theoretische Grundlagen

zur Verfügung. Die Kohlenhydrate werden in dem Chloroplasten zu Hexose und weiter zu Speicher- oder Struktur-Polysacchariden umgebaut [46]. Der fixierte Kohlenstoff wird zudem in einer Vielzahl von metabolischen Prozessen für den Anabolismus verwendet. Dabei dient das Triose-Phosphat als Grundbaustein der C-Gerüste für die Bildung von DNA/RNA und NADPH über den oxidativen Pentose-Phosphat-Zyklus oder kann über die Glycolyse und den Citrat-Zyklus zu weiteren Bausteinen umgesetzt werden [46, 47]. Hieraus werden weiter Proteine, Pigmente oder Lipide gebildet. Zudem ist das Triose-Phosphat Lieferant von Energie und Reduktionsäquivalenten für den Anabolismus außerhalb der Chloroplasten. Das in der Lichtreaktion gebildete ATP und NADPH stehen außerhalb der Chloroplasten durch ihre schnelle Umsatzrate nicht zur Verfügung [48, 47, 49]. Der Transport der Energie- und Reduktionsäquivalente aus der Lichtreaktion im Chloroplasten in die weiteren Kompartimente der Zelle ist daher nur indirekt über die gebildeten Zucker(-Vorstufen) möglich.

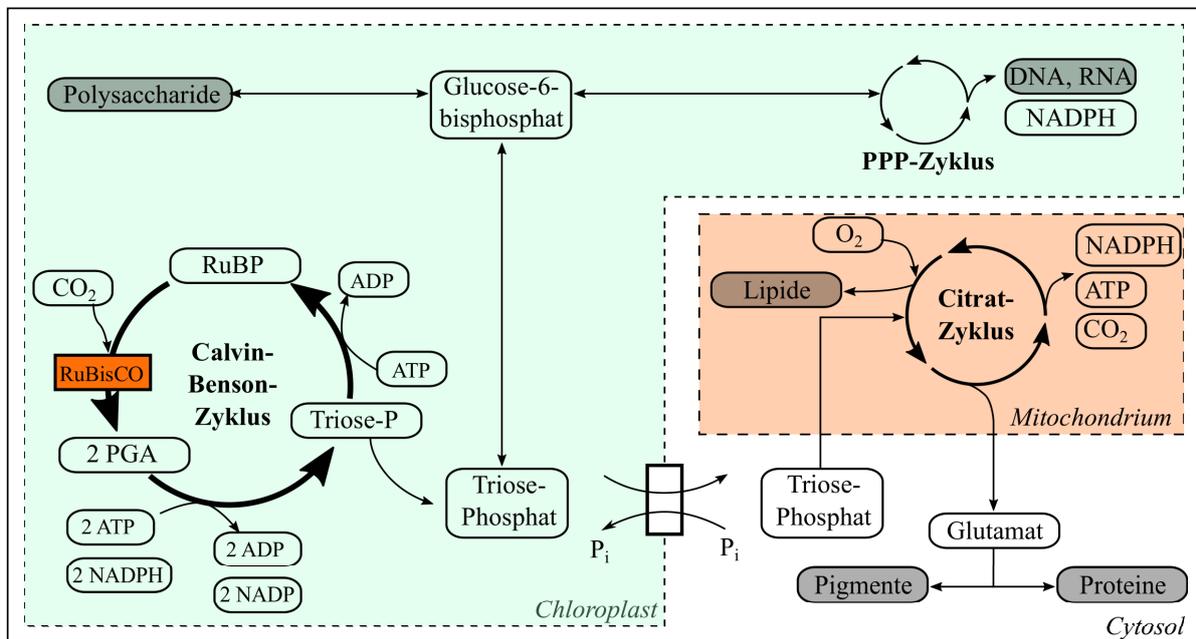


Abbildung 2.2.: Fixierung von CO₂ im Calvin-Benson-Zyklus. Gebildetes Triose-Phosphat (GAP) wird über einen Phosphat-Transporter aus dem Chloroplasten transportiert und so in weiteren Kompartimenten verfügbar gemacht. Hier wird es in verschiedenen Stoffwechselwegen für den Aufbau von funktionalen Makromolekülen (grau unterlegt) wie Polysacchariden, Lipiden, Proteinen, DNA und Pigmenten verwendet. Zudem dient es durch den aeroben Abbau der Gewinnung von Energieträgern und Reduktionsäquivalenten [46]. Aus [49, 50, 47].

Photorespiration

Die Reaktion von Ribulose-1,5-bisphosphat und O_2 führt zu der Bildung von einem Molekül 3-Phosphoglycerat und einem Molekül 2-Phosphoglycolat. Das 3-Phosphoglycerat wird über den Calvin-Benson Zyklus weiter verstoffwechselt (s. Photosynthese). Das 2-Phosphoglycolat kann entweder recycelt oder, im Fall von Mikroalgen exkretiert, werden [51, 52]. Das Recycling erfolgt über einen energieaufwendigen Stoffwechselweg in verschiedenen Zellkompartimenten des Organismus (s. Abbildung 2.3). Ein Enzym dieses Recyclingstoffwechsels ist die Glycolat-Dehydrogenase [53]. Dieses oxydiert das Glycolat zu Glyoxylat. In dem weiteren Verlauf des Recyclings wird das Glyoxylat aminiert und in die Zwischenstufe Glycin überführt. Das Glutamat wird dabei in α -Ketoglutarat überführt, welches dann im Chloroplasten zu Glutamat recycelt wird. Über die weiteren Zwischenstufen Serin und Hydroxypyruvat wird das Glycin zu Phosphoglycerat umgebaut. In der Nettobilanz werden zwei Moleküle Phosphoglycolat unter der Abspaltung eines Moleküls CO_2 zu einem Molekül Glycerat-3-Phosphat umgebaut. Letzteres kann wieder in den Calvin-Benson-Zyklus eingeleitet werden. Somit können 75 % des Kohlenstoffs recycelt werden. Für diese Reaktionen werden pro Stoffwechselfdurchgang zwei Moleküle NADPH und ein Molekül ATP benötigt [54]. Die Rate der Photorespiration wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Die Induktion des Metabolismus erfolgt über Faktoren wie Licht [54] und CO_2 [55] sowie über verschiedene Zwischenprodukte und die Verhältnisse von NADP/NADPH und ADP/ATP [56]. Spencer et al. hat das Potential des Glycolatrecyclings von *C. reinhardtii* näher untersucht [57, 51]. In den betrachteten Organismen wurde eine auf Chlorophyll a bezogene Recyclingrate zwischen 5 und $10 \mu\text{mol/h/mg}_{\text{Chl a}}$ gemessen. Der Mikroalge *C. reinhardtii* ist neben dem Recycling auch die Exkretion des Phosphoglycolats möglich. Dies erfolgt durch entsprechende Transportmechanismen [58]. Während der Exkretion des Phosphoglycolats wird der Phosphatrest durch das Enzym P-Glycolat-Phosphatase abgespalten.

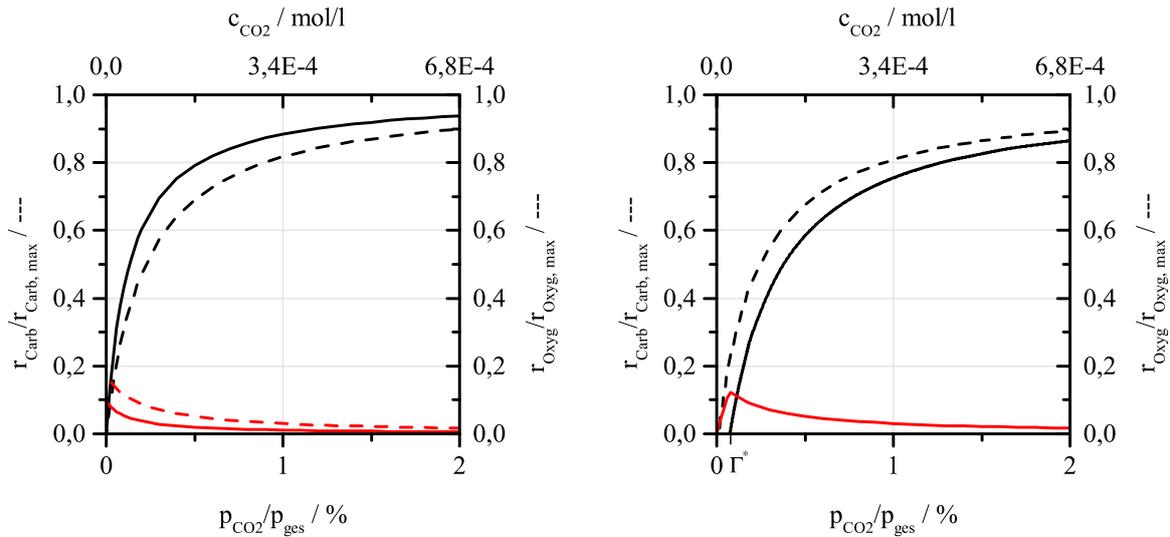
Die Oxidation der Ribulose, der dadurch entstehende Verlust an schon assimiliertem Kohlenstoff sowie das energieaufwendige Recycling mindern die photosynthetische Effizienz des Organismus. Insbesondere durch die Bedeutung in der Agrarwirtschaft wird an einer Verbesserung der RuBisCO geforscht [30, 25].

2.1.2. Die *in situ* RuBisCO-Reaktion

Die kinetischen Konstanten der Oxygenierungs- und Carboxylierungsreaktion für die aufgereinigte RuBisCO wurden von Jordan und Ogren [44] eingehend untersucht. Abbildung 2.4a

2. Theoretische Grundlagen

nach den vereinfachten Gleichungen 2.7 und 2.8. In Szenario 1 wurde von einer vollständigen Exkretion des Glycolats ausgegangen. Damit reduziert sich die C-Assimilierungsrate für das Wachstum etc. um 2 Mol Kohlenstoff pro Zeiteinheit und gebildetem Glycolat. In dem zweiten Szenario wurde von einem vollständigen Recycling des Glycolats ausgegangen, d.h. 75% des Kohlenstoffs kann wieder dem Calvin-Zyklus zur Verfügung gestellt werden und 25% werden als CO_2 freigesetzt. Der CO_2 -Partialdruck, bei dem $r_{\text{Carb}} = 0$ gilt, wird mit Γ^* bezeichnet [59]. Bei vollständiger Exkretion von Glycolat erreicht die Glycolatbildungsrate ein Optimum,



(a) Bildungsraten aufgereinigter RuBisCO.

(b) Bildungsraten Gesamtorganismus.

Abbildung 2.4.: (a) Auf $r_{C,max}$ normierte (—) Carboxylierungs- und (—) Oxygenierungsrate für die aufgereinigte RuBisCO für (—) $p_{\text{O}_2}/p_{\text{ges}} = 20\%$ bzw. (- -) 60% . (b) Auf $r_{C,max}$ normierte C-Assimilierung in Form von GAP bzw. Glycolatexkretion berechnet für die *in situ* RuBisCO-Kinetik für die zwei Szenarien des (- -) vollständigen Recyclings von Glycolat (keine Glycolatexkretion) bzw. der (—) vollständigen Glycolatexkretion jeweils bei $p_{\text{O}_2}/p_{\text{ges}} = 60\%$.

bei dem die Carboxylierungsrate doppelt so hoch ist wie die Oxygenierungsrate. Dies entspricht der Stöchiometrie der Glycolatbildung. Für höhere CO_2 -Partialdrücke überwiegt die Carboxylierung. Der fixierte Kohlenstoff steht dem Organismus in Form von GAP zur Verfügung und wird für die Biomassebildung genutzt. Bei geringeren CO_2 -Partialdrücken steht nicht genügend Kohlenstoff für die Glycolatbildung zur Verfügung. Die Fixierung von Kohlenstoff, in Form von GAP, ist unter einem CO_2 -Partialdruck von $0,052\%$ (bzw. $0,075\%$) des Gesamtdrucks gleich Null für den Fall der vollständigen Exkretion und einem O_2 -Partialdruck von 42% (bzw. 60%) des Gesamtdrucks. Für den Fall der vollständigen Exkretion ist hierbei $\Gamma^* = 0,013\%$ (bzw. $0,019\%$) des Gesamtdrucks. Ein Erhaltungsstoffwechsel des Organismus

oder ein Recycling des Glycolats wurde bei den Berechnungen nicht berücksichtigt.

2.1.3. Die Lichtreaktion

Chemische Energieträger und Reduktionsäquivalente für das photoautotrophe Wachstum werden durch die Umwandlung von Lichtenergie bereitgestellt. Eingestrahle Photonen werden von Chromophoren absorbiert. In eukaryotischen Mikroalgen sind dies Chlorophyll a und b sowie Carotinoide [60]. Die meisten Chromophore liegen im Organismus an Proteine assoziiert vor und bilden Antennenpigmente. Mehrere Pigmente bilden zusammen einen Antennenkomplex. Dadurch wird der Absorptionsquerschnitt und der absorbierbare Wellenlängenbereich vergrößert [49]. Die absorbierte Energie kann von einem Pigmentmolekül zum nächsten übertragen und an ein Reaktionszentrum weitergegeben werden. Pigmentmoleküle und Reaktionszentrum bilden die Photosysteme I und II, welche zusammen mit den Cytochrom b_6f -Komplex in der Thylakoidmembran enthalten sind. Abbildung 2.5 zeigt den Mechanismus der Lichtreaktion. Im Photosystem II (PSII) wird die Lichtenergie auf Elektronen unter Spaltung von Wasser übertragen [61]. Diese Reaktion wird durch einen Mangankomplex katalysiert. Als Reaktionsprodukte entstehen neben den frei werdenden Elektronen entsprechend Protonen und Sauerstoff. Die Elektronen werden in einer Reaktionskaskade über verschiedene Proteinkomplexe auf das Photosystem I (PSI) übertragen. Von dem PSI können die Elektronen zum einen auf NADP übertragen werden und dieses zu NADPH reduzieren. Letzteres kann im Chloroplasten als Reduktionsäquivalent genutzt werden. Dieser Pfad wird als nicht-zyklischer Elektronentransportweg bezeichnet. Weiterhin können die Elektronen zwischen dem PSI und dem PSII zirkulieren (sog. zyklischer Elektronentransportweg) [49, 47]. Durch diesen zyklischen Elektronentransport wird ein Protonengradient aufgebaut. Das chemische Potential des Protonengradienten aus der Wasserspaltung und dem zyklischen Elektronentransport kann die ATP-Synthase für die Generierung von ATP nutzen. Ob für die Regenerierung eines ATP-Moleküls drei oder vier Protonen benötigt werden, ist Gegenstand gegenwärtiger Forschung und wird in der Literatur intensiv diskutiert [63, 64]. Das stöchiometrische Verhältnis von Photonen zu gebildetem ATP ist zudem abhängig von der Zirkulation des Elektrons zwischen den Photosystemen. Weitere Stoffwechselwege, wie etwa die Übertragung von Elektronen vom PSI auf Sauerstoff in der Mehler-Reaktion [65] oder die Übertragung der Elektronen auf den Cytochrom-c-Komplex (Q-Zyklus) ermöglichen eine Anpassung der ATP-Ausbeute pro Photon. Eine Übersicht der stöchiometrischen Verhältnisse von Photonen zu der Bildung von ATP und NADPH ist in Tabelle 2.2 gegeben. Die Aufteilung der Elektronenflussrate in zyklischen und nichtzyklischen Transport kann aktiv von der Zelle dem jeweiligen Bedarf von Redukti-

2. Theoretische Grundlagen

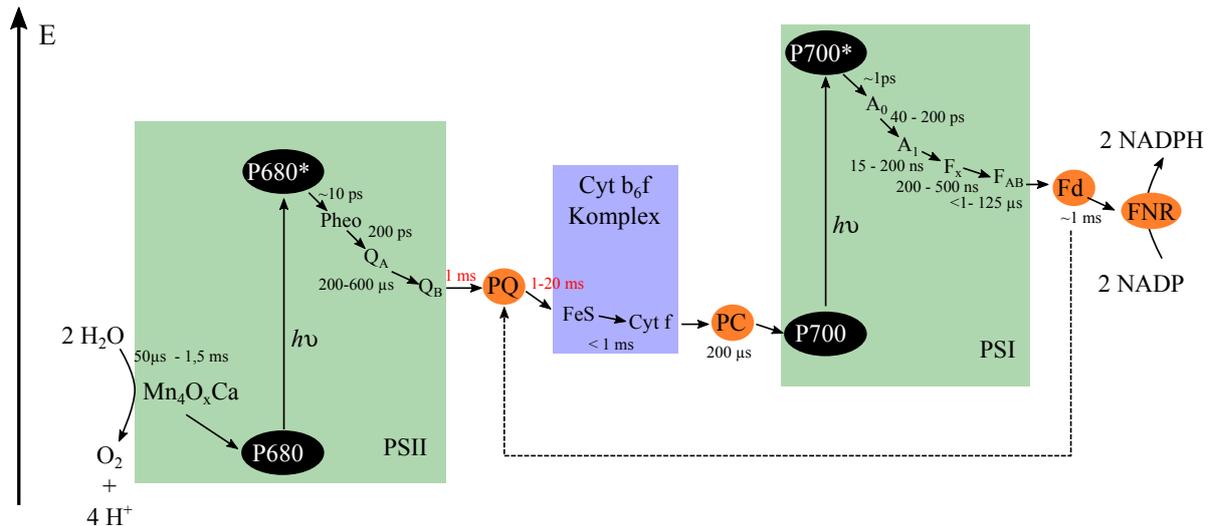


Abbildung 2.5.: Flussdiagramm der Elektronen über die Proteinkomplexe und Cofaktoren, die in den (—) linearen und (- -) zyklischen Elektronentransport involviert sind. Schematisch dargestellt ist das Redox-Potential E . Angeregte Elektronen werden über die Proteinkomplexe Phäophytin (Phe), Plastocyanin in verschiedenen Konformationen (Q_A , Q_B , PQ), Plastocyanin (PC), einen Eisen-Schwefel-Komplex (FeS) und Cytochrom f von PSII zu PSI übertragen. Aus dem angeregten Zustand von PSI erfolgt die Übertragung über einen primären Akzeptor (A_0) Phyllochinon (A_1), Eisen-Schwefel-Zentren (F_X , F_{AB} auf Ferredoxin (Fd) und anschließend mit Hilfe der Ferredoxin-NADP-Reduktase (FNR) auf NADPH. Aus Govindjee [62]

onsäquivalenten und ATP angepasst werden [66, 67, 68]. Im Falle einer CO_2 -Limitierung wird etwa der lineare Elektronentransport reduziert und der zyklische Transport induziert [69].

Neben der photochemischen Nutzung absorbierter Photonen können diese von dem Photosystem nichtphotochemisch gequencht (NPQ) werden. Die Energie kann dabei durch Dissipation von Wärme, Fluoreszenz oder einem Photonenshift von PSII zu PSI abgeführt werden. Nichtphotochemisches Quenchen dient durch die Dissipation überschüssiger Energie dem Schutz der Photosysteme vor photochemischer Schädigung [70]. Ein Vergleich der Reaktionszeiten in Abbildung 2.5 zeigt, dass die Übertragung des Elektrons von dem Akzeptor Q_B auf den Cytochrom- b_6f -Komplex mit Zeiten im Millisekunden-Bereich ein Bottleneck in der Elektronentransportkette ist. Solange die Elektronenakzeptoren reduziert sind und somit keine weiteren Elektronen aufnehmen können, ist das Reaktionszentrum von PSII geschlossen und weitere eingestrahelte Photonen führen zu längerwelliger Fluoreszenz [62, 71]. Die Messung der Ausbeute von prozessierten zu als Fluoreszenz abgestrahlten Photonen lässt somit Rückschlüsse auf die photosynthetische Aktivität der Zelle zu [72]. Mittels PAM-Analytik (Pulsamplitudenmodulation) lässt sich dieses Verhältnis bestimmen. Bei dieser Methode wird das Photosystem mit kurzen Pulsen eines Messlichtes im μ -Sekunden-Bereich angeregt und

2. Theoretische Grundlagen

Tabelle 2.2.: Stöchiometrie zwischen absorbierten Photonen, transportierten Elektronen und gebildetem NADPH bzw. ATP für verschiedene Elektronentransportwege unter Annahme von 3 Mol H⁺ pro Mol ATP, nach von Caemmerer [40].

Elektronentransport	e⁻/Photon	ATP/Photon	NADPH/Photon
Nichtzyklisch	2/4	1,33/4	1/4
Nichtzyklisch + Q-Zyklus	2/4	2/4	1/4
Zyklisch	4/4	1,33/4	0
Zyklisch + Q-Zyklus	4/4	2,66/4	0

die längerwellige Fluoreszenzantwort F_t gemessen. Werden durch einen Sättigungspuls im Millisekunden-Bereich mit sehr hoher Lichtintensität alle Reaktionszentren geschlossen, so kann die maximale Fluoreszenzantwort F_m' des Systems gemessen werden. Die Ausbeute des Photosystems II (YII) wird nach Gleichung 2.9 berechnet.

$$Y_{II} = \frac{F_m' - F_t}{F_m'} \quad (2.9)$$

Aus der Photonenausbeute und der photosynthetisch aktiven Photonenflussrate (PAR) kann die Elektronentransportrate ETR berechnet werden. Hierbei wird durch den Faktor 0,5 die Aufteilung der Photonen auf PSI und PSII berücksichtigt.

$$ETR = 0,5 \cdot Y_{II} \cdot I_{PAR} \quad (2.10)$$

Für Algen korreliert im lichtlimitierten Bereich die gemessene Elektronentransportrate mit der Photosyntheserate, also der Produktion von Sauerstoff bzw. der Fixierung von CO₂, linear [73]. Bei höheren Lichtintensitäten ist dieser Zusammenhang bei Algen nicht mehr gegeben und das Verhältnis wird nichtlinear. Zyklischer Elektronentransport, Mehler-Reaktion etc. führen zu höheren Elektronentransportraten und schlechteren Ausbeuten von NADPH und ATP pro Photon. Zudem kann es durch eine Stickstoff-Reduktion oder weitere Elektronen-Senken zu einer Verschiebung des zyklischen Elektronentransports kommen. Auch photorespiratorische Bedingungen führen zu einer Abweichung der erwarteten Sauerstoffproduktion bzw. Kohlenstofffixierung. Gilbert et al. vergleicht für CO₂-gesättigte Bedingungen (reine Photosynthese) die Sauerstoffproduktion mit der gleichzeitig gemessenen Fluoreszenz [73]. Ein ausgewählter Modellansatz bestätigt, dass durch die Fluoreszenzmessung eine Bestimmung des Lichtkompensationspunktes I_k und der Lichtsättigungsintensität I_{sat} und der maximalen

2. Theoretische Grundlagen

Sauerstoffproduktion $P_{O_2,max}$ möglich waren (siehe hierzu analog Abbildung 2.7a). Für die Grünalge *Chlorella vulgaris* beträgt der relative Fehler für die maximale Sauerstoffproduktion $P_{O_2,max}$ zwischen den verschiedenen Bestimmungsarten 20 %.

Im Falle einer CO_2 -Limitation wurde ein erhöhtes nichtphotochemisches Quenchen festgestellt [74, 69]. Auch Mutanten der Alge *C. reinhardtii*, die eine verringerte RuBisCO-Aktivität haben, zeigen eine erhöhte Fluoreszenz [75].

2.1.4. Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismen

Die RuBisCO ist in Bezug auf ihre maximale Carboxylierungsrate ein verhältnismäßig langsames Enzym [43]. Weiter verringert wird die Carboxylierungsrate durch die Konkurrenzreaktion von CO_2 und O_2 mit einer geringen Spezifität für CO_2 . Der Michaelis-Menten-Konstante der RuBisCO $k_C = 2,9 \cdot 10^{-4}$ mol/l (s. Tabelle 2.1) steht ein momentan relativ geringer atmosphärischer CO_2 -Anteil von 0,038 % (v/v) bzw. $1,29 \cdot 10^{-5}$ mol/l Gleichgewichtskonzentration gegenüber. Die geringe Spezifität zu CO_2 und die geringe maximale Umsatzgeschwindigkeit führen zu einer geringen Carboxylierungsrate der RuBisCO bei atmosphärischem CO_2 -Partialdruck [43]. Maximale Wachstumsraten von Wildtypalgen sind hingegen schon bei wesentlich geringeren CO_2 -Konzentrationen von $2 \cdot 10^{-6}$ mol/l möglich [76, 77]. Um dies zu erreichen wird die intrazelluläre Konzentration an CO_2 durch unterschiedliche Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismen (CCM) der Alge erhöht [78, 79]. In *C. reinhardtii* wird anorganischer Kohlenstoff in Form von HCO_3^- und CO_2 durch aktiven Transport, unter Aufwendung von Energie, aus der Umgebung aufgenommen [80]. Unterstützt wird diese Funktion von Carboanhydrasen. Diese Enzyme beschleunigen die reversible Reaktion von HCO_3^- zu CO_2 . In *C. reinhardtii* sind 12 Isoformen der Carboanhydrasen bekannt, die in unterschiedlichen Organellen lokalisiert sind [81, 82]. Weiter unterstützt wird die Anreicherung des CO_2 um die RuBisCO durch den pH-Wert des jeweiligen Zellkompartiments [83]. Höhere pH-Werte im Chloroplasten-Stroma bewirken eine Verlagerung des CO_2/HCO_3^- -Gleichgewichts in Richtung höherer HCO_3^- -Konzentrationen. Geringere pH-Werte in dem Thylakoid, in dem die H^+ -Konzentration infolge der Lichtreaktion hoch ist, sorgen für ein geringes Verhältnis der Konzentrationen von CO_2/HCO_3^- . Das CO_2 kann durch die Thylakoid-Membran diffundieren und steht der RuBisCO-Reaktion zur Verfügung. Dieser Mechanismus funktioniert am besten, wenn in dem Chloroplasten keine Carboanhydrasen aktiv sind [52]. Die CCMs werden durch verschiedene Mechanismen reguliert, wie der Verfügbarkeit von CO_2 , Nährstoffen und Licht [84, 85].

Es wurden unterschiedliche Mutationen der CCMs in *C. reinhardtii* generiert. Die Eigenschaft

2. Theoretische Grundlagen

des heterotrophen Wachstums von *C. reinhardtii* mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle ist hierbei vorteilhaft. Die Mutationen können die Regulation der Genexpression betreffen (z.B. *C. reinhardtii* CIA 5) [86] oder die Funktion eines Proteins stören (z.B. *C. reinhardtii* CC1860) [87]. Ihnen ist gemein, dass sie eine geringere Photosyntheserate und damit ein verringertes Wachstum bei geringen CO₂-Partialdrücken aufweisen als Algen des Wildtyps [88].

2.2. Mikroalgen als Quelle erneuerbarer Energien

Die Biomasse von Mikroalgen ist ein vielversprechender Ausgangsstoff für erneuerbare Energien [15, 12, 89, 90, 91, 92]. Durch den Einsatz geschlossener Reaktorsysteme ist die Kultivierung der Algen auch auf Flächen möglich, die etwa aufgrund von Wasserknappheit oder Bodenbeschaffenheit landwirtschaftlich nicht nutzbar sind. So steht die energetische Nutzung der Algen nicht in Konkurrenz zu der Produktion von Nahrungsmitteln. Die Gewinnung von Biomasse aus Mikroalgen ist, verglichen mit der Gewinnung aus höheren Landpflanzen, mit einem höheren Wirkungsgrad möglich. Für höhere C₃-Pflanzen beträgt der Wirkungsgrad 4,6 % und für C₄-Pflanzen 6 % [93]. Ein energetisches Nutzungspotential der Mikroalgen ist beispielsweise die Produktion von Biodiesel, Ethanol und Biogas.

2.2.1. Konstruktive und prozesstechnische Anforderungen an Photobioreaktoren

Bioreaktoren sind abgegrenzte Reaktionsräume, in denen mit Hilfe eines Biokatalysators eine Stoffumwandlung stattfindet. Nach dieser Definition kann in kleinem Maßstab die Zelle als so ein Reaktionsraum angesehen werden [94]. Die technische Betrachtung eines Bioreaktors ergibt eine Untergliederung in drei Phasen: Das Medium als Flüssigphase, die Zellen als Feststoff und die Gasphase [14]. Der Transport von gelösten Nährstoffen zu den Zellen findet über die Flüssigphase statt. Die Zu- und Abfuhr von CO₂ bzw. O₂ erfolgt über einen Stoffübergang zwischen der Gas- und der Flüssigphase. Dies setzt einen hohen Massentransfer voraus. Um weitere Prozessparameter wie z.B. Temperatur und pH-Wert einzustellen, sind zudem ein guter Wärmeübergang und eine ausreichende Durchmischung notwendig. Bei der Kultivierung von photoautotrophen Organismen (Algen) werden im Gegensatz zur Kultivierung heterotropher Organismen die Kohlenstoffquelle (CO₂) und die Energiequelle (Photonen) dem Reaktor

2. Theoretische Grundlagen

getrennt zugeführt. Ein weiteres Auslegungskriterium ist das durch Absorption und Streuung entstehende Lichtfeld in dem Reaktor und die in Folge der Durchmischung pro Alge entstehenden Hell-Dunkel-Zyklen [95, 96]. Die Auslegung eines Reaktors muss daher unter Beachtung der Fluidodynamik, des Lichtfeldes und der Reaktionskinetik des Organismus erfolgen (Abbildung 2.6).

Die Ausbildung eines Lichtgradienten innerhalb des Reaktors bildet eine besondere Heraus-

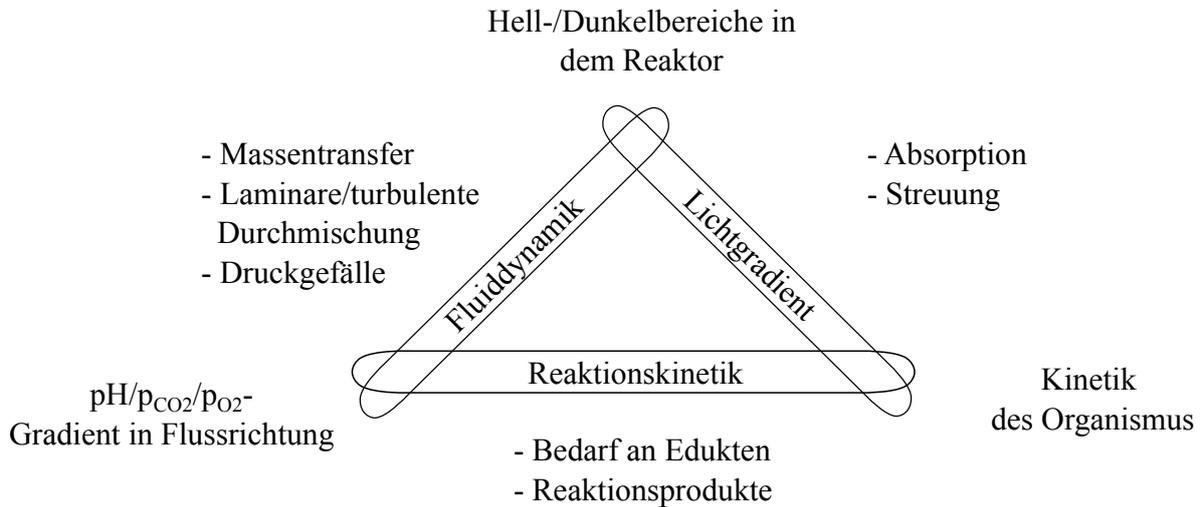


Abbildung 2.6.: Für die optimale Produktion im Reaktor muss der Organismus mit den notwendigen Edukten und mit Energie versorgt werden. Dies kann nur unter Beachtung der Fluidodynamik, des Lichtgradienten und der Reaktionskinetik erfolgen. Diese ist in den jeweiligen Schnittpunkten durch Interaktion von Organismus und Reaktor begrenzt.

forderung bei der Konstruktion von Photobioreaktoren. Reaktorbereiche mit zu hoher oder zu geringer Lichtintensität führen zu verringerten Produktionsraten in einzelnen Volumenelementen. Aus der Kinetik des Photosystems (s. Kapitel 2.1.3) und den enzymatischen Stoffumsätzen in der Alge (s. Kapitel 2.1.1) ergibt sich eine prozessrelevante Wachstumsrate. Diese ist als Funktion der Lichtintensität in der sogenannten PI-Kurve in Abbildung 2.7a dargestellt. Diese Auftragung zeigt die Wachstumsrate der photoakklimatisierten Alge im quasistationären Zustand in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Diese Wachstumsrate des gesamten Organismus kann in Modellreaktoren ermittelt werden [27]. Eine alternative Betrachtung der PI-Kurve erfolgt durch die Aufnahme kurzzeitiger Änderungen wie etwa der Fluoreszenz oder der Sauerstoffproduktion [73]. Die Lichtabhängigkeit des Wachstums in Abbildung 2.7a gliedert sich in drei Bereiche. Eine geringe Lichtintensität führt zu einem geringen Wachstum aufgrund von Lichtlimitation (Bereich 1 in Abbildung 2.7a). Der Energieeintrag durch Photonen limitiert in diesem Bereich das Biomassewachstum. Eine Lichtintensität unterhalb des Lichtkompensationspunkts I_k kann durch Veratmung von Biomasse auch zu einem negativen

2. Theoretische Grundlagen

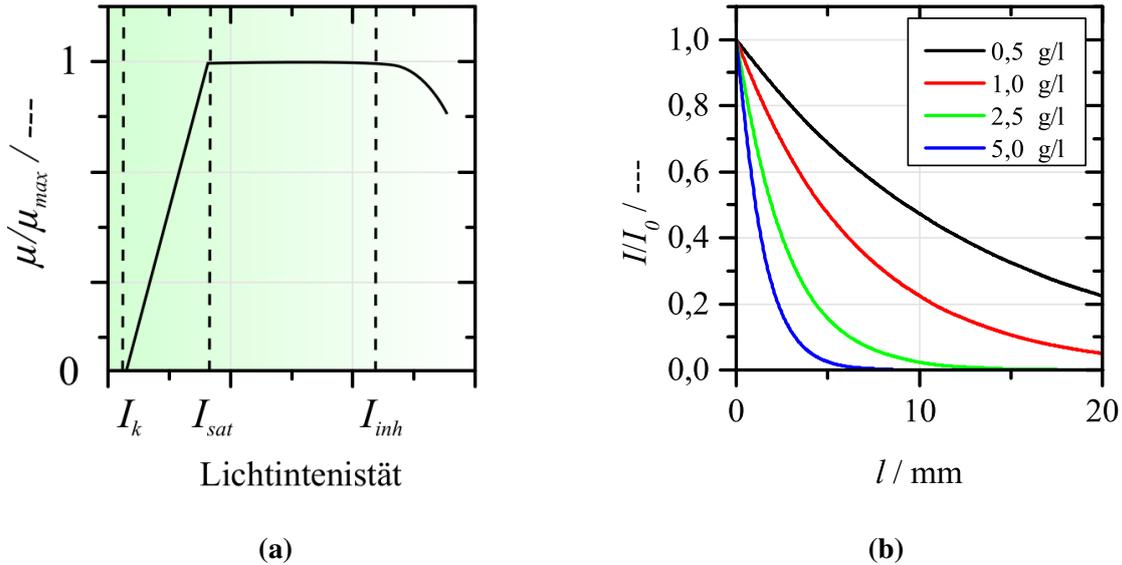


Abbildung 2.7.: (a) Wachstumsrate des photoakklimatisierten Organismus in Abhängigkeit von der Lichtintensität (PI-Kurve) mit den charakteristischen Lichtintensitäten I_k Lichtkompensationspunkt, I_{sat} Sättigungsintensität, I_{inh} minimale inhibierende Lichtintensität. (b) Lichtprofil über die Reaktortiefe l , berechnet für einen rechteckigen Querschnitt nach Gleichung 2.11 für verschiedene Biomassekonzentrationen c_X .

Wachstum der Kultur führen. Bei Lichtsättigung, I_{sat} , sind die der Lichtreaktion nachfolgenden enzymatischen Reaktionen der Dunkelreaktion limitierend für die maximale Wachstumsrate (Bereich 2 in Abbildung 2.7a). Zusätzlich eingestrahelte Photonen werden von dem Photosystem in Form von Fluoreszenz dissipiert. Eine Schädigung des Photosystems oberhalb einer zu hohen inhibierenden Lichtintensität I_{inh} kann zu der Verringerung der Produktivität des Reaktors bzw. zu einer verringerten Wachstumsrate führen (Photoinhibition, Bereich 3 in Abbildung 2.7a) [6]. Die Lichtverteilung innerhalb eines Photobioreaktors ist abhängig von der Zelldichte und der Weglänge des Lichts durch die Suspension. Durch einen für Streulicht und Absorption adaptierten Ansatz nach Lambert-Beer (Gleichung 2.11) kann dieser Zusammenhang beschrieben werden [6, 97, 27].

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\epsilon \cdot c_X \cdot l} \quad (2.11)$$

Mit der einstrahlenden Lichtintensität I_0 , der Lichtintensität I bei einer Reaktortiefe von l sowie dem adaptierten Absorptionskoeffizienten ϵ und der Biomassekonzentration c_X . Der Abfall der Lichtintensität über die Reaktorlänge ist in Abbildung 2.7b für einen rechteckigen Reaktorquerschnitt und verschiedene Biomassekonzentrationen aufgetragen. Der optima-

2. Theoretische Grundlagen

le Betriebspunkt eines Reaktors für die maximale Photonenausbeute in Form von Biomasse ist die Lichtintensität I_{sat} in Abbildung 2.7a. Der Betrieb des Reaktors mit dieser Lichtintensität setzt ein möglichst homogenes Lichtfeld voraus. Verschiedene Ansätze für die optimale Verteilung von Licht im Reaktor, etwa durch die Anpassung der Reaktorgeometrie [98, 99, 100] oder Vorkehrungen für die Beleuchtung des Reaktorinneren, werden in der Literatur beschrieben. Praktische Ansätze des zweiten genannten Aspekts sind die aktive Beleuchtung durch eine Lichtquelle [101] oder eine passive Lichtverteilung durch transparente Einbauten [102]. Durch die Nutzung transparenter Glasschwämme konnte eine Erhöhung der maximalen spezifischen Wachstumsrate und der PCE nachgewiesen werden [102].

2.2.2. Der Wirkungsgrad von Photobioreaktoren

Die Betrachtung des Wirkungsgrads von mikroalgenbasierten Prozessen erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Zum einen muss das photosynthetische Potential der Mikroalge optimal ausgenutzt werden (s. PI-Kurve Abschnitt 2.2.1). Zum anderen muss die technische Realisierung des Reaktors eine möglichst geringe Betriebsenergie gewährleisten und trotzdem die physiologischen Anforderungen der Mikroalge bestmöglich erfüllen, um weitere Limitierungen zu vermeiden. Zur Beurteilung verschiedener Reaktorkonzepte dient die Photonenkonzersionseffizienz (PCE). Die PCE ist nach Gleichung 2.12 definiert und somit der Quotient aus der in Form von Biomasse gebundenen Energie E_X und der eingestrahltten Lichtenergie E_{Ph} .

$$PCE = \frac{E_X}{E_{Ph}} \quad (2.12)$$

Die Differenz zwischen der eingestrahltten Energie E_{Ph} und der in Biomasse gebundenen Energie E_X entsteht durch biologische und technische Verluste. Zur Erörterung der maximalen PCE von Mikroalgen bzw. der Reaktoren werden die einzelnen Wirkungsgrade der Umwandlung von Lichtenergie in die chemische Energie der Biomasse im Folgenden entsprechend biologischer und technischer Aspekte aufgeteilt. Abbildung 2.8 verdeutlicht dies. Die Werte wurden den Veröffentlichungen von Tredici [6] und Langner [103] entnommen. Von den Algen kann nur ein Teil der eingestrahltten Energie des gesamten solaren Spektrums umgesetzt werden. Von dem gesamten globalen Sonnenlichtspektrum (entsprechen 100 %) können Algen mit ihren Chromophoren nur 45 % der Photonen des Gesamtspektrums absorbieren (s. Abschnitt 2.1.3 oder [6]). Von diesen 45 % der Gesamtenergie kann nur ein Teil der Energie auf Elektronen übertragen werden (s. Abschnitt 2.1.3). Grund hierfür ist der diskrete Energiebedarf der Reaktionszentren für die Anregung von Elektronen. Werden Photonen

2. Theoretische Grundlagen

mit höherem Energiegehalt absorbiert, so wird die restliche Energie entweder als Fluoreszenz abgestrahlt oder durch komplexe Zusammenhänge auf Photonen niedrigerer Energie übertragen. Hierdurch entsteht ein Verlust von 21 % des absorbierten Lichts [6]. Der Wirkungsgrad der Energieübertragung von Photonen auf Elektronen beträgt somit 35,6 % bezogen auf die gesamte eingestrahlte Energie. Neben Energieverlusten in der Absorption der Photonen treten auch energetische Verluste bei der Bildung neuer Biomasse auf. So liegt der Wirkungsgrad für deren Bildung in einem Bereich von etwa 35 % der absorbierten Lichtenergie [6]. Der theoretische Wirkungsgrad für die Biomassebildung beträgt unter Einbeziehung der genannten Verluste maximal 12,4 % J_X/J_{Photon} bezogen auf das eingestrahlte solare Spektrum. Langner verfolgt einen anderen Ansatz zur Berechnung der *PCE* und erhält geringere Werte [103, 104]. Von der absorbierten Strahlung (hier 100 %) werden in seiner Rechnung 35 % als Fluoreszenz, 29 % durch alternative Elektronensenken und 14 % durch Respiration dissipiert. Somit können für die Biomassebildung nur 22 % der absorbierten Photonen bzw. 9,9 % des gesamten solaren Spektrums genutzt werden. Neben dem maximalen biologischen Wirkungsgrad treten zudem Verluste auf der technischen Seite des Prozesses auf [6]. Auf der Ebene des Reaktors kommt es beispielsweise zu der Reflexion von Licht. Weiterhin führt ein starker Lichtgradient entsprechend der PI-Kurve in Abbildung 2.7a zu verringerten Wirkungsgraden durch eine erhöhte Fluoreszenz oder gar eine Photoinhibition in den Bereichen hoher Lichtintensität oder durch eine erhöhte Respiration in Dunkelbereichen. Um eine möglichst hohe *PCE* zu erzie-

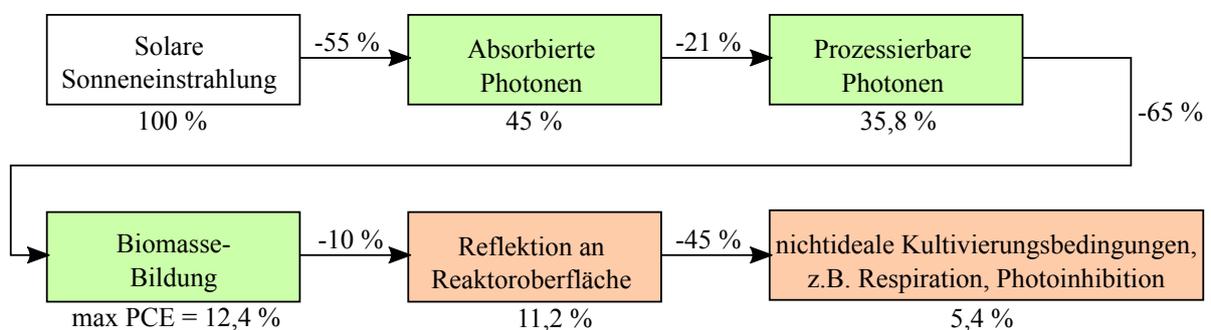


Abbildung 2.8.: Wirkungsgrade von der solaren Einstrahlung bis zur Biomasse. Die Werte sind entnommen aus [105]. Grün: Organismusbedingte Verringerung des Wirkungsgrads, Rot: Reaktorbedingte Verringerung des Wirkungsgrads.

len, wurden für die Produktion von Biomasse viele verschiedene Photobioreaktor-Konzepte vorgeschlagen. Diese zeichnen sich durch verschiedene Geometrien und Betriebsarten, insbesondere bei der Begasung und der Durchmischung, aus. Für die Kultivierung in Suspension sind die häufigsten geschlossenen Reaktortypen Platten-, Ring- oder Rohrreaktoren [14]. Weit verbreitet ist zudem das offene Reaktorkonzept des offenen Beckens („Open-Pond“).

2. Theoretische Grundlagen

Bei dem Plattenreaktor wird durch eine Blasenbegasung sowohl die Durchmischung als auch die Begasung realisiert [106, 107]. In Rohrreaktoren wird die Durchströmung entweder durch eine reine Blasenbegasung in einem separaten Riser [108, 109] oder durch eine Pumpe erzeugt [110, 107]. In einem Open-Pond wird mittels einer Paddel-Konstruktion die Flüssigkeit zirkuliert [6]. Die Begasung erfolgt zumeist nur über die Oberfläche des Beckens. Typische Oberfläche- zu Volumenverhältnisse der Reaktoren sowie Daten zur Produktivität und zum Wirkungsgrad sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Neben der Kultivierung in Suspensionen rückt eine Kultivierung von Algen in Biofilmen

Tabelle 2.3.: Typische Kenngrößen (PCE, Biomassekonzentration, Biomasse pro m^2 , volumenbezogene und flächenbezogene Produktivität, Oberfläche zu Volumenverhältnis des Reaktors) für Reaktortypen, die dem Stand der Technik entsprechen. Die Daten sind aus der Literatur entnommen [111, 112, 107, 106, 113, 114, 115, 116]

Kennzahl	Einheit	Flat Panel	Rohrreaktor	Open-Pond	Biofilmreaktor
PCE	%	1,3-6,5	1,4-6,9	1-3	1
c_X	g/l	1,7	2,1	0,3	—
$m_{x,A}$	g/m ²	28,5 - 170	11,7 - 95,5	30 - 130	10 - 80
$P_{X,V}$	g/l/d	0,27-4,3	0,25-6,64	0,04-2,5	—
$P_{X,A}$	g/m ² /d	19-72	19-130	11-27	12 - 20
A/V	m ² /m ³	10-83	22-179	2,3-10	—

zunehmend in den Fokus gegenwärtiger Untersuchungen [114, 116, 115, 117]. Hierbei muss zwischen der axenischen Bildung von Mikroalgen-Biofilmen und der Bildung von gemischten Biofilmen aus Bakterien und Algen unterschieden werden [118]. In Letzterem sind die Algen in einer extrazellulären Matrix aus Proteinen und Kohlenhydraten, die durch Bakterien zur Etablierung von Biofilmen gebildet wird, eingeschlossen. Die genauen Ursachen für die Bildung axenischer Mikroalgen-Biofilme sind Gegenstand aktueller Forschung. Die Ursachen sind vielfältig und reichen von den Eigenschaften des Kultivierungsmediums (Nährstoffkonzentration, pH), den Materialeigenschaften des Reaktors und Kultivierungsparametern (Lichtintensität) bis zu dem Alter und der Art der Kultur [119]. Zur Untersuchung der Biofilme werden rein empirische Ansätze wie die Betrachtung unterschiedlicher Materialien, des pH-Werts oder der Algen-Spezies [119, 120], aber auch theoretische Ansätze wie die Berechnung von hydrophoben und elektrostatischen (Zeta-Potential) Wechselwirkungen [121, 122, 123] verfolgt. Technisch interessant ist der Einsatz von Biofilmen durch die erreichbaren hohen Biomassekonzentrationen. Hiermit verbundenen ist eine energetische Einsparung

2. Theoretische Grundlagen

durch die Reduktion der Pumpleistung und des Aufwandes der Abtrennung. Insbesondere bei Prozessen, in denen die Biomasse nicht geerntet werden muss, ist der Einsatz von Biofilmen von Vorteil. Hierzu gehören Prozesse, bei denen das Produkt extrazellulär vorliegt und so aus dem Reaktor ausgewaschen werden kann [124] oder die Aufreinigung von Abwässern, mit denen der Biofilm überströmt wird [125, 126, 127]. Durch die Entwicklung spezieller Ernte-technologien können Biofilme aber auch für die Produktion von Biomasse eingesetzt werden [128, 115]. Durch den verringerten Leistungseintrag ist der Einsatz von Biofilmen interessant für Reaktortechnologien mit einer positiven energetischen Gesamtbilanz wie etwa im Bereich der Biokraftstoffe [120]. Technische Nachteile bestehen für den Einsatz von Biofilmen durch den diffusiven Transport von Nährstoffen in dem Biofilm und den fehlenden hydrodynamisch bedingten Hell-Dunkel-Zyklen [117]. Biofilmreaktoren lassen sich generell in zwei Typen unterscheiden. Zum einen in rotierende Biofilme, die zyklisch in Medium eingetaucht bzw. der Lichteinstrahlung ausgesetzt werden [129, 116]; zum anderen in stationäre Biofilme, die ortsgebunden mit Medium überströmt und in Richtung der Lichtquelle ausgerichtet werden [114, 115]. Berner gibt einen ausführlichen Überblick über die aktuellen technischen Realisierungen von Biofilm-Reaktoren [117]. Für die Reaktoren werden Wirkungsgrade im Bereich von $PCE = 1\%$ angegeben [116, 130].

2.2.3. Wirkungsgrad von mikroalgenbasierten Prozessen

Auf der Ebene des Gesamtprozesses sind weitere Prozessschritte bis zum Erhalt des gewünschten Produkts notwendig. Die Aufkonzentrierung der Biomasse ist aufgrund geringer Zellkonzentrationen im Medium oft notwendig (s. Tabelle 2.3). Durch den geringen Durchmesser der Zellen und den geringen Dichteunterschied zu Wasser ist ihre Abtrennung sehr energieintensiv [20]. Weitere energierelevante Prozessschritte können je nach Produkt ein Aufschluss der Biomasse, eine Umesterung von Lipiden (Biodiesel) oder eine Fermentation der Biomasse (Biogas) sein. Für eine effektivere Produktion wird an der Integration von Prozessschritten gearbeitet [18]. So werden Prozessschritte durch die verfahrenstechnische Nutzung der Eigenschaften der Alge überflüssig. Ansätze hierfür sind etwa eine Aufkonzentrierung durch Flockung [131, 132, 133] oder eine *in-situ*-Umesterung der Lipide in der Alge [17]. Ein weiterer Ansatz zur Steigerung des Wirkungsgrades ist die Vermeidung von besonders energieaufwendigen Prozessschritten wie der Aufkonzentrierung und dem Zellaufschluss durch die Exkretion des Produktes. Dadurch ist eine Neubildung von Biomasse nicht notwendig, so dass die absorbierte Lichtenergie auf das Zielprodukt fokussiert werden kann. Der Organismus benötigt keine Energie für die Synthese von hochwertigen Molekülen wie Proteinen oder

2. Theoretische Grundlagen

DNA. Neben der Einsparung auf der technischen Seite wird so auch auf biologischer Seite Energie eingespart [104]. Dieser Ansatz wird in der Literatur als „New Green Chemistry“ beschrieben [19] und ist eine konsequente Weiterentwicklung des Prinzips der „Green Chemistry“ [89]. Eine großtechnische Umsetzung erfolgt bereits in der Produktion von Ethanol durch das Unternehmen Algenol Biofuels (Bonita Springs, FL, USA) durch Cyanobakterien oder der Produktion von Biodiesel durch ein Cyanobakterium von Synthetic Genomics und Joule Unlimited (Bedford, MA, USA) [16].

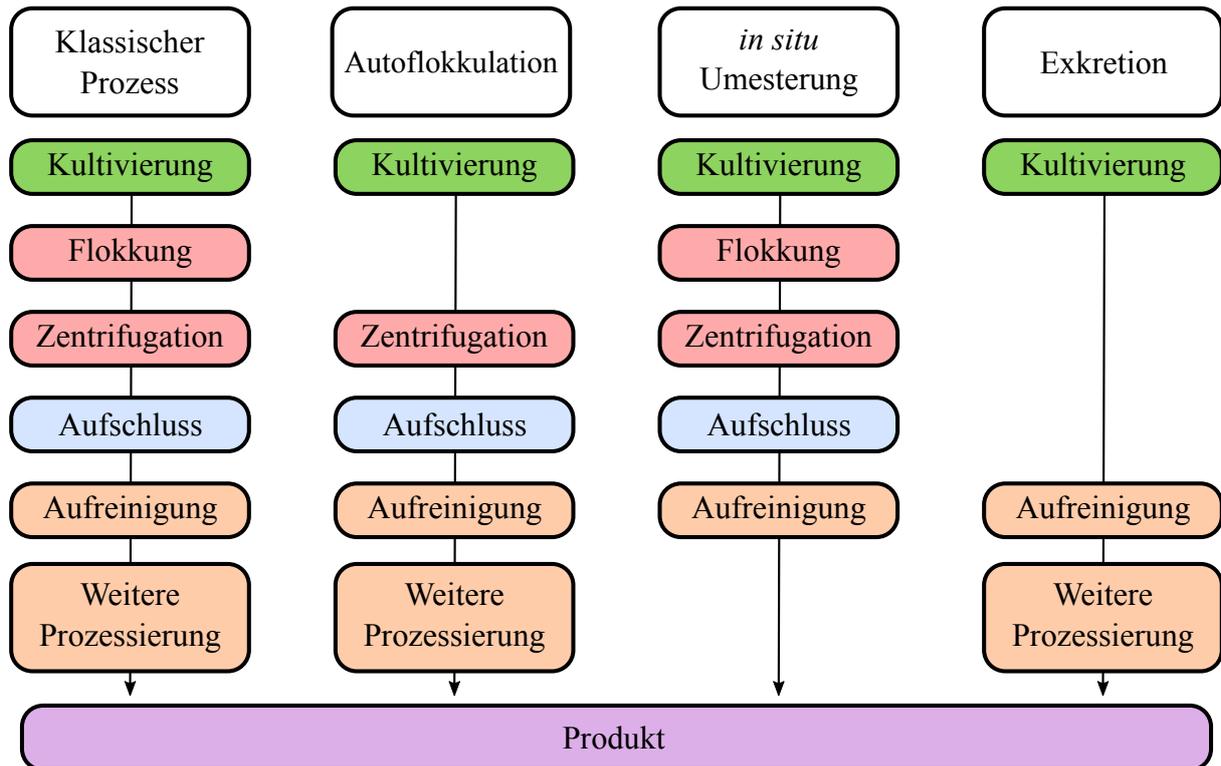


Abbildung 2.9.: Reduktion von Prozessschritten durch Integration von einem Prozessschritt in einen weiteren [18].

3. Materialien und Methoden

3.1. Algenstämme und Medium

Chlamydomonas reinhardtii ist eine einzellige Grünalge. Sie ist in der Literatur gut dokumentiert und gilt als Modellorganismus. Sie kann heterotroph mit Acetat als Kohlenstoff-Quelle, mixotroph oder photoautotroph wachsen. Dies ermöglicht die Isolation von Mutationen, die in verschiedenen photosynthetischen Funktionen beeinträchtigt sind [42, 60]. In dieser Arbeit wurden drei Stämme von *Chlamydomonas reinhardtii* verwendet:

***C. reinhardtii* WT 11-32 b**

Als Wildtyp-Alge wurde der Stamm SAG 11-32b, aus der Sammlung von Algenkulturen Göttingen, Deutschland gewählt. Dieser Stamm wurde in der Nähe von Amherst, MA Amerika isoliert und ist in axenischer Form erhältlich.

***C. reinhardtii* CC1860**

Der Stamm *C. reinhardtii* CC1860 wurde von Spalding et al. beschrieben (Spalding, 1982). Der Stamm wurde aus einem Wildtyp (2137 mt+) mittels 5-Fluorodesoxyuridin-Behandlung und Ethylmethansulfonat-Mutagenese auf Schäden in den Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismen gescreent. Der Stamm zeigt bei geringen CO₂-Konzentrationen eine deutlich verringerte Sauerstoff-Produktionsrate. Der Stamm ist beim Chlamydomonas Research Center (Minnesota) erhältlich.

C. reinhardtii WT 8 b+

Der Wildtyp-Stamm wurde von Bonente [134] beschrieben. Dieser Stamm wurde für die Experimente mit den lichtleitenden Einbauten herangezogen. Er diente in Arbeiten von Jacobi et al. [135] für Experimente mit lichtleitenden Glasschwämmen als Modellorganismus und wurde daher als Referenzorganismus verwendet.

Nährmedium

Für die Kultivierung wurde ein modifiziertes TAP-Medium [42] verwendet. Die Zusammensetzung ist in Anhang A.1 aufgeführt. Für photoautotrophe Kultivierungen wurde Acetat als heterotrophe Kohlenstoffquelle weggelassen. Im Fall der zusätzlichen pH-Regelung wurde auf Tris als Puffersubstanz verzichtet.

3.2. Kultivierungsbedingungen

3.2.1. Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf acetathaltigen Agar-Platten. Die Nährstoffkonzentration der Agar-Platten war die des einfachen TAP-Mediums. Es wurde 1 % (w/w) Agar zugesetzt. Die Beleuchtung der Platten erfolgte mit LEDs mit einer Photonenflussrate von $10 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$. Neben der Stammhaltung auf Agar-Platten wurde parallel für Vorkulturen eine Stammhaltung in Suspension vorgehalten. In Suspensionskultur wurden die Algen in begasten 500 ml Schüttelkolben, gefüllt mit 200 ml Medium, kultiviert. Der Volumenstrom für die Begasung betrug 20 ml/min pro Kolben mit einem CO_2 -Anteil von 5 % (v/v, CO_2 in Luft) im Zugas. Die Kultivierung erfolgte auf Rotationsschüttlern (KS 501 digital, IKA Werke GmbH) in klimatisierten Inkubatoren (MK 1200, Flohr Instruments) bei 25°C . Die Schüttel-Frequenz betrug 100 rpm. Die Kolben wurden von unten mit einer Photonenflussrate von $40 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ mit LEDs beleuchtet. Die Kulturen wurden in einem Abstand von etwa zwei Wochen in einen neuen Schüttelkolben überimpft. Vor dem Start eines Experiments in einem Reaktor wurden die Algen von der Oberflächenkultivierung in Suspension gebracht und mindestens zwei Überimpfungs-Zyklen im Schüttelkolben kultiviert.

3.2.2. Kultivierung in Mini-Plattenreaktoren

Ober-, Unter- und Seitenteile der Reaktoren bestanden aus Edelstahl; Front- und Rückseite bildeten zwei Glasplatten. Die Innenmaße der Reaktoren betragen 140 mm x 100 mm x 20 mm. Das Kultivierungsvolumen der Reaktoren betrug 200 ml. Jeder Plattenreaktor verfügte über ein separat ansteuerbares LED-Modul mit 60 LEDs (MS6L083AT, Nichia, Japan) versehen mit Kollimatorlinsen (6° Abstrahlwinkel, IMM Photonics GmbH, Unterschleißheim, Germany). Die Distanz zwischen LED-Modul und Reaktoroberfläche betrug 100 mm, so wurde ein homogenes Lichtfeld ermöglicht. Die Photonenflussrate der LEDs wurde mit einem Lichtsensor (LI-250, LI-Cor, USA) eingestellt. Eine Begasung erfolgte über Blasen, die an der Unterseite der Reaktoren über eine Teflon-Membran dispergiert wurden. Die Flussraten der Gase wurden entsprechend den Prozessbedingungen durch Massendurchflussregler gesteuert und in der Schlauchstrecke gemischt. In parallelen Kultivierungen wurden identische Gasanteile innerhalb eines Experiments eingestellt, indem die Gasvolumenströme von einem Massendurchflussregler-Set auf mehrere Reaktoren aufgeteilt wurden. Das Zugas wurde durch eine mit Wasser gefüllte Waschflasche mit Wasser gesättigt; so konnte der Wasserverlust während der Kultivierung verringert werden. Bei der Aufnahme von CO₂-Kinetiken wurde auf das Durchleiten durch die Waschflasche verzichtet, um so eine Totzeit durch den Carbonatspeicher im Waschflaschenwasser zu vermeiden. Vor Eintritt in den Reaktor passierte das Gasgemisch zur Entkeimung einen 0,2 µm Sterilfilter. Die Begasung pro Reaktor betrug 50 ml/min (Lichtkinetik) bzw. 150 ml/min (CO₂-Kinetik). Für die Experimente wurden die zusammengesetzten Reaktoren in einem Kammerautoklaven sterilisiert. Das Medium wurde separat in druckfesten Flaschen autoklaviert, um ein Ausgasen von Ammoniak zu verhindern. Die Reaktoren wurden unter der Cleanbench mit jeweils 200 ml Medium befüllt und dieses anschließend über Nacht mit CO₂-gesättigt. Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren so eingestellt, dass er im Gleichgewichtszustand bei dem jeweils gewählten CO₂-Partialdruck einen Wert von pH = 7,5 hatte. Zur Aufnahme der Lichtkinetik wurden die Plattenreaktoren mit Kulturbrühen, der Zelldichte 0,04 g/l inokkuliert. Zur Aufnahme der CO₂-Kinetik wurden die Plattenreaktoren so inokkuliert, dass die Zelldichte zum Zeitpunkt des CO₂-Sprungs 1 g/l betrug. Proben wurden über ein Saveflow-Membranventil (Braun) mit Hilfe von sterilen Spritzen genommen. Die Mini-Plattenreaktoren wurden auf zwei Weisen eingesetzt:

1. Ein System aus sechs Mini-Plattenreaktoren ermöglichte die parallele Kultivierung bei unterschiedlichen Begasungs- oder Beleuchtungsraten. Für die Temperierung wurden die Plattenreaktoren in einem kühl- bzw. beheizbaren Brutschrank installiert. Vorteil dieser Anordnung ist die Parallelisierbarkeit von Experimenten. Nachteilig ist die be-

3. Materialien und Methoden

grenzte Prozesskontrolle und -überwachung. Die Prozesskontrolle beschränkt sich auf die Steuerung durch Flowmeter für die Begasung sowie die Steuerung der LED-Module zur Einstellung unterschiedlicher Photonenflussraten.

2. Um die Vorgänge in den Mini-Plattenreaktoren besser überwachen zu können, stand ein über den Edelmantel temperierbarer Mini-Plattenreaktor zur Verfügung. Die Temperatur konnte hier über einen Kühlwasserstrom bzw. eine elektrische Heizung geregelt werden. Eine oben aufgesetzte Edelstahlplatte mit entsprechenden Bohrungen ermöglichte neben der Probenahme das Einbringen von bis zu drei Sonden sowie den Anschluss an die Abgasanalytik. Eine Aussparung in dem LED-Modul ermöglichte die online-Aufnahme der Fluoreszenz an der beleuchteten Seite des Reaktors mit der PAM-Sonde.

3.2.3. Kultivierung im Rührkessel

Aufbau des Reaktors

Zwei Laborfermenter (KLF 2000, BioEngineering, Schweiz) gleichen Aufbaus standen für die Kultivierung in Suspensionskultur zur Verfügung. Die Fermenter verfügten jeweils über ein Gesamtvolumen von 2 l. Die Suspensionskultur wurde mit Hilfe von zwei Scheibenrührern mit jeweils sechs Blättern mit einer Drehzahl von 250 rpm durchmischt. Die Rührer waren auf der Rührerwelle in einer Höhe von 65 und 170 mm vom Reaktorboden aus angebracht. Ein Strombrecherkorb mit vier Strombrechern war im Reaktor fixiert. Die Gasblasen wurden zusätzlich über einen mit Teflon ummantelten Begasungsring dispergiert. Ein elektrischer Heizstab und ein an die zentrale Kühlwasserversorgung angeschlossener Kühlstab ermöglichten die Temperierung des Mediums. Der Gasstrom wurde über jeweils ein Flowmeter für Luft bzw. N₂, O₂ und CO₂ gesteuert (Flowmeterset Reaktor 1: CO₂: GE50A (Range: 5 ml/min N₂); Luft: MKS 1179 B (Range: 200 ml/min N₂); O₂: MKS 1179 A (Range 500 ml/min N₂); Flowmeterset Reaktor 2: CO₂: MKS 1179 B (Range: 10 ml/min N₂); Luft: MKS 1179 B (Range: 200 ml/min N₂); O₂: MKS 1179 B; Nr. 36 (Range 500 ml/min N₂)). Luft bzw. N₂ und O₂-Flowmeter wurden über einen Volumenstrom-Messer (Gilibrator 2, Sensidyne) kalibriert. Die Kalibrierung des CO₂-Flowmeters erfolgte über die Beimischung von CO₂ in einen Luftstrom und der Messung des CO₂-Anteils durch das Abgas-Messsystem (Multor 610, Maihak). Da systembedingt ein Mindeststrom von 400 ml/min für die Abgasanalytik erforderlich

3. Materialien und Methoden

ist, wurde der Abgasstrom zunächst in einer Gassammeltüte Supelco (2 l Teldar Gas Sampling Bag) gesammelt und in regelmäßigen Abständen (ca. 15 bis 30 min) der O₂- (bis maximal 38 %) und CO₂-Gehalt gemessen. Beleuchtet wurde der Reaktor über ein mit Kollimatorlinsen versehenes LED-Modul (6° Abstrahlwinkel, IMM Photonics GmbH, Unterschleißheim, Germany). Das LED-Modul bestand aus zwei Halbschalen, die den Reaktorumfang vollständig umschlossen. Der Radius des LED-Moduls betrug 5,75 mm, die Höhe 300 mm. Für die Mess- und Regelungstechnik wurden zwei Systeme verwendet. Temperatur und Drehzahl des Rührers wurden über den BioEngineering eigenen Steuerschrank geregelt. Die Datenaufnahme und die Regelung aller weiteren Parameter erfolgte über das am Institut entwickelte LabView basierte Mess- und Regelungssystem BioProCon. In den Reaktoren konnte die optische Dichte über einen Messkopf bei verschiedenen Wellenlängen bestimmt werden. Dieses Photometer bestand aus einer Lichtquelle (AVALight-Hal-S, Avantes) und einem Diodenarray Detektor (AvaSpec-3648, Avantes). Die Lichtleitung erfolgte über Glasfasern. Die Aufnahme des Sauerstoffpartialdrucks erfolgte über eine indirekte Fluoreszenzmessung mit der Sonde VisiFerm 225 (Hamilton). Die Sonde wurde im Nullpunkt (Ausstrippen von Sauerstoff mittels N₂) und bei Luftsättigung kalibriert. Eine weitere Kalibrierung für höhere Sauerstoffpartialdrücke erfolgte mit verschiedenen Gemischen von O₂ und Luft. Bei O₂-Partialdrücken von über 60 % des Gesamtdrucks erfolgte die Bestimmung amperometrisch (Hamilton OxyFerm). Die Regelung des Sauerstoffpartialdrucks erfolgte mittels PI-Regelung. Über eine potentiometrische pH-Messung (Hamilton Polylite plus) wurde der pH gemessen. Die pH-Sonde wurde vor dem Autoklavieren über zwei Punkte (pH=7,01 und 4,01) kalibriert. Die Regelung des pH-Werts erfolgte mittels einem P-Regler. Stellmittel waren 2 M NaOH und 2 M HCl. Die O₂ und CO₂-Sonden wurden nach dem Autoklavieren kalibriert. Der Reaktor mit eingebauten Sonden wurde bei 121°C für 20 min autoklaviert. Flaschen mit Vorlagemedien wurde separat autoklaviert, steril unter einer Cleanbench befüllt und steril angeschlossen. Die Ammonium-Quelle (TAP-Salze) wurde in einer druckfesten Flasche autoklaviert.

Lichtprofil im Rührkessel

Die Kalibrierung der LED-Module ist im Anhang C.1 aufgeführt. Sie erfolgte mit einem planaren Lichtsensor (LI-250 (LI-Cor)) zur Ermittlung des Photonenstroms. Hierzu wurde die Messsonde gleichmäßig über das LED-Array bewegt, um eine gemittelte Lichtintensität zu messen. Aus der Geometrie des verwendeten Reaktors und der Lichtabsorption der Algen ergibt sich über die Reaktortiefe ein für die Reaktorgeometrie spezifisches Lichtprofil. Für die zylindrische Geometrie des Rührkesselreaktors gilt der folgende Zusammenhang für das

3. Materialien und Methoden

Lichtprofil:

$$I(r) = \frac{I_0 \cdot R}{r} \cdot \exp^{\epsilon \cdot c_X \cdot (r-R)} \quad (3.1)$$

Mit R dem Innenradius des Reaktors, I_0 dem Photonenstrom des LED-Mantels, ϵ dem Ex-tinktionskoeffizienten. Die Reaktortiefe $r = 0$ m liegt in der Symmetrieachse des Zylinders. Die Rührerwelle des Reaktors hat einen Radius von 4 mm. Für die zylindrische Geometrie existiert ein Betriebspunkt, bei dem die Lichtintensität über die gesamte Reaktortiefe sehr homogen ist. Der optimale Betriebspunkt kann über die Ableitung von Gleichung 3.1 berechnet werden. Dies liefert einen optimalen Betriebspunkt von $\epsilon \cdot c_X = 45,6$ 1/m, bei dem die Änderung des Lichtprofils minimal ist. Für die Wachstumsphase der Alge wurde dieser Betriebspunkt bei einer Algenkonzentration von ca. 0,3 g/l mit der Alge *C. reinhardtii* CC1860 erreicht. Die auf die Algen einwirkende Lichtintensität wurde im Lichtgleichverteilungspunkt ($\epsilon \cdot c_X = 45$ 1/m) mit einem sphärischen Messkopf (QSL-2101, Biospherical Instruments) aufgenommen. Hierzu wurde der Messkopf an verschiedenen Stellen auf gleicher Reaktorhöhe positioniert und die Lichtintensität aufgenommen. Die entsprechende Kalibrierung ist im Anhang C.1 aufgeführt. Abbildung 3.1 zeigt die gemessene Lichtintensität sowie die berechnete Lichtintensität als Funktion des Radius des Reaktors. Die berechnete mittlere Lichtintensität beträgt für die Auftragung $I_{\text{Avg}} = 142,71$ $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ (gepunktete Linie). Die Messung des Ex-tinktionskoeffizienten während des Kultivierungsverlaufs ist in Abschnitt 3.4.7 beschrieben.

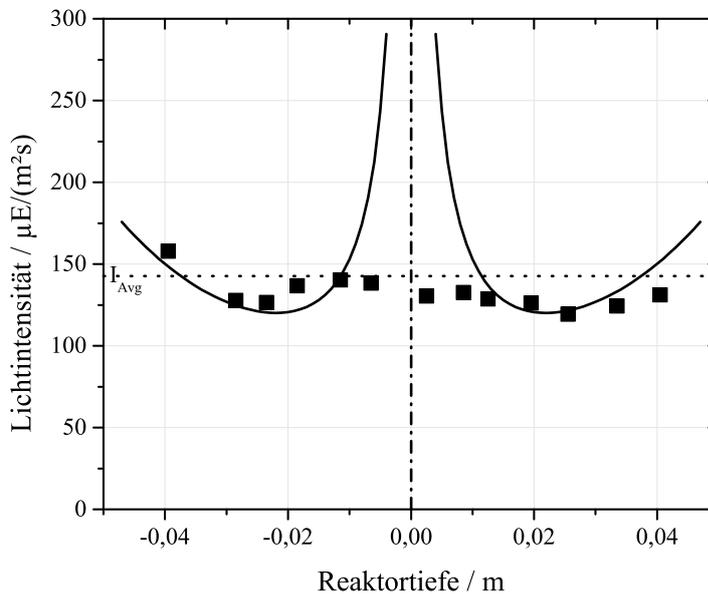


Abbildung 3.1.: Gemessenes (■) und (—) berechnetes radiales Profil der Lichtintensität in dem zylindrischen Rührkessel im Lichtgleichverteilungspunkt bei einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon \cdot c_X = 45$ 1/m. Die Messpunkte wurden mit einem sphärischen Messkopf aufgenommen.

Prozessführung

Die Rührkessel wurden im Batch- und Turbidostat-Modus betrieben. Der Aufbau des oben beschriebenen Betriebs erweiterte sich für den Turbidostat-Betrieb um

- ein autoklavierbares 40 l Vorlagegefäß um steriles Medium für die gesamte Prozessdauer vorlegen zu können (Sartorius Pressure Tank S 2067)
- eine 5 bzw. 10 l Vorlageflasche auf einer Waage, um den Volumenstrom in den Reaktor bestimmen zu können
- eine über BioProCon geregelte Pumpe für den Zustrom des Mediums sowie einer kontinuierlich betriebenen unregelmäßig betriebenen Pumpe für dessen Abstrom.

Das Füllvolumen wurde über ein Steigrohr eingestellt. Für den Medienzustrom wurde eine kalibrierte Pumpe verwendet. Durch Abnutzung der Schläuche kann sich diese Kalibrierung jedoch über den Prozessverlauf verändern. Daher wurde für die Auswertung der Experimente die Ableitung des Waagensignals zur Bestimmung des Massen- bzw. Volumenstroms verwendet. Regelgröße für den Turbidostat-Betrieb war die online gemessene optische Dichte bei einer Wellenlänge von 750 nm. Die Stellgröße war die Pumpgeschwindigkeit der Schlauchpumpe für die Zufuhr von frischem Medium. Die Regelung erfolgte über einen PI-Regler. Für die optimale Reglereinstellung des I-Systems wurde das Systemverhalten bei unterschiedlichen Wachstumsraten berechnet. Hierzu wurden die Differentialgleichungen für den PI-Regler (Gleichung 3.2), sowie die Differentialgleichung des Biomassewachstums (Gleichung 3.7) mittels Matlab numerisch gelöst.

$$u(t) = K_p \left[e(t) + \frac{1}{K_i} \int_0^t e(\tau) d\tau \right] \quad (3.2)$$

Mit dem P-Anteil des Reglers K_p , dem I-Anteil des Reglers K_i und der Integrationszeit τ . Als Kriterium der Regelgüte wurde das Integral der Regelabweichung in Abhängigkeit von K_i und K_p bestimmt (s. Abbildung 3.2). Da die photometrische Messung, verursacht durch Luftblasen, Schwankungen unterlag, wurde ein P-Anteil $K_p = 90 \text{ ml}/(\text{min OD})$ und ein I-Anteil von $T_i = 200 \text{ 1}/\text{min}$ gewählt.

Dem Betrieb des Reaktors im Turbidostat-Betrieb ging eine Batch-Phase voraus, bei der die Biomasse von ca. $c_X = 0,05 \text{ g/l}$ nach dem Animpfen auf eine Konzentration von etwa $c_X = 0,3 \text{ g/l}$ erhöht wurde. Dies geschah bei einem nicht wachstumslimitierenden CO_2 -Partialdruck von etwa 2,5 % des Gesamtdrucks. Zum Zeitpunkt $PZ = 0 \text{ h}$ wurde der Batch-Betrieb auf den

3. Materialien und Methoden

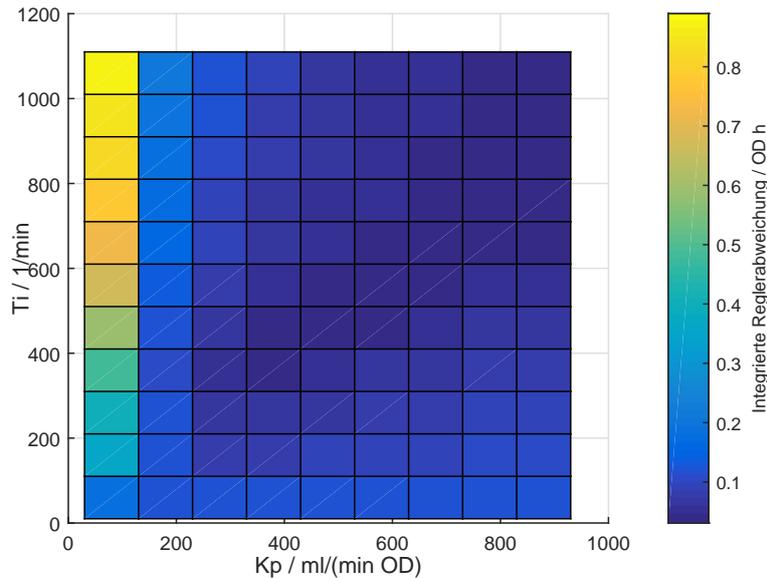


Abbildung 3.2.: Berechnete integrierte Regelabweichung vom eingestellten Wert der Biomassekonzentration bei einem Sprung von $c_X = 0,35$ auf $0,3$ g/l für eine Wachstumsrate von $1,3$ 1/d.

OD-geregelten Turbidostat-Betrieb umgestellt. Der Setpoint der online gemessenen optischen Dichte wurde so eingestellt, dass die Lichtintensität ein möglichst konstantes radiales Profil aufweist. Hierzu wurde der Extinktionskoeffizient $\epsilon \cdot c$ der Algensuspension gemessen und auf einen Wert möglichst nahe dem Optimum eingestellt (s. Abschnitt 3.2.3). Der pH-Wert wurde auf einen konstanten Wert von $\text{pH} = 7,5$ geregelt.

Bestimmung des Stofftransports im Rührkesselreaktor

Für den Betrieb des Rührkessels wurde von einem quasistationären Gleichgewicht zwischen Gas- und Flüssigphase ausgegangen. Um dies nachzuweisen, wurde der Stoffübergangskoeffizient des Rührkessels für den oben beschriebenen Aufbau und die beschriebene Betriebsweise (Rührerdrehzahl $n = 250$ rpm, Begasungsrate $\dot{V} = 100$ ml/min Gesamtstrom) für das Modellgas Sauerstoff nach Gleichung 3.9 bestimmt ($k_{lO_2} = 0,29$ 1/min). Die Bestimmung erfolgte über die Messung des ein- bzw. ausgetragenen Sauerstoffs mit einer optischen pO_2 -Sonde. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem k_{lO_2} für Sauerstoff und CO_2 über die Diffusionskoeffizienten [136]. Mit $D_{O_2} = 2,1 \cdot 10^{-5}$ m²/s und $D_{CO_2} = 1,92 \cdot 10^{-5}$ m²/s ist der k_{lCO_2} für CO_2 um 4,38 % geringer als für O_2 .

3.2.4. Kultivierung der Algen im Biofilm-Reaktor

Der zusammengebaute Reaktor wurde in einem Kammerautoklaven autoklaviert, mit sterilem Medium befüllte Vorlageflaschen unter der Cleanbench mittels Sterilkupplungen angeschlossen und Medium im Kultivierungskompartiment vorgelegt. Das Zugas wurde über einen 0,2 µm Sterilfilter steril zugeführt und das Begasungskompartiment kontinuierlich durchströmt. Nach eintägiger Equilibrierung wurde der Reaktor über die Sterilkupplung des Medien-Zulaufs inokkuliert und das Inokkulum möglichst homogen im Reaktor verteilt. Anschließend wurde das Kultivierungssegment kontinuierlich mit frischem Medium durchströmt. Das abfließende Medium wurde entweder in einer sterilen Abfallflasche gesammelt oder alternativ zur Probenahme verwendet.

3.3. Herstellung und Einsatz lichtleitender Einbauten

Herstellung von lichtleitenden Einbauten

Die lichtleitenden Einbauten wurden nach einem Abformverfahren hergestellt. Abzuformende Materialien waren Hydrogele (Aqualino, Gel-deko) mit einem variablen Durchmesser von 8 bis 12 mm oder 10 bis 20 mm. Die kugelförmigen Hydrogele quollen bei Einlegen in Wasser auf den gewünschten Durchmesser zwischen 5 mm und 20 mm auf. Anschließend wurden sie nach dem Prinzip einer hexagonalen Schichtung in einer Gießform aus Plexiglas mit den Maßen 100 x 100 x 30 mm angeordnet. Für den Randbereich wurden die verwendeten Kugeln entsprechend zugeschnitten. Für die Vorderseite der Struktur (beleuchtete Seite des Reaktors) wurden Kugelscheiben mit $\frac{2}{3}$ des Durchmessers der Kugeln zugeschnitten. Die geschichteten Kugeln wurden mit einer Platte (9,8 x 9,8 mm) und einem Gesamtgewicht von 120 g gleichmäßig beschwert und so aneinandergedrückt. Die Anpressstellen bildeten nach Aushärten des Abformmaterials die Fenster zwischen den Hohlräumen. Die so entstandene hexagonale Struktur wurde mit dem kaltvernetzenden zweikomponentigen Silikon Elastosil RT 604 abgeformt. Die Trocknungszeit betrug 12 h bei Raumtemperatur. Danach wurden die Hydrogele im Trockenschrank bei 80°C getrocknet. Die eingesetzten Hydrogelkugeln wiesen nach dem Trocknen einen Durchmesser von etwa 1 mm auf und konnten daher aus der Struktur manuell entfernt werden.

3. Materialien und Methoden

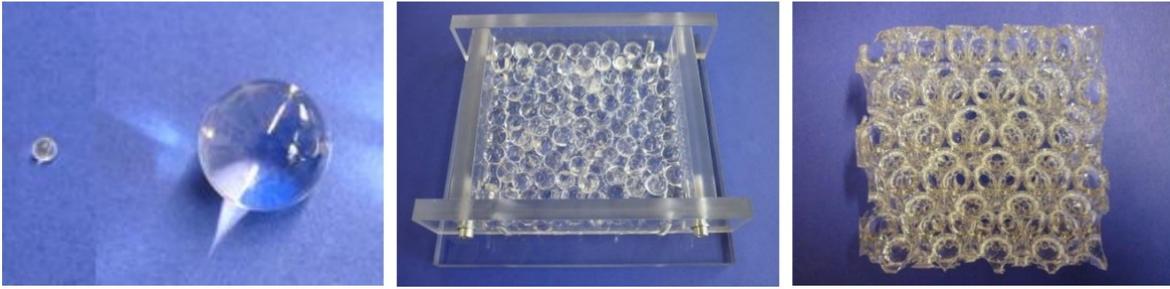


Abbildung 3.3.: Herstellprozess der lichtleitenden Einbauten: a) Aufquellen der Hydrogele bis zu dem entsprechenden Durchmesser, b) Schichtung in Anlehnung an eine hexagonale Kugelstruktur mit zwei übereinanderliegenden Kugelschichten aus den aufgequollenen Hydrogelkugeln c) abgeformte Struktur.

Kultivierung mit und ohne lichtleitenden Einbauten

Der Aufbau der Mini-Plattenreaktoren und das Vorgehen während der Kultivierung geschahen bis auf die hier aufgeführten Änderungen prinzipiell wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Die Silikoneinbauten wurden vor dem Zusammenbau der Plattenreaktoren mit leichtem Druck zwischen den Glasplatten verklemmt. Die Abdichtung der Glasscheiben zu den Edelstahlrahmen erfolgte durch eine Silikon-Runddichtung. Die lichtleitenden Einbauten wurden in eingebautem Zustand mit den Reaktoren in einem separaten Kammerautoklaven sterilisiert. Die Mini-Plattenreaktoren wurden bis zu einer Füllhöhe von 100 mm mit Medium befüllt. Das Füllvolumen des Reaktors betrug 200 ml. Dieses verringerte sich durch die Einbauten auf 147, 140 bzw. 130 ml. Die Unterschiede der Füllvolumina sind auf leichte Unterschiede bei der Herstellung der drei Einbauten zurückzuführen. Die Plattenreaktoren wurden mit einem Volumenstrom von $\dot{V} = 50$ ml/min pro Reaktor und mit einem CO_2 -Anteil von 5 % (v/v) begast. Um hohe Zelldichten ohne Nährstofflimitierung zu erreichen, wurden die Mini-Plattenreaktoren mit einem 2,5-fach konzentrierten TP-Medium befüllt. Das entnommene Probevolumen wurde nach der Probenahme durch 4-fach konzentriertes TP-Medium ersetzt, um eine Nährstofflimitierung zu vermeiden. Anhand der Biomassekonzentration wurde der Verbrauch an Nährstoffen berechnet und bei Bedarf entsprechend mit höher konzentrierter TAP-Salzlösung und Phosphat-Lösung aufgefüllt.

3.4. Analytische Methoden

3.4.1. Biomassekonzentration

Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte indirekt durch die Messung der optischen Dichte sowie durch die direkte gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse. Die optische Dichte wurde in dem Spektrometer L35 von Perkin-Elmer bzw. PG Instruments (T60 UV-Visible Spectrophotometer) gemessen. Streulicht wurde bei 750 nm mit einer Spaltbreite von 1 nm bestimmt. Ab einer optischen Dichte von 0,4 wurde die Probe mit filtriertem Medium verdünnt. Die Bestimmung des Blanks erfolgte ebenfalls mit diesem Medium. Die Korrelation von optischer Dichte und Biomassekonzentration erfolgte mit Hilfe der gravimetrischen Bestimmung der Biotrockenmasse. Bei verschiedenen Biomassekonzentrationen wurden gravimetrische Dreifachbestimmungen der Biomasse vorgenommen und diese mit der jeweils gemessenen optischen Dichte korreliert. Daraus ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,34 g/(l OD). Während jeder Kultivierung wurde in regelmäßigen Abständen neben der Bestimmung der Biomassekonzentration über die optische Dichte eine gravimetrische Messung durchgeführt. Hierzu wurden je nach zur Verfügung stehendem Kulturvolumen 60 ml (im kontinuierlichen Betrieb) oder mindestens 10 ml (im Batch Betrieb) abzentrifugiert (30 min bei ca. 2700 g), der Überstand verworfen und das Zellpellet 24 h bei 80°C im Trockenschrank getrocknet. Nach Abkühlung im Exsikkator wurde die Biomasse mit einer Analysenwaage (ABJ 320-4, Kern) bestimmt.

3.4.2. Chlorophyllanteil der Biomasse

Zur Bestimmung des Chlorophyll-Anteils in der Biomasse wurden 750 µl Zellsuspension abzentrifugiert (10 min, 11.769 g), der Überstand verworfen und das Zellpellet analysiert. In der Regel erfolgte die Bestimmung des Chlorophylls über eine Aceton-Extraktion des Zellpellets. Hierzu wurden die Zellen in 1500 µl mit Calciumcarbonat gesättigtem Aceton resuspendiert und anschließend mit Hilfe einer Kugelmühle aufgeschlossen (fünf Edelstahlkugeln mit einem Durchmesser von 3 mm, 5 min bei einer Schüttelfrequenz von 30 Hz). Die Ermittlung des Chlorophyllgehalts in mg/l erfolgte gemäß Gleichung 3.3 [137].

$$c_{Chla} = 11,75 \cdot A_{662} - 2,35 \cdot A_{645} \quad (3.3)$$

$$c_{Chlb} = 18,61 \cdot A_{645} - 3,96 \cdot A_{662} \quad (3.4)$$

3. Materialien und Methoden

Überschritten die Absorptionen 1,0 AU, wurde der Extrakt mit Aceton verdünnt. Für die flächenspezifische Bestimmung des Chlorophyllgehalts im Biofilm erfolgte der Zellaufschluss mit DMSO, da die Zellen bedingt durch das Trägermaterial nicht in der Kugelmühle aufgeschlossen werden konnten. Hierzu wurden Probenstücke des Biofilms für 125 min bei 65°C mit DMSO behandelt. Nach 10 min zentrifugieren wurde die Absorption des Überstands bestimmt. Die Chlorophyllkonzentration wurde entsprechend Gleichung 3.5 in mg/l ermittelt [138].

$$c_{Chla} = 12,3 \cdot A_{663} - 0,86 \cdot A_{645} \quad (3.5)$$

$$c_{Chlb} = 19,3 \cdot A_{645} - 3,60 \cdot A_{663} \quad (3.6)$$

Zur Überprüfung auf Partikelfreiheit wurde zusätzlich die Streuung bei einer Wellenlänge von 750 nm aufgenommen.

3.4.3. Stärkegehalt der Biomasse

Nach der Anthron-Methode zur Bestimmung von Pentosen und Hexosen wurde der Stärkegehalt der Zellen analysiert [139]. Hierzu wurden 450 µl der Probenlösung abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde mit Wasser so verdünnt, dass die Biomassekonzentration im Bereich von unter 0,2 g/l lag. Von dieser Suspension wurden 400 µl mit 800 µl Anthron-Reagenz versetzt und 16 min bei 95°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf Eis gestoppt. Die Proben wurden anschließend bei 11.769 g zentrifugiert und die Absorption des Überstands bei 625 nm gemessen. Eine Kalibrierung erfolgte im Konzentrationsbereich von 20 mg/l bis 200 mg/l mit Stärke nach Zulkowsky (Merck).

3.4.4. Glycolat-Konzentration

Die Bestimmung des Glycolats erfolgte mittels Ionenchromatographie (IC). Hierzu stand ein IC-System von Metrohm (882 Compact IC Plus mit chemischer Suppression, Metrohm) mit automatisiertem Probenhandling zur Verfügung. Das Probenhandling bestand aus automatisierter Probenvorlage (858 Sample Processor, Metrohm), automatisierter Verdünnung (Dosi-no, 10 ml, Metrohm) und Dialyseeinheit (833 Liquid Handling Unit, Metrohm). Das für die Analytik verwendete Wasser wurde über eine Ultrareinstwasseranlage (Ultra Pure water, EL-GA) aufbereitet und wies einen Widerstand von minimal 14 MΩ auf. Für die Bestimmung

3. Materialien und Methoden

wurde die Probe auf eine Glycolat-Konzentration im Bereich zwischen 1 und 75 mg/l und auf ein Gesamtvolumen von 10 ml verdünnt. Um die Probenvorbereitung durch die automatisierte Probenverarbeitung (Dialyse und Verdünnung) auf ihre Güte zu überprüfen, wurde über die Pipettiereinheit in das Gesamtvolumen von 10 ml Natriumbromidlösung gegeben, so dass eine Bromidkonzentration von 50 mg/l in der verdünnten Probe vorlag. Die Probe wurde ca. 15 Minuten dialysiert. Von dem Dialysat wurden 20 µl mittels der Säule Metrohm A-Supp 7 250/4 aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte isokratisch mit einem Carbonat-Eluenten (3,6 mM Na₂CO₃ in 7 % (v/v) Acetonitril/Wasser). Die Leitfähigkeit wurde mit dem Detektor IC Conductivity Detector (Metrohm) aufgenommen. Es wurden Kalibrierkurven mit Glycolat-Standardlösungen der Konzentrationen 1, 5, 10, 25, 50, 75 mg/l aufgenommen. Die Standards wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

3.4.5. Konzentration anorganischer Ionen

Die Konzentration anorganischer Ionen erfolgte ebenfalls mittels Ionenchromatographie. Das verwendete IC System entspricht dem in Abschnitt 3.4.4 beschriebenen. Für die Bestimmung der Anionen wurde ein Eluent mit 3,2 mM Na₂CO₃, 1 mM NaHCO₃ in 12,5 % (v/v) Acetonitril/Wasser sowie die Säule Metrosep A Supp 5 150/4 (Metrohm) verwendet. Für die Bestimmung der Kationen setzte sich der Eluent aus 1,7 mM HNO₃ und 0,7 M 2,6-Pyridindicarbonsäure in Wasser zusammen; als Trennsäule wurde Metrosep C4 150/4.0 (Metrohm) verwendet. Die Proben wurden standardmäßig mit Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt.

3.4.6. Fluoreszenzmessung (PAM)

Für die Messung der Fluoreszenz wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Gademann (Gademann Instruments, Würzburg) eine Puls-Amplituden-Modulation-Sonde (PAM) entwickelt (Arbeitsname Fresewinkel-PAM). Diese ermöglicht die Online-Messung der Fluoreszenz in einem Plattenreaktor während der Kultivierung, ohne dass die Algen durch die Sonde abgeschattet werden. Über ein Vierkanal-PAM-Fluorometer (Quad-PAM) konnten bis zu vier Messköpfe gleichzeitig angesteuert werden. Zwei Messköpfe wurden von der Firma Gademann Instruments in Kooperation mit uns für die Online-Messung entwickelt. Bei diesen wurde Messlicht, sättigendes bzw. aktinisches Licht (LED-Typ: Rebel LED LUMILEDS - LXML-PB01-0023) durch einen Glasstab mit 5 mm Durchmesser geleitet. Die von den Algen

3. Materialien und Methoden

ausgestrahlte Fluoreszenz wurde über den gleichen Stab zurückgeführt und im Sondenkopf durch den PAM-Detektor (Photodetektor mit Vorverstärker) gemessen. Die Sonde wurde für eine Online-Messung in den Mini-Plattenreaktoren konzipiert. Für die Messung an der beleuchteten Oberfläche wurde das LED-Modul durchbohrt. So konnte der Messstab direkt an der Glasoberfläche angebracht werden. Es wurde das analoge Netzteil Voltcraft VSP 2405 verwendet. Bei einer Pulslänge von 0,3 s mit einer Intensität von ca. 20.000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ wurde eine Sättigung des Photosystems der Algen in dem Mini-Plattenreaktor erreicht. Eine Online-Messung im Rührkessel war nicht möglich. Aufgrund der Geschwindigkeit der Algen im Rührkessel und des zu dicken Glaszylinders konnte keine Sättigung des Photosystems durch die sondeninterne LED-Beleuchtung erreicht werden. Neben der Online-Messung der Fluoreszenz im Mini-Plattenreaktor wurde die PAM-Sonde auch für Offline-Fluoreszenzmessungen verwendet. Hierbei wurden zwei Proben mit jeweils 2 ml Algensuspension in verschlossenen Küvetten mit einer Lichtintensität von ca. 4 bis 8 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ durch eine externe Lichtquelle beleuchtet. Eine Probe wurde verwendet, um die Fluoreszenz bei unterschiedlichen Beleuchtungsintensitäten zu ermitteln (Lichtkurve). Zunächst wurde nach einer Wartezeit von 1 min in Dunkelheit die maximale Photonenausbeute YII aufgenommen. Anschließend wurde zur Aufnahme einer Lichtkurve die aktinische Lichtintensität alle 60 s stufenweise erhöht. Die Lichtintensitäten, gemessen mit dem planaren Photonflussensor (LI-250, LI-Cor), betragen 1,4; 32,1; 61,3; 90,8; 127,7; 178,9; 273,8; 412,8; 609,7; 908,3; 1195,5; 1658,4; 2147,5 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$. Für die Bestimmung der dunkeladaptierten photosynthetischen Aktivität YII wurde die zweite Probe nach mindestens 10 min und maximal 30 min bei einer Lichtintensität von 4 bis 8 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ gemessen. Die Messung erfolgte mit einer Sättigungspulslänge von 450 ms. Vorversuche zeigten, dass die Fluoreszenz der dunkeladaptierten Algen nach ca. 10 min einen stabilen Wert annahm.

3.4.7. Extinktion der Algensuspension

Der Extinktionskoeffizient der Algensuspension für die Berechnung des Lichtprofils wurde in einem Messaufbau bestehend aus einer Lichtquelle (LED: MS6L083AT, Nichia, Japan), einer Küvette ($l = 10$ mm Lichtweg) und einem planaren Photonflussensor für den PAR-Bereich (LI-250, LI-Cor) aufgenommen. Für die Bestimmung des adaptierten Extinktionskoeffizienten wurden die auf die Küvette auftreffenden Photonen und die Transmission durch die Küvette bestimmt. Die Lichtintensität I_0 wurde ohne eine im Strahlengang positionierte Küvette zwischen LED und PAR-Sensor bestimmt. Zur Messung der Transmission befand sich die mit der Algensuspension gefüllte Küvette im Strahlengang. Zur Ermittlung des Blank-Werts wurde

die Küvette mit destilliertem Wasser gefüllt. Die gemessenen Transmissionswerte der Algen-suspensionen wurden durch Subtraktion des Blank-Werts korrigiert, um die Transmission I (s. Gleichung 2.11) zu erhalten. So konnte $\epsilon \cdot c_X$ bestimmt werden.

3.5. Berechnungen

3.5.1. Biomassespezifische Produktionsraten

Die Massenbilanz für einen Reaktor in kontinuierlicher Betriebsweise ist für die Biomasse in Gleichung 3.7 gegeben.

$$r_i = \frac{dc_i}{c_X dt} = \frac{\dot{V} \cdot (c_{i,aus} - c_{i,ein}) + \frac{dc_i}{dt}}{c_X \cdot V_R} \quad (3.7)$$

mit $c_{i,aus}$ der Konzentration von Komponente i im Auslauf des Reaktors, $c_{i,ein}$ der Konzentration von Komponente i im Zulauf, c_i der Konzentration der Komponente i im Reaktor, c_X der Biomassekonzentration, V_R dem Volumen des Reaktors und \dot{V} dem Fluss des Mediums durch den Reaktor. Letztere können zu der Verdünnungsrate D zusammengefasst werden.

$$D = \dot{V}/V \quad (3.8)$$

Für den Batch-Betrieb gilt $\dot{V} = 0$.

3.5.2. Stofftransportkoeffizienten

Blasenbegasung

Der Stofftransportkoeffizient $k_l a$ wurde durch die Aufnahme einer Sprungantwort bestimmt. Aus der Zweifilm-Theorie lässt sich Gleichung 3.9

$$\frac{dc_{gas}}{dt} = k_l a \cdot (c_{gas,l}^* - c_{gas}) \quad (3.9)$$

3. Materialien und Methoden

mit c^{gas} der Konzentration des Gases in der Flüssigkeit, c^* der theoretischen Gleichgewichtskonzentration des Gases in der Grenzschicht und a der volumenspezifischen Gasaustauschfläche $a = A/V_R$. Die Gleichgewichtskonzentration wurde mit dem Henry'schen Gesetz berechnet, siehe Gleichung 3.10.

$$c_{gas,l}^* = p_{gas} \cdot H \quad (3.10)$$

mit H dem Henry-Koeffizienten ($H_{CO_2} = 3,4 \times 10^{-2} \text{ mol/l/atm}$ und $H_{O_2} = 1,3 \times 10^{-3} \text{ mol/l/atm}$) und p_{gas} dem Partialdruck des entsprechenden Gases in der Gasphase. Aufgrund der schnellen Ansprechzeit der optischen Gelöstsauerstoffsonde wurde Sauerstoff als Modellgas für die $k_{l,a}$ -Bestimmung gewählt. Durch Integration der Gleichung 3.9 und durch eine linearisierte Auftragung der gemessenen Gaskonzentration über die Messzeit wurde mittels linearer Regression der Stoffübergangskoeffizient bestimmt.

Membranbegasung

Zur Messung des Stofftransportkoeffizienten durch Membranen stand eine Testkammer zur Verfügung, die in einer vorhergehenden Arbeit konstruiert wurde [140]. In die Messkammer wurden Membranen zur Bestimmung des Stoffübergangskoeffizienten eingespannt. Die Übertragungsfläche der Membran betrug 50 cm^2 . Das Volumen der Gas-Seite betrug 80 ml . Die Begasungsseite wurde mit 80 ml/min durchströmt, um eine konstante Gaszusammensetzung zu gewährleisten. Das Volumen der Kammer mit der Flüssigphase betrug 100 ml . Das Volumen der Flüssigphase wurde um eine 500 ml fassende Flasche erweitert, um den Konzentrationsanstieg durch den Gaseintrag über die Membran zu verlangsamen und eine genauere Messung zu ermöglichen. So ergab sich ein Gesamtflüssigkeitsvolumen von 670 ml . Die Flüssigphase wurde konstant mit 100 ml/min zirkuliert. Für die Verschlauchung wurde ein gasundurchlässiges Material verwendet (Fluran-F-5500-A, Hirschmann). Der pH-Wert sowie die Partialdrücke von O_2 und CO_2 wurden in einem Bypass gemessen, der mit 5 ml/min durchströmt wurde.

3.5.3. Reglerauslegung

Die PI-Regler wurden nach Chien-Hrones-Reswick ausgelegt. Hierzu wurde eine Sprungantwort der Regelstrecke aufgenommen. Die Verzugszeit (T_u) und die Ausgleichszeit (T_g) wurden über die Wendetangente der Systemantwort auf den Sprungversuch bestimmt. Im Fol-

3. Materialien und Methoden

genden ist K_s der Quotient aus der Istwertänderung zu der Stellgrößenänderung. Für die PI-Reglereinstellung (Gleichung 3.2) wurden der P-Anteil K_p nach Gleichung 3.11 und der I-Anteil K_i nach Gleichung 3.12.

$$K_p = \frac{0,34}{K_s} \cdot \frac{T_g}{T_u} \quad (3.11)$$

$$K_i = 1,2 \cdot T_u \quad (3.12)$$

Für P-Regler wurde der P-Anteil nach Gleichung 3.13 berechnet.

$$K_p = \frac{0,30}{K_s} \cdot \frac{T_g}{T_u} \quad (3.13)$$

Die Einstellung der PI-Regler für die Regelung der optischen Dichte wird in Kapitel 3.2.3 erläutert.

3.5.4. Varianzanalyse

Zur Bestimmung des Parameterschätzfehlers sowie zur Bestimmung von nicht sensitiven Parametern wurde die Fisher-Informationsmatrix F verwendet. Diese wurde gemäß Posten et al. [141] und Majer et al. [142] durchgeführt. Es wurde die Annahme getroffen, dass der geschätzte Parameter p^* in der Nähe des erwarteten Parameters liegt. Die jeweilige Sensitivität des dynamischen Systems wurde in skaliert Form für den Parametervektor p über die Summe der Messpunkte t_k berechnet. Dies erfolgte durch die Berechnung der Fisher-Informationsmatrix \bar{F} nach

$$\bar{F}(p^*) = \sum_{i=1}^n \bar{W}^T \Big|_{p^*, t_k} \bar{C}(t_k)^{-1} \bar{W} \Big|_{p^*, t_k} \quad (3.14)$$

mit der Differentialgleichung 3.15 der relativen Sensitivität W für dynamische Systeme und der Covarianzmatrix des Messrauschens C , die mit der konsistenten Anfangsbedingung $W(0) = 0$ gelöst wird.

$$\dot{W}_x = \frac{\partial r(t, x, p)}{\partial x} W_x(t, x) + \frac{\partial r(t, x, p)}{\partial p} \quad (3.15)$$

Hierbei ist \bar{W} die skalierte Form des Sensitivitätsdifferentials

$$\bar{W} = W \Lambda_p \quad (3.16)$$

mit Λ_p einer Diagonalmatrix, welche den Parametervektor p auf der Hauptdiagonalen enthält. Die Elemente der skalierten Covarianzmatrix \bar{C} des Messrauschens wurden gemäß Gleichung

3. Materialien und Methoden

3.17 entweder aus einem relativen Fehler r_i eines minimal messbaren Werts x^{min} oder, für den Fall $x > x^{min}$, aus dem relativen Fehler r_i des Messwerts x bestimmt. Der relative Fehler wurde mit 5 % angenommen. Der minimale Messwert für die Biomassekonzentration wurde mit $x_{cX}^{min} = 0,01$ g/l angenommen. Die untere Messgrenze des Glycolat-Konzentration betrug $x_{cGlyc}^{min} = 1$ mg/l.

$$\sigma_{ii}(t_k) = r_i^2 (\max(x_i(t_k), x_i^{min}))^2 \quad (3.17)$$

Die untere Schranke γ_{li} der relativen Streuung des Parameters i berechnet sich aus

$$\gamma_{li} = \sqrt{\bar{s}_{jj}} \quad (3.18)$$

mit \bar{s}_{jj} den Elementen der Hauptdiagonalen der invertierten und skalierten Fisher- Informationsmatrix \bar{F} .

3.5.5. Energetischer Vergleich von Bioreaktoren

Die aufzubringende Arbeit für den Betrieb des Reaktors wurde nach Gleichung 3.19 für die technische Arbeit stationär durchströmter Kontrollräume berechnet.

$$l_{12} = - \int_1^2 v \, dp + \frac{1}{2} w^2 + gz \quad (3.19)$$

Wobei l_{12} die Arbeit von Zustand 1 zu Zustand 2, v das molare Volumen, dp die Druckänderung, w die Geschwindigkeit g die Erdbeschleunigung und z die Höhe ist. Der Druckverlust von inkompressiblen Medien wurde nach der Darcy-Weisbach Gleichung berechnet (Gleichung 3.20)

$$\Delta p = \lambda \frac{l \rho w^2}{d^2} \quad (3.20)$$

mit λ dem Rohrreibungsbeiwert, l der Rohrlänge, d dem Innendurchmesser der Rohre, ρ der Dichte des Mediums, w der Rohrgeschwindigkeit. Für turbulente Strömung wurde der Rohrreibungsbeiwert berechnet nach der folgenden Gleichung

$$\lambda = \frac{0,3164}{Re^{0,25}} \quad (3.21)$$

mit der Reynoldszahl

$$Re = \frac{\rho w d}{\eta} \quad (3.22)$$

3. Materialien und Methoden

mit η der dynamischen Viskosität bzw. für laminare Strömung ($Re \leq 2300$).

$$\lambda = \frac{64}{Re} \quad (3.23)$$

Für eckige Querschnitte wurde prinzipiell genauso vorgegangen. Für Gleichung 3.20 wurde der hydraulische Durchmesser d_h

$$d_h = \frac{4A}{U} \quad (3.24)$$

aus der durchströmten Fläche A und dem überströmten Umfang U berechnet. Für die Berechnung der Verdichterleistung von Luft wurde die technische Arbeit

$$\int_1^2 v dp = \frac{n}{n-1} R T_1 \left(\frac{p_2}{p_1}^{\frac{n-1}{n}} - 1 \right) \quad (3.25)$$

für $pv^n = const$ und dem Polytropenexponent $n = 1,4$ für trockene Luft (bei 25°C) berechnet.

3.5.6. Verwendete Software

Simulation und Parameterschätzung

Für die Parameterschätzung und die Simulation der Prozesse wurde Matlab R2014b mit der Simulink Version 8.4 verwendet. Die Parameterschätzung erfolgte mit dem internen Interface. Die Anpassung erfolgte mit einem ode23 Algorithmus. Als Gütekriterium wurde eine nicht-lineare Kleinste-Quadrate-Methode in Kombination mit einem "Trust-Region-Reflective"-Algorithmus verwendet. Optimierungskriterium waren eine Parametertoleranz von $1e-8$ und eine Funktionstoleranz von $1e-10$.

Schätzfehler

Für die symbolische Berechnung des Modells und die Berechnung des Parameterschätzfehlers durch die Fisher-Analyse wurde Maple 17 verwendet.

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

Die Glycolatproduktion der RuBisCO kann, wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben, über das Verhältnis der Partialdrücke von O_2 und CO_2 induziert werden. Eine aktive Anreicherung von CO_2 durch Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismen sowie der Stoffwechselweg des Glycolatreyclings verhindern in der Wildtypalge einen Kohlenstoff- und Energieverlust durch die Oxygenierungsreaktion der RuBisCO. Für die Produktion von Glycolat mit einem Organismus wird die Eignung einer Wildtypalge sowie einer CCM-Mutante untersucht und eine Auswahl getroffen (Abschnitt 4.2.2). Der Produktionsstamm wird hinsichtlich des Nährstoffbedarfs und der O_2 -Resistenz in Abschnitt 4.1.2 charakterisiert. Für eine genauere Untersuchung der *in situ*-Produktion von Glycolat wird in Abschnitt 4.2.2 eine Methodik entwickelt, um den Einfluss des CO_2 - und O_2 -Partialdrucks auf die Biomasse- und Glycolatbildung zu untersuchen. Außerdem erfolgt die Betrachtung der photosynthetischen Aktivität (YII) des Organismus. In Abschnitt 4.3.4 wird der Zusatz eines Hemmstoffes untersucht, um damit die Glycolatproduktion zu steigern.

4.1. Auswahl und Charakterisierung des Modellorganismus

Als Modellorganismus für die Prozessauslegung der Glycolatproduktion wurde eine Wildtypalge (WT 11-32b) und die CCM-Mutante *C. reinhardtii* CC1860 gewählt. Die pCO_2 -Kinetik von WT 11-32b zeigt, dass die Wildtypalge kein Glycolat exkretiert (Abschnitt 4.1.1). Die CCM-Mutante erweist sich hingegen als geeigneter Organismus für die Glycolatproduktion. Daher wurde der Organismus hinsichtlich des Nährstoffbedarfs an Stickstoff, Phosphor und Schwefel durch die Bestimmung der Ausbeutekoeffizienten $Y_{X,N}$, $Y_{X,P}$ und $Y_{X,S}$ charakterisiert. Des Weiteren wurde eine Lichtkinetik der CCM-Mutante *C. reinhardtii* CC1860 aufge-

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

nommen. Da O_2 toxisch auf die Zelle wirkt, wurde die Resistenz der Alge gegenüber hohem O_2 -Partialdruck überprüft.

4.1.1. pCO_2 -Kinetik des Wildtyps WT 11-32 b

Wie in Abschnitt 2.1.4 beschrieben, ist die Wildtypalge durch die Ausbildung von Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismen fähig aktiv CO_2 aufzunehmen. Zudem wird bei hoher Oxygenierungsrate der Recycling-Stoffwechselweg des Glycolats induziert, um den schon fixierten Kohlenstoff zurückzugewinnen. In einem Rührkessel-Modellreaktor im Turbidostat-Betrieb wurde untersucht, ob die Wildtypalge Glycolat exkretiert. Die Methodik ist in Abschnitt 3.2.3 beschrieben und wird in Abschnitt 4.3.1 näher erläutert. Als Modellalge hierfür wurde die Grünalge *C. reinhardtii* WT 11-32b gewählt. In dem Turbidostaten wurden CO_2 -Partialdrücke im Bereich von 0,038 % bis 2,0 % des Gesamtdrucks eingestellt. Der Sauerstoffpartialdruck wurde über die gesamte Prozesszeit konstant auf 42 % des Gesamtdrucks geregelt. Die Lichtintensität betrug über die gesamte Prozesszeit $I_0 = 320 \mu E/(m^2s)$ (gemessen mit einem sphärischen Sensor im Lichtgleichverteilungspunkt des Reaktors). Die experimentell bestimmte CO_2 -Abhängigkeit der Wachstumsrate zeigt Abbildung 4.1.

Es wird deutlich, dass maximale Wachstumsraten von $\mu = 2,7 \text{ 1/d}$ bis zu einem Partialdruck

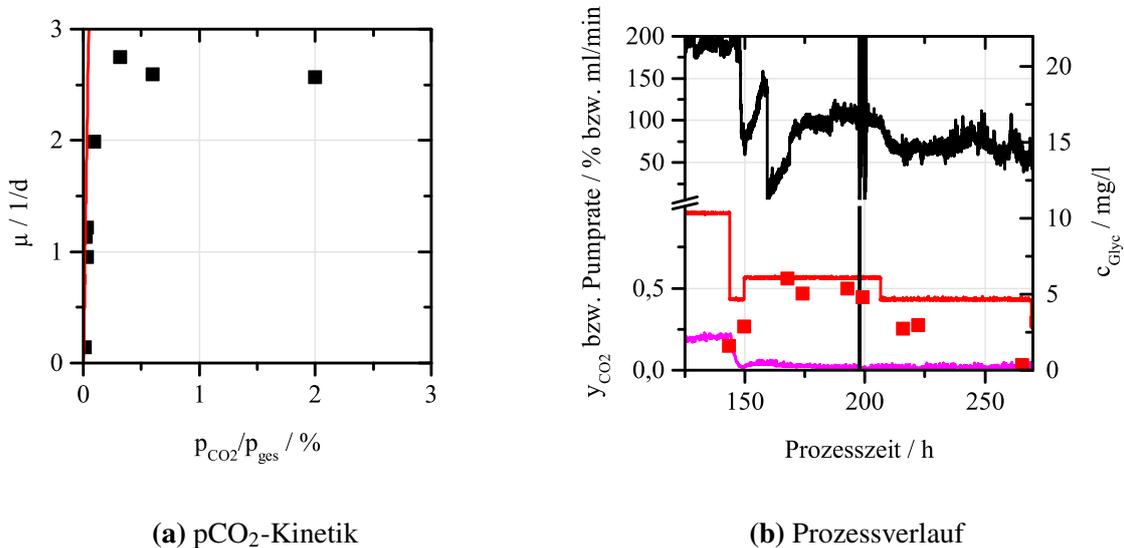


Abbildung 4.1.: Aufgenommene pCO_2 -Kinetik von WT 11-32b (a) (■) Gemessene Wachstumsrate und über den Stofftransport von CO_2 (—) berechnete Wachstumsrate (b) (—) Volumenfluss des Mediums bei geringen CO_2 -Anteilen in (—) Zugas und (—) Abgas sowie (■) gemessene Glycolatkonzentration

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

von 0,2 % CO₂ des Gesamtdrucks erreicht werden können. Dabei ist bei höheren Partialdrücken eine leichte Verringerung auf 2,6 1/d bei 2 % CO₂ des Gesamtdrucks erkennbar. Ein Vergleich mit der RuBisCO-Kinetik in Abbildung 2.4b zeigt, dass die Wachstumsrate nicht gemäß den Erwartungen der RuBisCO-Carboxylierungsrate mit Verringerung des CO₂-Partialdrucks abfällt. Nach der reinen RuBisCO-Kinetik, Abschnitt 2.1.1, werden bei einem CO₂-Partialdruck von 0,2 % und einem O₂-Partialdruck von 42 % des Gesamtdrucks Carboxylierungsraten von $r_C/r_{C,max} = 53$ % erreicht. Diese Reduktion der Carboxylierungsrate der reinen RuBisCO-Kinetik ist nicht anhand der Wachstumsraten der Wildtypalge erkennbar. Erst ab CO₂-Partialdrücken zwischen 0,2 % und 0,04 % des Gesamtdrucks ist eine Verminderung des Wachstums zu erkennen. Bei diesen Partialdrücken beträgt die Carboxylierungsrate der aufgereinigten RuBisCO zwischen 18 bzw. 33 % ihrer maximalen Rate. Zusätzlich wird im Folgenden der Kohlenstoffstrom in den Reaktor betrachtet. Aufgrund des Stoffübergangskoeffizienten des Reaktors (s. Abschnitt 3.5.2) wurde der Kohlenstoffeintrag von der Gas in die Flüssigphase des Reaktors berechnet und hieraus die maximal erreichbare Wachstumsrate in dem Reaktor ermittelt. Hierzu wurde angenommen, dass der massenbezogene Kohlenstoffanteil der Algen $e_{C,X} = 0,5$ gC/g_X beträgt [143, 50]. In Abbildung 4.1a sind die so berechnete und die gemessene Wachstumsrate aufgetragen. Die Abnahme der Wachstumsrate geht einher mit der Verminderung des Kohlenstoffeintrags von Gas- zu Flüssigphase. Wie in Abbildung 4.1b deutlich wird, ist der Kohlenstoffanteil im Abgas ab einer Prozesszeit von ca. 175 h nahe Null. Eine Verringerung des CO₂-Anteils im Zugas führt zu einer Abnahme der Wachstumsrate aufgrund einer limitierenden Kohlenstoffdioxid-Versorgung. Sowohl die differentielle Bilanz über den Stofftransport wie auch die integrale Bilanz über das Zu- und Abgas zeigen, dass bei CO₂-Partialdrücken von unter 0,1 % des Gesamtdrucks kein maximales Wachstum möglich ist, da der Kohlenstoffeintrag zu gering ist zu. Die hohe Wachstumsrate kann auf die Ausbildung von CCMs zurückgeführt werden, welche durch die aktive Erhöhung des intrazellulären CO₂-Partialdrucks hohe Carboxylierungsraten der RuBisCO ermöglichen. Ein Anstieg der Glycolatkonzentration bei einer Prozesszeit von ca. 125 h lässt eine Induktion der CCMs bei einem CO₂-Partialdruck von ca. 0,5 % des Gesamtdrucks vermuten. Die Glycolatexkretion wird jedoch von dem Wildtyp effektiv verhindert. Die Glycolatkonzentration liegt unterhalb von 6 mg/l. In dem Prozesszeitraum von ca. 150 bis 175 h beträgt die spezifische Produktionsrate $r_{Glyc} = 0,8$ mg/g/h. Danach geht diese auf eine spezifische Rate von 0,48 mg/g/h zurück.

4.1.2. Nährstoffbedarf von CC1860

Die Ausbeutekoeffizienten wurden in einem Batch-Experiment im Rührkessel bestimmt (s. Abschnitt 3.2.3). Als Grundlage für weitere Kultivierungen wurde das Standard-TAP-Medium für *C. reinhardtii* modifiziert (s. Anhang A.1). Da die Kultivierungen rein phototroph sein sollten und der pH in dem Rührkessel geregelt werden kann, wurde auf die organische C-Quelle Acetat und den Tris-Puffer verzichtet. Die Konzentrationen von Ammonium, Phosphat und Sulfat wurden durch ionenchromatographische Analyse des Mediumüberstandes zu verschiedenen Prozesszeiten bestimmt und hieraus die Aufnahme des Organismus berechnet. Die Ausbeutekoeffizienten $Y_{X,N}$, $Y_{X,P}$ und $Y_{X,S}$ wurden aus dem Quotienten der Biomassebildungs- bzw. Nährstoffaufnahmearten gebildet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Stickstoffquelle ist bei dem gewählten Medium die erste limitierende Komponente. Phosphor und Schwefel sind im Überschuss vorhanden. Das Medium wurde trotz dieser Erkenntnis nicht weiter in seiner relativen Zusammensetzung optimiert. Die Konzentrationen der Makroelemente Stickstoff, Phosphor und Schwefel wurden jedoch gegenüber dem standardmäßigen Medium verdoppelt, um höhere Biomassen von ca. $c_X = 2,07$ g/L ohne eine Nährstofflimitierung zu erreichen.

Tabelle 4.1.: Ausbeutekoeffizienten $Y_{X,j}$ bzw. der Biomasseanteil $e_{X,j}$ des Organismus *C. reinhardtii* CC1860 bei den CO_2 -Partialdrücken von 2 % und 0,12 % des Gesamtdrucks.

Komponente j	$p_{\text{CO}_2}/p_{\text{ges}} = 2 \%$		$p_{\text{CO}_2}/p_{\text{ges}} = 0,12 \%$	
	$Y_{X,j}$	$e_{j,X}$	$Y_{X,j}$	$e_{j,X}$
	in g _X /g _j	in g _j /g _X	in g _X /g _j	in g _j /g _X
N	9,39	0,1065	10,87	0,092
P	77,52	0,0129	192,31	0,0052
S	116,28	0,0086	227,27	0,0044

4.1.3. Lichtkinetik des Organismus CC1860

Eine Lichtkinetik wurde in zwölf Batch-Ansätzen in Mini-Plattenreaktoren erstellt (s. Abschnitt 3.2.2 für das experimentelle Vorgehen). Um die reine Betrachtung der Lichtabhängigkeit zu gewährleisten, wurde ein CO_2 -Zuganteil von 5 % (v/v) gewählt. Des Weiteren

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

wurden die Mini-Plattenreaktoren mit einem 2-fachen TP-Medium, nach Anhang A.1, angesetzt, welches Biomassekonzentrationen von bis zu $c_x = 2 \text{ g/l}$ ermöglicht. Die erste Probe wurde nach 12 h genommen, um das Photosystem der Algen adaptieren zu lassen. Das Lichtprofil in Mini-Plattenreaktoren ändert sich über den Prozessverlauf wodurch das Wachstum von exponentiellem in lineares übergeht. Mittels halblogarithmischer Auftragung wurde der exponentielle Bereich des Wachstums bestimmt, welcher für die Auswertung der spezifischen Wachstumsraten verwendet wurde. Die ermittelten spezifischen Wachstumsraten μ sind in Abbildung 4.2a in Abhängigkeit von der eingestrahlichten Lichtintensität aufgetragen.

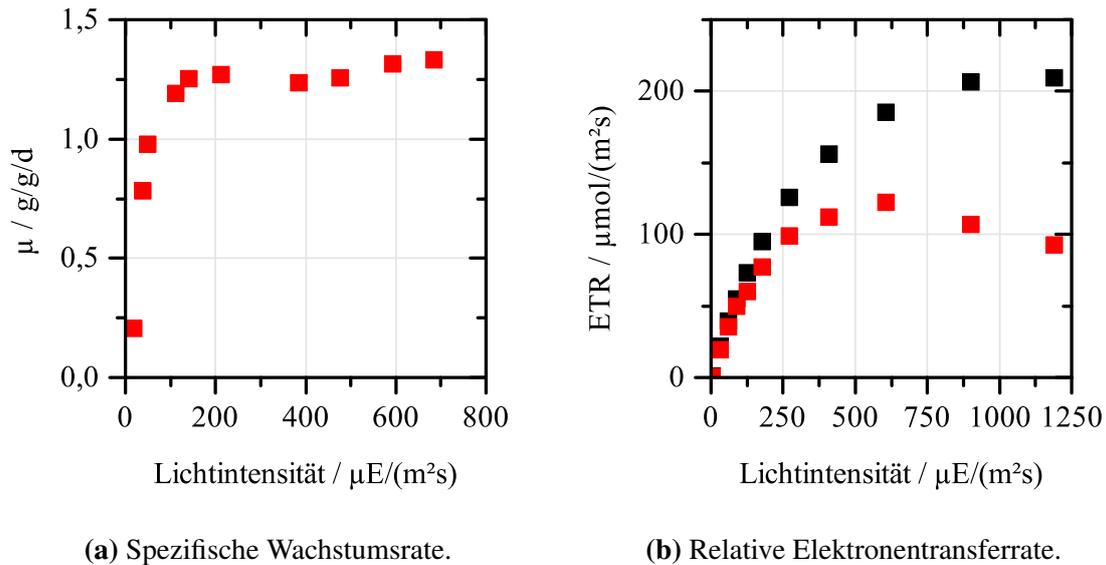


Abbildung 4.2.: (a) Lichtkinetik von *C. reinhardtii* CC1860, aufgenommen in Mini-Plattenreaktoren bei einem CO_2 -Partialdruck von 5 % des Gesamtdrucks. (b) Relative Elektronentransferrate von *C. reinhardtii* (■) CC1860 und dem (■) Wildtyp WT 11-32 b bei einem CO_2 -Partialdruck von 2,5 % des Gesamtdrucks.

Der Organismus CC1860 erreicht seine maximale Wachstumsrate bei einer Lichtintensität von ca. $I = 150 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$. Eine Lichtinhibierung kann bis zu einer Lichtintensität von ca. $I = 700 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ ausgeschlossen werden. Bei der Aufnahme der Wachstumsrate in den Mini-Plattenreaktoren wird die Wachstumsrate des gesamten Organismus betrachtet. Dies schließt das Photosystem für die Energieumwandlung und die enzymatischen Schritte zur Kohlenstofffixierung ein. Ergänzend hierzu wurde mittels PAM-Analytik die alleinige Abhängigkeit des Photosystems von der Lichtintensität betrachtet. Hierzu wurde die photosynthetische Aktivität (YII) des Organismus bei verschiedenen Lichtintensitäten bestimmt (s. Abschnitt 3.4.6) und die Elektronentransferrate ETR berechnet (Gleichung 2.10). Abbildung 4.2b zeigt die Lichtkurve für den Organismus *C. reinhardtii* CC1860 und den Wildtyp WT 11-32 b. Die Algen

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

wurden einer Kultivierung im Rührkessel (Lichtintensität von $I = 320 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ am Lichtgleichverteilungspunkt) entnommen. Die Kinetik des Photosystems von CC1860 ist oberhalb einer Lichtintensität von ca. $415 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ maximal. Das Photosystem sättigt somit bei höheren Lichtintensitäten als die Wachstumsrate des Gesamtorganismus ab. Eine Lichtinhibierung des Photosystems von CC1860 liegt ab einer Intensität von $1200 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ vor. Insgesamt ist die relative Elektronentransportrate geringer als die der Wildtypalge WT 11-32 b. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der maximal erreichbaren spezifischen Wachstumsrate der Wildtypalge von über $\mu = 2 \text{ 1/d}$ (s. Abbildung 4.1).

4.1.4. Abhängigkeit der Wachstumsrate vom O_2 -Partialdruck

Wie in Abschnitt 2.1.1 gezeigt, sind die Carboxylierungs- und Oxygenierungsreaktion der RubisCO abhängig von dem O_2 - und CO_2 -Partialdruck im Medium. Für die Betrachtung der Kinetik der aufgereinigten RuBisCO sind in der Literatur Experimente mit sehr hohen Sauerstoffanteilen beschrieben. Neben der Beeinflussung der RuBisCO-Reaktion haben hohe O_2 -Partialdrücke noch weitere Auswirkungen auf den Gesamtorganismus, z.B. die Bildung von Sauerstoffradikalen. Für verschiedene Grünalgen sind in der Literatur maximale Konzentrationen zwischen 60 % [144] und 95 % [145] beschrieben. Die beschriebenen Sauerstoffkinetiken wurden mit Wildtypalgen erstellt, welche aktiv CO_2 im Zellinneren anreichern können. Die aktive CO_2 Aufnahme verändert das Verhältnis von CO_2 zu O_2 im Zellinneren. Um den vitalen Bereich des Organismus *C. reinhardtii* CC1860 zu ermitteln, wurde eine pO_2 -Kinetik im Rührkessel im Turbidostat-Modus angefertigt. Der experimentelle Aufbau wird in Abschnitt 3.2.3 beschrieben. Die Lichtintensität betrug $I_0 = 288 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ im Lichtgleichverteilungspunkt. Eine Betrachtung der RuBisCO-Kinetik zeigt, dass ein CO_2 -Partialdruck von 2 % des Gesamtdrucks ausreicht, um auch bei hohem O_2 -Partialdruck (bis zu 98% des Gesamtdrucks) eine Carboxylierung von $r_C/r_{C,max}$ von über 95 % zu erreichen. In dem Experiment wurde ein CO_2 -Partialdruck von minimal 2 % des Gesamtdrucks vorgelegt. Der O_2 -Partialdruck wurde aufsteigend variiert. Der Prozessverlauf ist in Abbildung B.1 abgebildet. Abbildung B.2 gibt die berechneten Wachstumsraten in Abhängigkeit vom Sauerstoffanteil wieder.

Die pO_2 -Kinetik ergibt bei einem O_2 -Partialdruck von 40 % des Gesamtdrucks eine maximale spezifische Wachstumsrate von 0,9 1/d. Der Vergleich mit der in Abbildung 4.2 aufgenommenen Lichtkinetik zeigt, dass die Algen bei der eingestellten Lichtintensität von $288 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ nicht die maximale spezifische Wachstumsrate erreichen (s. Abbildung 4.2a). Dies ist auf eine Lichtlimitierung zurückzuführen, nicht auf den O_2 -Partialdruck (s. Abschnitt 5.4). Eine Ab-

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

nahme der Wachstumsrate ist ab einem Sauerstoffanteil von 70 % zu beobachten. Sie erreicht ab einem Sauerstoffanteil von 90 % ein Wachstum von Null. Die genaue Betrachtung der zeitlich abgeleiteten Mediumflussrate zeigt eine kontinuierliche Abnahme der Wachstumsrate ($\mu = D$ für $dc_X/dt = 0$) bei Sauerstoffanteilen von über 70 %. Die kontinuierliche Abnahme der Wachstumsrate ist auf eine Schädigung des Gesamtorganismus zurückzuführen. Die Enzymkinetik der reinen RuBisCO ließe eine sofortige Änderung der Wachstumsrate erwarten (s. Gleichung 2.3 bzw. 2.4). Auch eine Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks verändert die Abnahme der spezifischen Wachstumsrate bei hohem O_2 -Partialdruck nicht. Es kann somit von einer Schädigung des Gesamtorganismus durch einen O_2 -Partialdruck oberhalb von ca. 70 % des Gesamtdrucks ausgegangen werden.

4.2. Glycolatproduktion in kurzzeitigen Batch-Experimenten

Die Glycolatexkretion der CCM-Mutante *C. reinhardtii* CC1860 wurde in kurzzeitigen Mini-Plattenreaktoren untersucht. Dieser Reaktortyp ist gut parallelisierbar und weist eine geringe Rüstzeit auf. Die Mess- und Regelungstechnik in dem Aufbau der parallelisierten Plattenreaktoren ist jedoch sehr begrenzt. Die Temperatur ist über einen Thermostrom regelbar, nicht jedoch pH, $p\text{CO}_2$ oder $p\text{O}_2$. Es können nur Offline-Messungen durchgeführt werden. Für die Validierung des Prozesses wurde ein Mini-Plattenreaktor mit höheren mess- und regelungstechnischen Möglichkeiten konzipiert (siehe Abschnitt 3.2.2). Dieser Reaktor ist zwar nicht parallelisierbar, erlaubt jedoch die Online-Messung von pH, Gaspartialdrücken in Flüssigkeit und im Abgas sowie der Fluoreszenz mittels PAM-Sonde. Die Zielsetzung der Experimente war die kurzzeitige Untersuchung der Wachstums- und Glycolatproduktionsrate einer an hohe CO_2 -Partialdrücke adaptierten Alge durch Änderung des CO_2 - und O_2 -Partialdrucks. In diesem Abschnitt wird das System charakterisiert und die Aussagefähigkeit der Erkenntnisse aus den Mini-Plattenreaktor-Experimenten validiert. Im Weiteren werden die Ergebnisse zum Wachstum und zur Glycolatproduktion bei unterschiedlichen CO_2 -Partialdrücken vorgestellt. Die Methodik der Mini-Plattenreaktor-Experimente führt Abschnitt 3.2.2 aus.

4.2.1. Glycolatproduktion in einem Mini-Plattenreaktor mit Online-Messtechnik zur Prozessvalidierung

Wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, wurde ein Mini-Plattenreaktor angefertigt, dessen Aufbau es erlaubt, ihn außerhalb des Brutschanks temperaturreguliert zu betreiben. So sind Online-Messungen in einem größeren Ausmaß möglich. In den folgenden Abbildungen ist der zeitliche Verlauf des Partialdrucks von CO_2 in Zu- und Abgas sowie in Lösung aufgetragen. Weitere Messgrößen sind pH und photosynthetische Aktivität (YII) sowie die Konzentrationen von Biomasse und Glycolat. Bei der Prozesszeit $PZ = 0$ h wurde der Prozess von Wachstumsbedingungen (1 % CO_2 im Zugas, $I_0 = 200 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$) auf Produktionsbedingungen von $p_{\text{CO}_2} = 0,192$ % und von $p_{\text{O}_2} = 42$ % des Gesamtdrucks umgestellt (siehe Abbildung 4.3). Es ist ein schnelles Abfallen des CO_2 -Gehalts im Abgas zu erkennen. Der Partialdruck des gelösten CO_2 sinkt ähnlich schnell auf einen Wert von ca. 0,12 % des Gesamtdrucks ab und nähert sich damit dem Wert des CO_2 -Partialdrucks im Abgas (Abweichung 0,02 % (v/v)). Durch den hohen Volumenstrom von 150 ml/min ist bei einem gemessenen k_{Ia} von 0,18 1/min nach Gleichung 3.9 ein Equilibrium innerhalb von 32 min zu erwarten. Die Verzögerung von 2,5 h kann auf die Verwendung einer verhältnismäßig trägen p_{CO_2} -Sonde oder der trägen Einstellung des Gleichgewichts zwischen HCO_3^- und CO_2 zurückgeführt werden. Bis zu einer Prozesszeit von 30 h ist die CO_2 -Konzentration stabil. Mit der Reduktion des CO_2 -Partialdrucks nimmt die Photonenausbeute (YII) in einem Zeitraum von 30 h von etwa 0,7 auf 0,4 ab (s. Abbildung 4.4). Der pH sinkt in der Kultivierungszeit von 30 h auf einen Wert von 6,9. Die pH-Änderung führt zu einer Verschiebung des Carbonat-Gleichgewichts von HCO_3^- zu gelöstem CO_2 . Dies stellt neben dem CO_2 im Zugas eine weitere CO_2 -Quelle im Reaktor dar. Eine Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks in der Flüssigphase oder des CO_2 -Anteils im Abgas ist jedoch nicht erkennbar. Es sind zwei zeitliche Produktionsbereiche von Glycolat zu erkennen. Die Glycolatproduktion liegt in dem Zeitraum zwischen 0 bis 22,3 h bei einer volumetrischen Produktivität von 5,96 mg/l/h (bestimmt mittels linearer Korrelation, s. Abbildung 4.4) bzw. biomassespezifisch zwischen 0,13 und 0,1 g/g/d. Die Differenz in den Werten ist auf die Zunahme der Biomassekonzentration zurückzuführen. Ab einer Prozesszeit von 22,3 h verringert sich die Glycolatproduktionsrate auf ca. 0,04 g/g/d. In den entsprechenden Zeiträumen beträgt die volumetrische Wachstumsrate 12,53 mg/l/h bzw. 7,18 mg/l/h. Dies entspricht einer spezifischen Wachstumsrate von 0,27 bis 0,20 g/g/d. Ab einer Prozesszeit von 30 h nehmen der CO_2 -Partialdruck in der Lösung und der im Abgas gemessene CO_2 -Anteil zu. Die Photonenausbeute (YII) ist von diesem Zeitpunkt an stabil und beträgt 0,4.

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

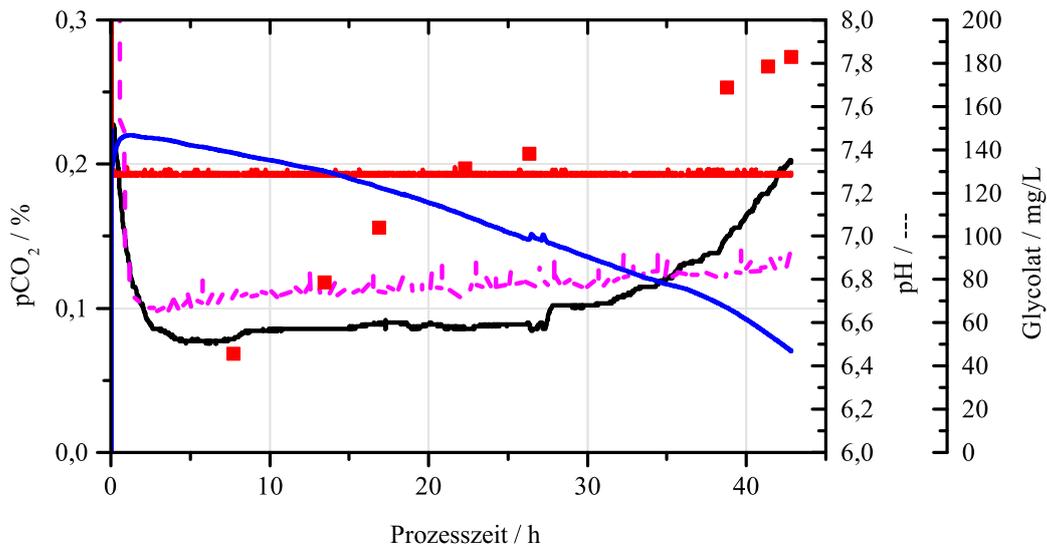


Abbildung 4.3.: Kurzzeit-Experiment im Mini-Plattenreaktor; Umstellung der Prozessbedingungen bei PZ = 0 h durch Reduktion des CO₂-Partialdrucks im Zugas auf 0,19 % und Erhöhung des O₂-Partialdrucks auf 42 % des Gesamtdrucks. CO₂-Partialdruck in (—) Zu- und (---) Abgas sowie in (—) gelöster Form, (—) pH-Wert und (■) Glycolatkonzentration.

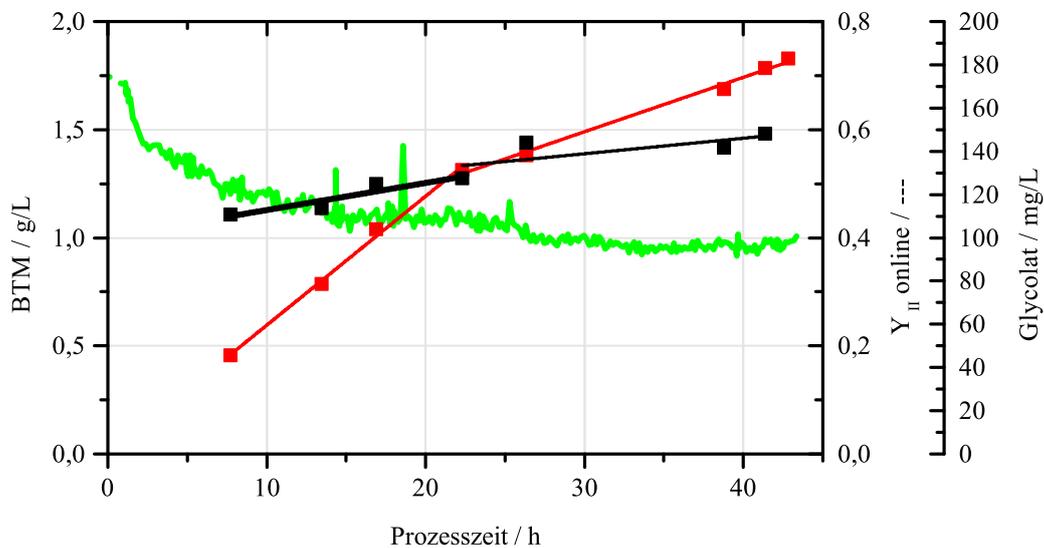
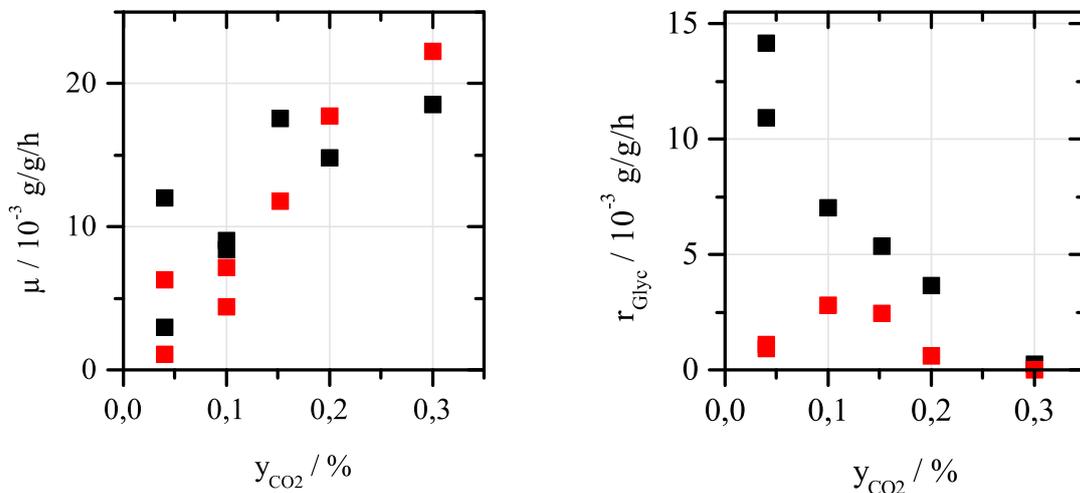


Abbildung 4.4.: Kurzzeit-Experiment im erweiterten Mini-Plattenreaktor (Prozesseinstellungen s. Abbildung 4.3); (---) online gemessene photosynthetische Aktivität (YII), (—) Biomassekonzentration und (■) Glycolatkonzentration mit jeweiliger (—, —) linearer Interpolation in den Zeitbereichen von 0 bis 22,3 h und von 22,3 bis 43 h.

4.2.2. Kurzzeitige Glycolatproduktion von *C. reinhardtii* CC1860

In Mini-Plattenreaktoren wurden unterschiedliche CO_2 -Partialdrücke zwischen 0,3 % und 0,038 % des Gesamtdrucks eingestellt. Die Photonенflussrate betrug bei jedem Experiment $200 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$, der Sauerstoffpartialdruck 42 % des Gesamtdrucks. Die Vorgehensweise ist in Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Die einzelnen zeitlichen Prozessverläufe sind in Anhang B.3 aufgeführt. Die relativen zeitlichen Verläufe der Biomasse- und Glycolatkonzentrationen ähneln denen aus Abschnitt 4.2.1. Wie dort erläutert, sind zwei zeitliche Bereiche mit unterschiedlichen Bildungsrate zu erkennen. Die Bildungsrate von Glycolat und Biomasse ist direkt nach der Umstellung der Prozessbedingungen zu geringerem CO_2 -Partialdruck höher. Die jeweiligen spezifischen Raten der beiden Bereiche wurden durch lineare Regression der Glycolat- und Biomassekonzentration ermittelt. Der Schnittpunkt der beiden linearen Bereiche, d.h. dem Zeitpunkt, zu dem die Änderung der Bildungsrate erfolgt, betragen für die CO_2 -Partialdrücke von 0,038 bzw. 0,1; 0,2; 0,3 % des Gesamtdrucks die Prozesszeiten von 20,49; 20,98; 24,96 bzw. 26,56 h. Die berechneten spezifischen Biomasse- und Produktbildungsrate für die zwei Zeiträume sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Durch die Auswertung der Bildungsrate mittels linearer Regression und der gleichzeitigen Zunahme der Biomassekonzentration in diesem Zeitraum ändern sich die berechnete spezifische Bildungsrate von Biomasse und Glycolat. Dargestellt sind die mittleren Bildungsrate. Die spezifische Wach-



(a) Spezifische Biomassebildungsrate.

(b) Spezifische Glycolatbildungsrate.

Abbildung 4.5.: Spezifische Bildungsrate in Mini-Plattenreaktoren von (a) Biomasse und (b) Glycolat im jeweils (■) ersten und (■) zweiten Zeitbereich in Abhängigkeit des CO_2 -Anteils im Zugas bei 42% O_2 (v/v) und einer Lichtintensität von $200 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$.

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

tumsrate der Biomasse verringert sich von 0,02 g/g/d bei 0,3 % CO₂ annähernd linear mit abnehmendem CO₂-Partialdruck. In den beiden Zeitbereichen verhalten sich die Wachstumsraten der Biomasse ähnlich. Ab einem CO₂-Partialdruck von 0,3 % des Gesamtdrucks im Zugas ist eine Glycolatexkretion messbar. Für den ersten Zeitbereich (Bereich 1) ist die Produktionsrate höher und nimmt bis zu einer maximalen Produktionsrate von $14,16 \cdot 10^{-3}$ g/g/d zu. Im zweiten Zeitbereich ist die Glycolatproduktion mit maximal $2,7 \cdot 10^{-3}$ g/g/h geringer. Bei einem CO₂-Partialdruck von ca. 0,15 ... 0,1 % des Gesamtdrucks erreicht die Glycolatproduktion ein Optimum. Bei geringeren CO₂-Partialdrücken nimmt die Glycolatbildung ab. Die Carboxylierungsrate des Organismus (r_A) wurde durch Berücksichtigung der Biomasse (mit einem Kohlenstoffanteil von $e_{C,X} = 0,5$ gC/g_X) und Glycolat ermittelt; Die Oxygenierungsrate (r_{Glyc}) entsprechend durch die Exkretion von Glycolat. In dem ersten Zeitbereich wird bei einem CO₂-Partialdruck von 0,1 % und 0,04 % ein Verhältnis von Kohlenstoffassimilierungsrate zu Glycolatproduktionsrate $r_A/r_{Glyc} = 3,8$ bzw. 3,5 erreicht. Dies entspricht dem zu erwartenden Verhältnis der RuBisCO-Parameter $r_{C,max}$ zu $r_{O,max}$ (Tabelle 2.1). In dem zweiten Zeitbereich wird ein wesentlich höheres Verhältnis von r_A/r_{Glyc} erreicht. Die Carboxylierungsrate ist hier höher als die Oxygenierungsrate. Das Optimum im zweiten Zeitbereich von ca. 0,1 % CO₂ bzw. $c_{CO_2} = 3,4 \cdot 10^{-5}$ liegt im Konzentrationsbereich der aufgereinigten RuBisCO ($k_C = 2,9 \cdot 10^{-5}$).

4.3. Glycolatproduktion in quasistationärem Zustand

4.3.1. Entwicklung einer Methodik zur Aufnahme einer pCO₂/pO₂-Kinetik unter konstanten Lichtbedingungen

Für eine Bestimmung der quasistationären Wachstums- und Glycolatproduktionsraten in Abhängigkeit vom O₂- und CO₂-Partialdruck unter definierten Lichtbedingungen wurde ein Rührkesselreaktor im Turbidostat-Betrieb etabliert. Das Turbidostat-System wurde so ausgelegt, dass die Lichtintensität über den Reaktorquerschnitt bestmöglich konstant war und somit eine definierte Beleuchtung der Algen über die gesamte Prozesszeit gewährleistet war (s. Abschnitt 3.2.3). So konnte die Wachstums- und Glycolatproduktionsrate bei verschiedenen Gaspartialdrücken unabhängig von der Beleuchtung betrachtet werden. Der experimentelle Aufbau des Reaktors, die Charakterisierung des Lichtprofils und die Auslegung der Regelung der optischen Dichte werden näher in 3.2.3 beschrieben. Tabelle 4.2 führt die experimentellen Parameter der Kultivierungen auf. Die sphärische Photonflussrate gibt die Lichtintensität im

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

Lichtgleichverteilungspunkt an (s. Abschnitt 3.2.3). Der Wert des planaren Sensors ist die gemessene Photonenflussrate des LED-Mantels. Im Folgenden wird die Auswertung für die Bestimmung der Glycolat- und Biomasseproduktion am Beispiel des Experiments CCM3 beschrieben. Die Ergebnisse der Experimente im Turbidostat-Betrieb werden zusammenfassend in Abschnitt 4.3.2 dargestellt.

Abbildung 4.6 zeigt die online gemessenen Daten der optischen Dichte und der Partialdrücke

Tabelle 4.2.: Auflistung der experimentellen Einstellungen der Experimente im Turbidostat. Der p_{CO_2} - variierte in den einzelnen Experimenten zwischen 0,038 und 2,7 % des Gesamtdrucks. Die gemessene Lichtintensität des spärlichen Sensors ist abhängig von OD, Chlorophyllgehalt und Position in Reaktor. Die Experimente CCM3, CCM4 und EZA werden im Folgenden zusammenfassend als Experimente bei $340 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ bezeichnet.

Experiment	$p_{\text{O}_2}/p_{\text{ges}}$	Photonenflussrate	Photonenflussrate
		(sphärischer Sensor)	(planarer Sensor)
	in %	in $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$	in $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$
CCM2	21	147,2	114,5
CCM3	42	347,3	238,9
CCM4	16	347,6	248,9
EZA	42 bis 45	317,7	219,4

von CO_2 und O_2 im Zu- sowie im Abgas. Der Partialdruck von O_2 wurde über den Prozessverlauf gemessen und über diesen, wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben, der Anteil von O_2 im Zugas geregelt. In diesem Beispielprozess erfolgte die Regelung des O_2 -Partialdrucks auf 42 % des Gesamtdrucks. Bis auf den Zeitraum von 106 h bis 167 h konnte der O_2 -Partialdruck konstant durch den Regler eingestellt werden. Grund für die Abweichung in dem Zeitraum zwischen 106 h und 167 h war die Begrenzung des O_2 -Anteils im Zugas auf einen Maximalwert. Eine Korrektur dieses maximal einstellbaren Anteils von O_2 erfolgte zum Zeitpunkt von 167 h. Über den Prozessverlauf wurde der CO_2 -Anteil in der Zuluft stufenweise verringert und jeweils bis zum Erreichen des jeweiligen quasistationären Gleichgewichts gehalten. Der CO_2 -Anteil im Abgas wurde zur Bestimmung des CO_2 -Partialdrucks im Reaktor verwendet. In Abbildung 4.7 sind neben dem CO_2 -Partialdruck auch die Flussrate des Mediums, berechnet aus der Änderung des Waagensignals, und die Glycolatkonzentration im Medium abgebildet. Aus den Konzentrationen und der Verdünnungsrate wurden Glycolat- und Biomassebildungsraten nach Gleichung 3.7 bei konstantem Partialdruck berechnet. Ein Einfluss des CO_2 -Partialdrucks auf die Verdünnungsrate ist direkt bei Änderung der Gasmischung, wie

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

für eine Enzymkinetik zu erwarten, erkennbar. Nach Umstellung der Prozessparameter geht das Reaktorsystem hinsichtlich der Verdünnungsrate und der Gaszusammensetzung wieder in einen quasistationären Betrieb über. Längerfristige Änderungen etwa durch eine Anpassung des Metabolismus sind aus der Verdünnungsrate nicht erkennbar. Ab einer Prozesszeit von ca. 100 h nimmt der Medienstrom signifikant ab. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein CO₂-Partialdruck von 0,4 % des Gesamtdrucks eingestellt; dies führt zu einer Verringerung der spezifischen Wachstumsrate. Wegen der verringerten Photosyntheseleistung muss der O₂-Anteil im Zugas erhöht werden, um den O₂-Partialdruck konstant zu halten. Die Auswirkung der Reduktion des CO₂-Partialdrucks auf den Stärke- und Chlorophyllanteil der Alge sowie ihrer Fluoreszenz sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Bei Absenken des CO₂-Setpoints reagiert die Alge mit einer Verringerung des spezifischen Chlorophyll- und Stärkegehalts. Der Chlorophyllgehalt wie auch die photosynthetische Aktivität der dunkeladaptierten Zelle nehmen kontinuierlich ab. Beides deutet auf eine Verminderung der maximalen Photosyntheseleistung und damit auf einen geringeren Energiebedarf der Zellen hin. Die photosynthetische Aktivität der beleuchteten Alge (YII), bestimmt nach der Methodik in Abschnitt 3.4.6, nimmt jeweils nach Umstellung der Prozessbedingungen einen stationären Wert an. Die Glycolatkonzentration nimmt ab einer Prozesszeit von 200 h zu; hier beträgt der CO₂-Anteil im Medium 0,2 %. Bei diesem CO₂-Partialdruck ist zudem eine Verringerung des Stärkeanteils von 0,6 auf 0,4 g/g über den Prozesszeitraum von 200 bis 260 h zu beobachten. Der geringere Anteil von 0,4 g/g ist über die weitere Prozesszeit konstant. Bei einem CO₂-Partialdruck von 0,129 % des Gesamtdrucks ist die Verdünnungsrate D des Reaktors gleich Null. Von diesem Zeitpunkt an nimmt die über die optische Dichte ermittelte Biomassekonzentration ab (s. Abbildung 4.6).

4.3.2. pCO₂-/pO₂-Kinetik von *C. reinhardtii* CC1860

Bereits in den Mini-Plattenreaktoren konnte die Möglichkeit der Glycolatproduktion mit der CCM-Mutante *C. reinhardtii* CC1860 gezeigt werden (s. Abschnitt 4.2.2). Die Prozessführung in den Mini-Plattenreaktoren lässt jedoch nur bedingt belastbare Aussagen über die spezifischen Biomasse- und Glycolatproduktionsraten zu. Zum einen ist der pH-Wert nicht geregelt, wodurch das HCO₃⁻-CO₂-Gleichgewicht verschoben wird und die Konzentration von gelöstem CO₂ und Hydrogencarbonat variiert. Des Weiteren ist das Lichtprofil in den mit 200 µE/(m²s) beleuchteten Reaktoren bei 1 g/l Biomasse nicht homogen. Dies beeinflusst die Differenzierung zwischen der Kinetik der RuBisCO und des Photosystems. Überlagerte Effekte resultieren auch aus der Änderung der Zellzusammensetzung und der Induktion von Stoffwechselwegen. Durch die Batch-Experimente kann der Bereich, in dem Glycolat produziert

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

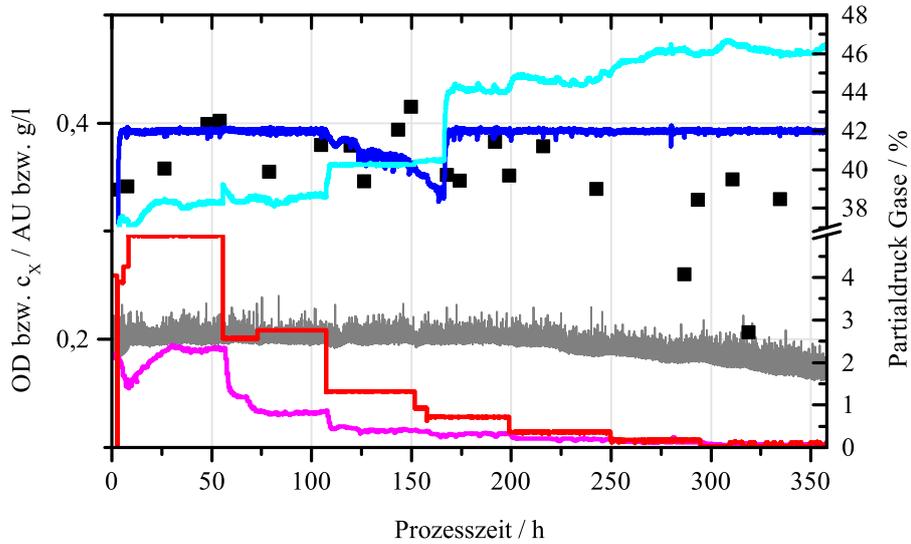


Abbildung 4.6.: Prozessparameter von Experiment CCM3: Partialdruck von O₂ in (—) Zugas und (—) Abgas sowie für CO₂ für (—) Zugas und (—) Abgas; (—) online ermittelte optische Dichte und (■) gravimetrisch bestimmte Biomassekonzentration

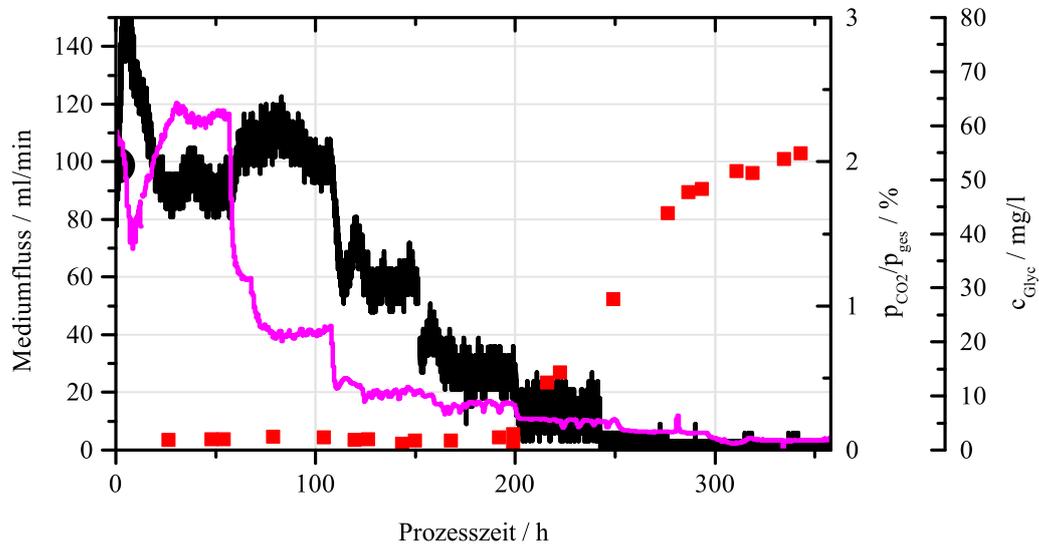


Abbildung 4.7.: Prozessparameter von Experiment CCM3: (—) Volumenflussrate des Mediums, (■) Glycolatkonzentration und (—) Partialdruck von CO₂ analog zu anderen Abbildungen.

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

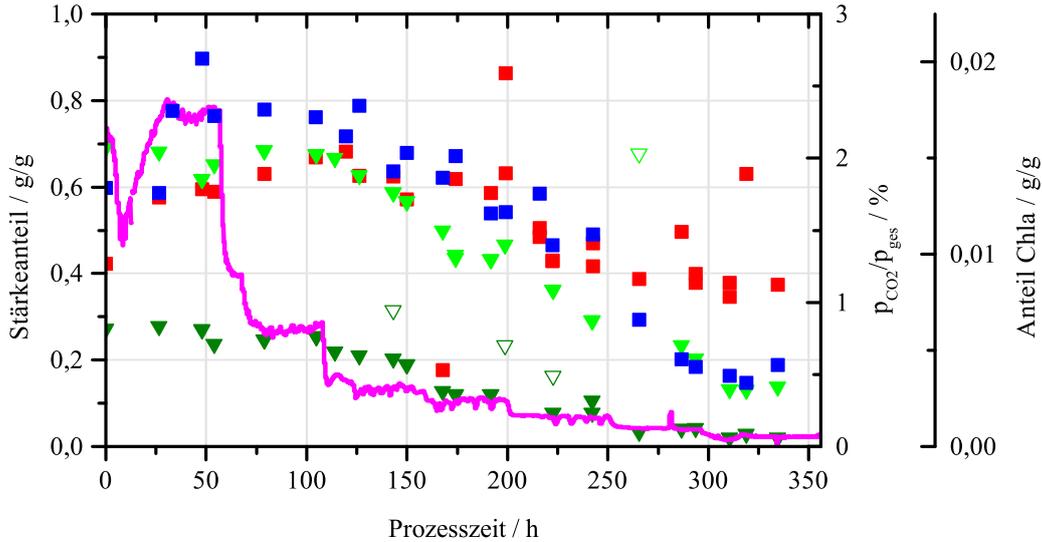


Abbildung 4.8.: Eigenschaften der Alge über die Prozesszeit von Experiment CCM3: (■) spezifischer Stärkeanteil und (■) spezifischer Chlorophyllanteil, (▼) YII bestimmt bei $347 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ und (▼) YII bestimmt bei $8 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ und (—) Partialdruck von CO_2 analog zu anderen Abbildungen.

wird, eingegrenzt werden. Die Genauigkeit der Ergebnisse ist für eine strukturierte Prozessauslegung und Modellierung jedoch unzureichend. Für die Bestimmung der Biomassebildung im quasistationären Zustand des Organismus sind Batch-Experimente in unregelmäßig Mini-Plattenreaktoren nicht geeignet. Die Abhängigkeit der Bildungskinetik von Biomasse und Glycolat wurde aus diesen Gründen in einem Modellreaktor im Turbidostat-Betrieb untersucht (s. Abschnitt 4.3.1). In den Experimenten CCM3 und CCM4 wurden O_2 -Partialdrücke von 16 und 42 % des Gesamtdrucks eingestellt. Die Lichtintensität betrug bei beiden Experimenten im Lichtgleichverteilungspunkt des Reaktors $347 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$. Dieser Wert liegt nach der in Abschnitt 4.1.3 bestimmten Lichtkinetik im lichtgesättigten Bereich des Biomassewachstums. Die Experimente waren darauf ausgerichtet, die Prozessbedingungen für die Glycolatbildung zu optimieren und die Kapazität der Glycolatproduktion zu ermitteln. Die Auswertung der Bildungsraten entsprach dem in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Vorgehen.

Die ermittelten spezifischen Biomasse- und Glycolatbildungsraten bei einem O_2 -Partialdruck von 16 bzw. 42 % sind in Abbildung 4.9 als Funktion des CO_2 -Partialdrucks aufgetragen. Die genauen Werte des O_2 - und CO_2 -Anteils sowie der berechneten Wachstums- und Glycolatbildungsraten sind in der Tabelle B.1 angegeben. Bei einem CO_2 -Anteil von über 0,8 % beträgt in beiden Experimenten die maximale bestimmte spezifische Wachstumsrate einem Wert von $\mu_{\text{max}} = 1,44 \text{ g/g/d}$. Dieser Wert ist 15 % höher im Vergleich zu dem bei der Aufnahme der Wachstumsrate in den Mini-Plattenreaktoren ($\mu_{\text{max, Miniplatte}} = 1,25 \text{ 1/d}$; s. Lichtki-

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

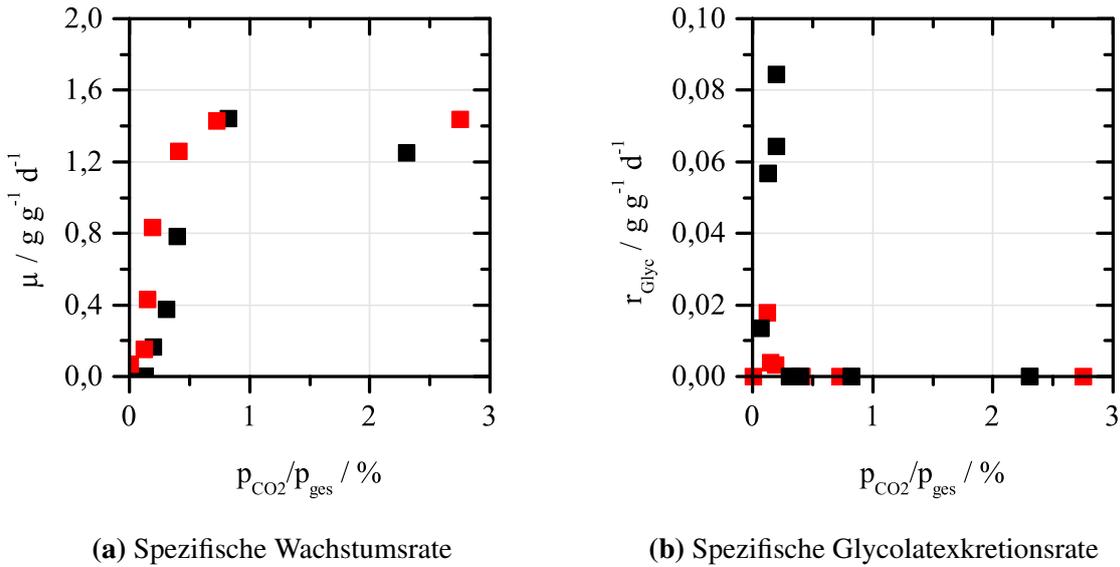


Abbildung 4.9.: CO₂-abhängige Kinetik der Wachstums- und Glycolatexkretionsrate von *C. reinhardtii* CC1860 bei einem O₂-Partialdruck von (■) 16 % bzw. (■) 42 % des Gesamtdrucks. Die Raten wurden bei einer Lichtintensität von 347 μE/(m²s) im Turbidostatbetrieb des Modellreaktors aufgenommen (CCM3 und CCM4).

netik in Abschnitt 4.1.3). Das nicht konstante Lichtprofil in dem Mini-Plattenreaktor kann zu einer Unterschätzung der maximalen Wachstumsrate führen. Unterhalb eines CO₂ Partialdrucks von 0,75 % des Gesamtdrucks nimmt die Wachstumsrate ab. Hierbei ist die Abnahme abhängig von dem herrschenden O₂-Partialdruck. Eine Erhöhung des O₂-Partialdrucks von 16 % auf 42 % des Gesamtdrucks führt zu einer Verschiebung der Wachstumskinetik zu geringeren CO₂-Anteilen. Eine Auftragung der Carboxylierungsrate r_A , berechnet aus der Assimilierungsrate von Kohlenstoff in Biomasse (mit $e_{C,X} = 0,5 \text{ gC/gX}$) und Glycolat, über das Partialdruckverhältnis p_{O_2}/p_{CO_2} in Abbildung 4.10 zeigt, dass die Carboxylierungsrate bei einem gleichen Partialdruckverhältnis die gleichen Werte annimmt. Unterhalb eines CO₂-Partialdrucks von ca. 0,12 % des Gesamtdrucks nimmt bei 42 % O₂ die Wachstumsrate einen Wert von $\mu = 0 \text{ 1/d}$ an. Für einen O₂-Partialdruck von 21 % des Gesamtdrucks liegt der Wert in einem ähnlichen Bereich. Glycolat wird bei einem O₂-Partialdruck von 42 % und einem CO₂-Partialdruck unter 0,25 % des Gesamtdrucks gebildet. Hierbei ist zu beachten, dass Glycolat erst zuverlässig nachgewiesen werden kann, wenn dessen Konzentration etwa 1 mg/l übersteigt. Die Produktion von Glycolat weist einen sehr steilen schmalen Peak in dem Bereich zwischen 0,1 und 0,2 % CO₂ des Gesamtdrucks auf. Die maximale Rate beträgt bei einem O₂-Partialdruck von 42 % des Gesamtdrucks $r_{Glyc} = 0,085 \text{ g/g/d}$. Bei dem geringeren O₂-Partialdruck von 16 % des Gesamtdrucks ist die Rate um etwa ein Fünftel geringer. Betragen

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

die CO_2 -Partialdrücke weniger als 0,1 % des Gesamtdrucks, so ist keine Glycolatproduktion mehr nachweisbar. Diese Abnahme der Glycolatproduktionsrate ist der verminderten Carboxylierungsreaktion zuzuschreiben.

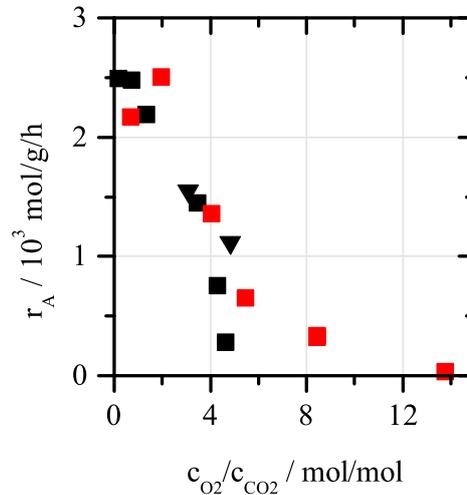


Abbildung 4.10.: Kohlenstoffassimilierungsrate als Funktion des Konzentrationsverhältnisses $c_{\text{O}_2}/p_{\text{CO}_2}$. Experimente (■) CCM2, (▼) CCM3 und (■) CCM4 bei einem O_2 -Partialdruck von 21 % (im RuBisCO-limitierten Bereich), 42 % und 16 % des Gesamtdrucks.

4.3.3. Energetische Betrachtung des Einflusses des CO_2 - und O_2 -Partialdrucks auf den Gesamtorganismus

Die Bildung von Glycolat und Biomasse ist sowohl abhängig von der Kinetik der RuBisCO und damit vom O_2 - und CO_2 -Partialdruck als auch von der Kinetik des Photosystems und damit von der zur Verfügung stehenden Lichtenergie. Die Betrachtung des Lichteinflusses erfolgte auf zwei Weisen. Zum einen wurde ein Experiment im Turbidostaten bei Lichtlimitierung durchgeführt (CCM2, s. Tabelle 4.2). Die aus diesem Experiment ermittelten Wachstums- und Glycolatbildungsraten sind mit den Ergebnissen aus Abschnitt 4.3.2 vergleichbar. Weiterhin erfolgte für die jeweiligen Experimente eine Bilanzierung der Photonen in photochemisches und nichtphotochemisches Quenchen. Hierzu wurde die photosynthetische Aktivität der Algen während des Prozesses gemessen. Da eine Online-Bestimmung der maximalen Fluoreszenz in dem Rührkessel nicht möglich war, wurden die Lichtkinetiken offline aufgenommen (beschrieben in Abschnitt 3.4.6). Zudem wurde der dunkeladaptierte Zustand des Photosystems bestimmt.

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

Die Abhängigkeit der Wachstumsrate bei 147 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ und 347 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ von dem CO_2 -Partialdruck ist in Abbildung 4.11a dargestellt. Die O_2 -Partialdrücke von 16 bzw. 21 % des Gesamtdrucks variieren leicht. Unter Annahme der Literaturdaten aus Tabelle 2.1 lässt sich die Auswirkung der unterschiedlichen O_2 -Partialdrücke abschätzen. Die Auswirkung auf die Carboxylierungsrate bedingt durch die Änderung des O_2 -Partialdrucks liegt im betrachteten CO_2 -Partialdrucksbereich bei unter 4 %. Die zwei Experimente sind somit sehr gut vergleichbar. Eine Betrachtung der Wachstumsrate bei geringerer Lichtintensität zeigt, dass die spezifi-

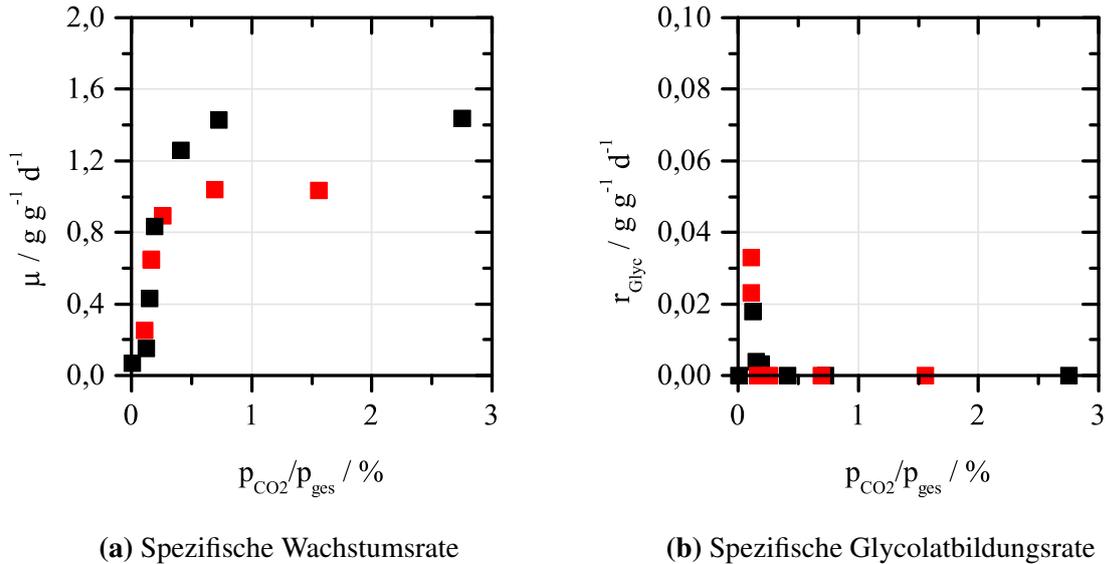


Abbildung 4.11.: CO_2 -Kinetik der spezifischen Wachstums- und Glycolatbildungsrate von *C. reinhardtii* CC1860 bei (■) 347 bzw. (■) 147 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$. Die Raten wurden aufgenommen bei dem O_2 -Partialdruck von 16 % bzw. 21 % des Gesamtdrucks im Turbidostat-Betrieb.

schen Bildungsraten bei CO_2 -Partialdrücken unter 0,25 % gleich denen bei höherer Lichtintensität sind. Für die jeweiligen Wachstumsraten steht also genügend Energie zur Verfügung. Bei CO_2 -Partialdrücken über ca. 0,7% des Gesamtdrucks werden maximale Wachstumsraten von 1,05 1/d im Experiment bei 147 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ erreicht. Diese Wachstumsrate ist deutlich niedriger als die bei der höheren Lichtintensität von 347 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ gemessenen. Bei einer Lichtintensität von 147 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ ist der Organismus somit energetisch limitiert. In dem Plateau-Bereich, bei dem das Wachstum nicht in Folge der geringen CO_2 -Partialdrücke reduziert war, wurde der Ausbeutekoeffizient für die Biomassebildung bezogen auf die Photonenflussrate bestimmt (s. Photonenflussrate planarer Photonenflusssensor Tabelle 4.2). Die in den Reaktor eingetragenen Photonen wurden nach Gleichung 5.15 bestimmt. Der Ausbeutekoeffizient, bezogen auf die gesamte Photonenflussrate, beträgt $Y_{X,Ph} = 0,91 \text{ g}_X/\text{mol}_{\text{Photon}}$ für das Experiment bei 147 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$. Für das lichtgesättigte Experiment beträgt der Photonenausbeutekoeffizient

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

0,358 $\text{g}_X/\text{mol}_{\text{Photon}}$ für die CCM-Mutante und 0,595 $\text{g}_X/\text{mol}_{\text{Photon}}$ für die Wildtypalge. Es wird bei hoher Lichtintensität erwartungsgemäß ein größerer Anteil an Photonen durch Fluoreszenz dissipiert. Für den Wildtyp wurde bei gleicher Lichtintensität ein höherer Ausbeutekoeffizient ermittelt (s. Tabelle 4.3). Der Anteil der als Fluoreszenz abgestrahlten Photonen und der pro-

Tabelle 4.3.: Werte der Lichtintensität, der maximalen Wachstumsrate μ , der Photonenausbeuten $Y_{X,Ph}$ und der photosynthetischen Aktivität YII im lichtlimitierten sowie lichtgesättigten Bereich für die Wildtypalge WT 11-32b und die CCM-Mutante CC1860

Organismus	Lichtintensität	spez. Wachstumsrate	$Y_{X,Ph}$	YII
	in $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$	in 1/d	in $\text{g}_X/\text{mol}_{Ph}$	
CC1860	147,2	1,05	0,908	0,520
CC1860	347	1,44	0,358	0,280
WT 11-32b	320	2,05	0,595	0,400

zessierten Photonen wurde entsprechend der Methode in Abschnitt 3.4.6 mit der PAM-Sonde gemessen und die ETR nach Gleichung 2.10 berechnet. In Abbildung 4.12a sind die relativen gemessenen Elektronentransportraten für verschiedene CO_2 -Partialdrücke im quasistationären Zustand als Funktion der einstrahlenden Lichtintensität dargestellt. Die ETR steigt mit zunehmender Lichtintensität linear an und nimmt ab einer Lichtintensität im Bereich von 300 bis 400 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ einen konstanten Wert an. Die Elektronentransferrate geht damit deutlich später in den gesättigten Zustand über als die aufgenommene Wachstumskinetik (Abschnitt 4.1.3). Diese spätere Sättigung der ETR, verglichen mit der Wachstumskinetik, ist bei Algen im lichtgesättigten Bereich u.a. durch linearen Elektronentransport und durch die Mehler-Reaktion zu erklären [73]. Bei hohen Lichtintensitäten von über 1000 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ sinkt die ETR wieder unter den jeweiligen maximalen Plateauwert ab. Der Organismus wird hier durch Photoinhibition geschädigt. Mit geringerem CO_2 -Partialdruck nimmt auch die Elektronentransportrate (ETR) ab, d.h. der Anteil an Fluoreszenz nimmt zu. In Abbildung 4.12b ist die über Fluoreszenz ermittelte Photonenausbeute (YII) bei der im Reaktor herrschenden Lichtintensität als Funktion des CO_2 -Partialdrucks dargestellt. Die Bestimmung des Werts von YII erfolgte hierbei durch die Interpolation der Lichtkurve auf die im Reaktor eingestellte Lichtintensität (in diesem Fall $I_0 = 320$ bzw. $347 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$). Außerdem ist die bei diesen Partialdrücken bestimmte spezifische Wachstumsrate dargestellt. Sowohl YII als auch die Wachstumsrate erreichen bei CO_2 -Partialdrücken von über 0,75 % einen maximalen Wert. Eine Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks führt zu keiner weiteren Erhöhung von μ oder YII. Bei geringeren CO_2 -Partialdrücken nehmen die Werte der Wachstumsrate und von YII ab. Diese Abnahme von YII korreliert mit der

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

Reduktion der spezifischen Wachstumsrate μ (s. Abbildung 4.12b). Bei sehr geringem CO_2 -Partialdruck gibt es Diskrepanzen zwischen stofflicher und energetischer Betrachtung. Die Wachstumsrate erreicht, wie in Kapitel 4.3.2 gezeigt, ab einem CO_2 -Partialdruck von 0,12 % des Gesamtdrucks einen Wert von $\mu = 0 \text{ 1/d}$; die aus YII berechnete ETR hingegen beträgt $11,5 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$.

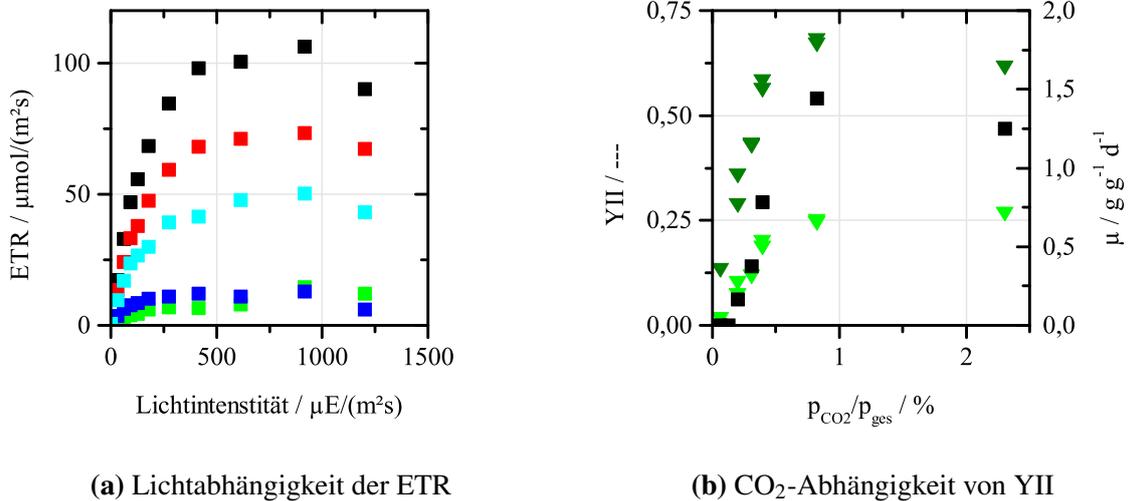


Abbildung 4.12.: ETR bzw. YII sowie Wachstumsrate von *C. reinhardtii* CC1860 bei verschiedenen CO_2 -Partialdrücken und Lichtintensitäten ($p_{\text{O}_2}/p_{\text{ges}} = 42 \%$). (a) ETR, bestimmt über die gemessene Fluoreszenz bei (■) 2,31 %, (■) 0,40 %, (■) 0,26 %, (■) 0,16 %, (■) 0,07 % CO_2 . (b) Photosynthetische Ausbeute (YII) bei (▼) 347 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ und (▼) 8 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ in Abhängigkeit des CO_2 -Partialdrucks sowie die (■) spezifische Wachstumsrate bei 347 ($\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$).

4.3.4. $p_{\text{CO}_2}/p_{\text{O}_2}$ -Kinetik der CCM-Mutante bei Zusatz des Hemmstoffs Ethoxzolamid

Die bei einem O_2 -Partialdruck von 42 % des Gesamtdrucks gemessenen spezifischen Glycolatbildungsraten (s. Abschnitt 4.3.2) erreichten nicht die nach Literatur zu erwartenden Werte von $r_{\text{O},\text{max}} = 1/3,7 \cdot r_{\text{C},\text{max}}$ [44]. Wird die maximale spezifische Wachstums- und Glycolatbildungsrate in erster Näherung für die Berechnung der spezifischen Kohlenstoffassimilierungsrate r_A herangezogen, so liegt das Verhältnis zu der maximal beobachteten Oxygenierungsrate durch Glycolatexkretion (r_{Glyc}) bei $r_{\text{Glyc}}/r_A = 1/94$. Zudem setzt die Glycolatproduktion bei sehr viel geringeren CO_2 -Partialdrücken ein, als die Kinetik der RuBisCO erwarten lässt (s. Abbildung 2.4b). Erhöhte Glycolatexkretionsraten wurden in der Literatur bei Zugabe des Sulfonamids Ethoxzolamid (EZA) beobachtet [146, 147, 148]. EZA kann im Gegensatz zu anderen Hemmstoffen, wie etwa Isoniazid, über längere Zeiträume eingesetzt werden

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

(persönliche Kommunikation A. Günther). Die Löslichkeit von EZA beträgt 40 mg/l. Wegen dieser geringen Wasserlöslichkeit erfolgte zudem die Zugabe von DMSO zu einem Anteil von 0,1 % v/v (DMSO in Wasser) [149]. Die Bestimmung der Wachstums- und Glycolatbildungsrate erfolgten in dem Modellreaktor im Turbidostat-Modus bei den gleichen wie in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Prozessbedingungen mit Zusatz von 56,8 mg/l EZA (entsprechen 220 $\mu\text{mol/l}$). Abbildung 4.13 zeigt einen Vergleich der Glycolat- und Biomassebildungsrate bei einer Lichtintensität von 317 bzw. 347 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ und einem O_2 -Partialdruck von 42 bzw. 45 % des Gesamtdrucks mit bzw. ohne Zugabe von EZA (Experimente CCM3 und EZA).

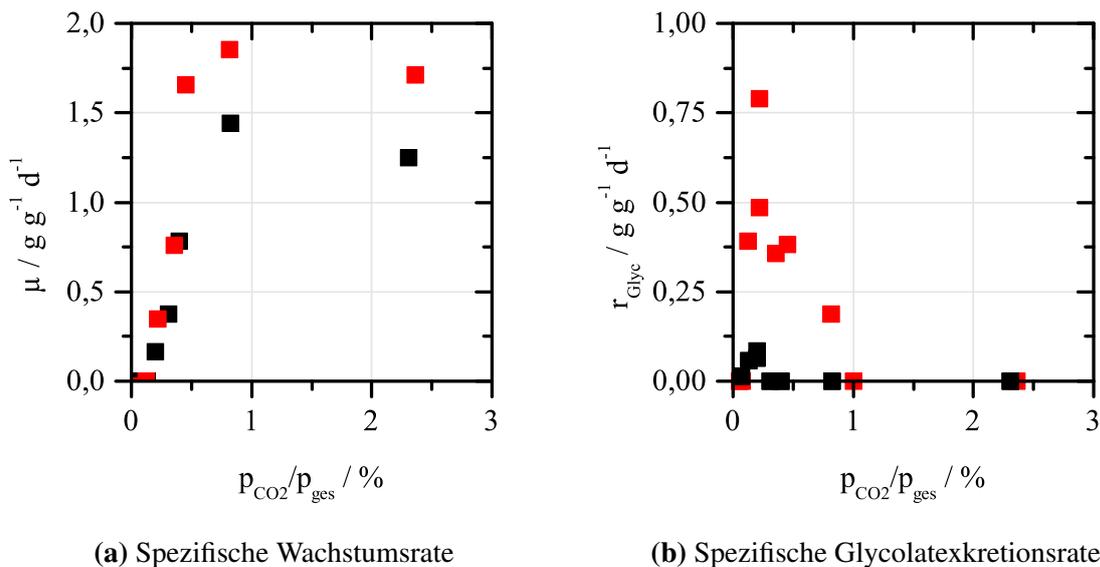


Abbildung 4.13.: CO₂-Kinetik der spezifischen Wachstumsrate und Glycolatproduktion (■) mit (Experiment CCM3) und (■) ohne (Experiment EZA) den Zusatz von Ethoxyzolid (EZA) unter lichtgesättigten Bedingungen (317 bzw. 347 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$) und bei einem O_2 -Partialdruck von 42 bzw. 45 % des Gesamtdrucks.

Bei hohem CO₂-Partialdruck von über ca. 0,75 % des Gesamtdrucks werden bei EZA-Zugabe höhere Wachstumsraten von 1,6 1/d erreicht als im vergleichbaren Experiment ohne EZA-Zugabe. Um festzustellen, ob DMSO oder EZA das Wachstum der Algen beeinflusst, wurden jeweils drei Schüttelkolbenkultivierungen zur Messung der maximalen Wachstumsrate unter Zusatz von DMSO, DMSO und EZA sowie einer Referenz ohne Zusätze durchgeführt. Methodisch wurde analog zu der Kultivierung der Stammhaltung vorgegangen (s. Abschnitt 3.2.1). Um Licht- und CO₂-Limitierungen auszuschließen, wurde eine Photonenflussrate von $I_0 = 350 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ eingestellt und der Schüttelkolben mit einem Volumenanteil von $y_{\text{CO}_2} = 5 \%$ (v/v, CO₂ in Luft) bei 50 ml/min Gesamtvolumenstrom begast. Die maximalen Wachstumsraten wurden im exponentiellen Bereich ermittelt. Sie betragen bei einer Dreifachbestimmung

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

für die Referenz $\mu = 1,55 \pm 0,07$ 1/d, bei Zugabe von DMSO $\mu = 1,55 \pm 0,12$ 1/d und für die Kultur mit EZA und DMSO $\mu = 1,50 \pm 0,01$ 1/d. In Schüttelkolbenexperimenten kann ein Einfluss von EZA oder DMSO auf das Wachstum somit nicht nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Wachstumsraten mit und ohne EZA-Zugabe in Abbildung 4.13a zeigt ab einem CO_2 -Partialdruck unterhalb von 0,75 % einen analogen Verlauf. Die Glycolatbildung ist bei Zugabe von EZA schon ab einem CO_2 -Partialdruck von ca. 0,75 % des Gesamtdrucks messbar. Die maximale Produktionsrate wurde, ähnlich zu den Experimenten ohne EZA, bei einem CO_2 -Partialdruck von 0,21 % des Gesamtdrucks ermittelt. Die maximale spezifische Glycolatproduktionsrate beträgt 0,48 bis 0,79 g/g/d bei Zugabe von EZA und ist damit im Mittel um den Faktor 9 höher verglichen mit der Referenz ohne EZA. Die Auftragung des Verhältnisses der Kohlenstoffassimilierungsrate zur Glycolatexkretionsrate r_A/r_{Glyc} in Abhängigkeit vom Konzentrationsverhältnis $c_{\text{CO}_2}/c_{\text{O}_2}$ ergibt mittels linearer Korrelation eine Selektivität von $S = 78,04$. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Selektivität der aufgereinigten RuBisCO (s. Tabelle 2.1).

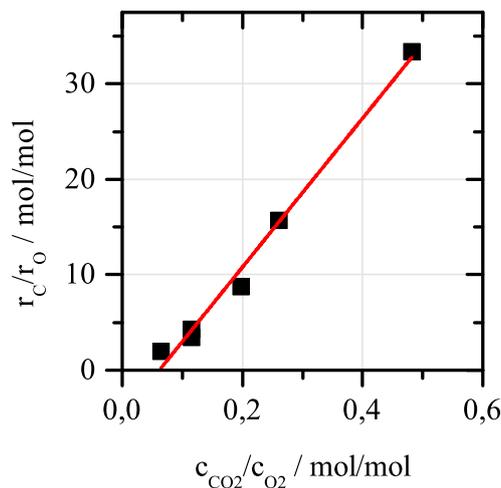


Abbildung 4.14.: Verhältnis der Kohlenstoffassimilierungsrate (berechnet aus Biomasse- und Glycolatbildungsrate) und der Oxygenierungsrate (berechnet aus der Glycolatbildungsrate) in Abhängigkeit vom $c_{\text{CO}_2}/c_{\text{O}_2}$ -Verhältnis im Medium bei 42 % O_2 -Anteil bei der Zugabe von EZA.

4.4. Diskussion der Ergebnisse zur Prozessauslegung der Glycolatproduktion

4.4.1. Bewertung der Methodik zur Aufnahme einer $p\text{CO}_2$ -/ $p\text{O}_2$ -Kinetik im quasistationärem Zustand

Die Mikroalge *C. reinhardtii* kann Glycolat exkretieren [150, 151, 26]. Verschiedene Arbeitsgruppen fokussieren ihr Interesse auf ein genaueres allgemeines Verständnis der RuBisCO und einer Aufklärung des Stoffwechselwegs zum Glycolatrecycling [152, 153, 154]. Neben dieser Grundlagenforschung wurde der Ansatz Glycolat anstelle von Biomasse als Produkt zu nutzen nur von Vélchez erforscht [155]. Für eine technische Nutzung von Glycolat ist eine kontinuierliche Produktion mit möglichst hoher Produktionsrate über einen möglichst langen Zeitraum unabdingbar. Eine kontinuierliche Produktion von Glycolat über einen Zeitraum von wenigen Stunden hinaus ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Nach diesem Zeitraum bei geringem CO_2 -Partialdruck bildet der Organismus Mechanismen der aktiven CO_2 -Anreicherung aus. So kann der Organismus die intrazelluläre Carboxylierungsrate der RuBisCO auf einem hohen Level halten und die Oxygenierungsreaktion mit dem resultierenden Kohlenstoff- und Energieverlust des Glycolatrecyclings verhindern [77]. Dies sollte in dieser Arbeit berücksichtigt werden; daher wurde ein Prozess zur kontinuierlichen Produktion von Glycolat mit möglichst hoher Produktionsrate ausgelegt. Hierzu wurde eine Methodik entwickelt, die es ermöglichte die Wachstums- und Glycolatproduktionsrate eines Modellorganismus in Abhängigkeit vom O_2 - und CO_2 -Partialdruck im quasistationären Gleichgewicht über einen beliebigen Zeitraum zu messen (s. Abschnitt 4.3.1). Durch die separate Kontrolle von pH-Wert und CO_2 -Partialdruck werden exakt definierte Partialdrücke und Hydrogencarbonat-Konzentrationen für eine Bestimmung der RuBisCO-Kinetik vorgegeben. Dies ist durch die Vorlage von Hydrogencarbonat als anorganische Kohlenstoffquelle, wie es in der Literatur häufig beschrieben wird, nicht möglich. Um den Einfluss der partialdruckabhängigen RuBisCO-Kinetik und der Lichtkinetik unabhängig voneinander betrachten zu können, wurde der Modellreaktor über die optische Dichte geregelt. Durch die zylindrische Geometrie des Reaktors ist die Aufnahme der Kinetik bei einer genau definierten Lichtintensität über den gesamten Reaktorquerschnitt möglich (s. Jacobi et al [27] bzw. Abschnitt 3.2.3 für den Organismus *C. reinhardtii* CC1860). Die Untersuchung des quasistationären Zustands ermöglicht die separate Betrachtung und Modellierung der RuBisCO, weiterer Kinetiken des Organismus sowie des Photosystems (s. Abschnitt 5).

4.4.2. $p\text{CO}_2$ -/ $p\text{O}_2$ -Kinetik der Wildtypalge *C. reinhardtii* WT 11-32b

Für die Untersuchung der Biomasse- und Glycolatproduktionsrate im quasistationären Gleichgewicht wurde ein Organismus ausgewählt, bei dem die Exkretion von Glycolat über einen langen Zeitraum möglich ist (s. Abschnitt 4.1.1). Hierzu wurde zunächst eine $p\text{CO}_2/p\text{O}_2$ -Kinetik der Wildtypalge *C. reinhardtii* WT 11-32b in quasistationärem Gleichgewicht in dem Rührkessel-Modellreaktor aufgenommen. Der Organismus zeigt bis zu einem minimalen CO_2 -Partialdruck von 0,2 % und einem konstanten O_2 -Partialdruck von 42 % des Gesamtdrucks eine maximale Wachstumsrate von 2,7 1/d. Dieser Wert ist vergleichbar mit maximalen Wachstumsraten, wie sie in der Literatur für *C. reinhardtii* in diesem Modellreaktor erreicht wurden [102]. Bei geringerem CO_2 -Partialdruck nimmt die Wachstumsrate sehr schnell ab. Diese schnelle Abnahme steht im Widerspruch zu dem Verlauf der Carboxylierungsrate der reinen RuBisCO-Kinetik (s. Abbildung 2.4). Die Carboxylierungsrate der reinen RuBisCO nimmt im Vergleich zu der Wachstumsrate des Gesamtorganismus verhältnismäßig langsam ab. Die steile Abnahme der spezifischen Wachstumsrate des Wildtyps bei geringem CO_2 -Partialdruck wird durch die Betrachtung des CO_2 -Eintrags in den Reaktor erklärbar. Hierzu wurde eine differentielle Bilanz des Stoffübergangs von Gas- zu Flüssigphase nach Gleichung 3.9 berechnet. Zudem wurden die ein- und ausgehenden Kohlenstoffströme integral über den Gesamtreaktor ermittelt. Beide Ansätze zeigen, dass der Organismus bei geringen CO_2 -Partialdrücken aufgrund eines limitierenden Kohlenstoffeintrags in den Reaktor nicht maximal wachsen kann. Die weitere Verringerung des CO_2 -Zuganteils erklärt die steile Abnahme der spezifischen Wachstumsrate. Die Ausbildung von Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismen (CCMs) ermöglicht dem Organismus eine effektive intrazelluläre Anreicherung von CO_2 . Hierdurch ist die Carboxylierungsrate der RuBisCO höher, als es der CO_2 -Partialdruck des Mediums erwarten lässt. Eine Glycolatproduktion des Organismus ist über einen kurzen Zeitraum bei einem CO_2 -Partialdruck von weniger als 0,03 % des Gesamtdrucks beobachtbar. Die spezifische Bildungsrate von unter 1 mg/g/l ist jedoch wesentlich geringer, als es das Verhältnis der Carboxylierungs- zu Oxygenierungsrate der aufgereinigten RuBisCO erwarten lässt (s. Tabelle 2.1). Die aktive Aufnahme von CO_2 führt zu so hohen intrazellulären CO_2 -Partialdrücken, dass die Rate der Oxygenierungsreaktion entsprechend verlangsamt wird. Zudem könnten effektive Recycling-Mechanismen das gebildete Glycolat in den Stoffwechsel der Algen zurückführen. Der Wildtyp-Organismus ist somit für die Auslegung eines Prozesses zur kontinuierlichen Produktion von Glycolat nicht geeignet.

4.4.3. $p\text{CO}_2$ -/ $p\text{O}_2$ -Kinetik von *C. reinhardtii* CC1860

Charakterisierung der Alge CC1860

Um eine aktive Aufnahme von CO_2 oder HCO_3^- zu verhindern wurde eine *C. reinhardtii*-Mutante ausgewählt, bei der eine oder mehrere CCMs defekt waren. Eine geeignete CCM-Mutante mit einer verringerten Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff wurde von Spalding isoliert [87]. Diese zeigt eine wesentlich verringerte Wachstumsrate hervorgerufen durch einen Defekt des HCO_3^- -Transports. Dies führt zu geringeren intrazellulären CO_2 -Partialdrücken im Vergleich zum Wildtyp. Auch weitere Untersuchungen zeigten, dass die ausgewählte Mutante bei pH-Werten zwischen 5 und 9 nicht bei CO_2 -Partialdrücken auf Niveau der Umgebungsluft (0,038 % des Gesamtdrucks) wachsen kann [88]. Die Wachstumsrate der Alge wurde in Abhängigkeit von der Photonenflussrate in Mini-Plattenreaktoren bestimmt (s. Abschnitt 4.1.3). Die Aufnahme einer Lichtkinetik zeigt auch für den CO_2 unlimitierten Fall eine geringere maximale spezifische Wachstumsrate, als es für den Wildtyp typisch ist. Der Organismus CC1860 erreicht in den Mini-Plattenreaktoren seine maximale spezifische Wachstumsrate von $\mu = 1,25$ 1/d ab einer Photonenflussrate von $I_{\text{sat}} = 150 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$. In vergleichbaren Experimenten im Rührkessel im Turbidostat-Betrieb wurde eine um 15 % höhere maximale Wachstumsrate von $\mu = 1,44$ 1/d bei einer Lichtintensität von $347 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ im Lichtgleichverteilungspunkt des Reaktors nachgewiesen. Durch die Lichtabsorption in den Plattenreaktoren bildet sich ein Lichtgradient nach Gleichung 2.11 aus. Die verringerte effektive Lichtintensität führt zu einer verringerten spezifischen Wachstumsrate. Die Wachstumsrate des Wildtyp WT 11-32b ist bei identischen Prozessbedingungen im Rührkessel mit $\mu_{\text{max, WT 11-32b}} = 2,7$ 1/d um den Faktor 1,9 höher als bei der CCM Mutante. Die Betrachtung des Photosystems mittels Fluoreszenz-Messung (PAM) zeigt in Abbildung 4.2b eine Sättigung der relativen Elektronentransportrate des Organismus CC1860 bei geringeren Photonenflussraten als der Wildtyp. Der maximal erreichte Wert der ETR ist bei dem Organismus CC1860 ebenfalls geringer als bei der Wildtypalge. Es kann somit von einer geringeren photosynthetischen Aktivität der Mutante ausgegangen werden. Gründe für die verringerte Wachstumsrate dieser Mutante werden in der Literatur nicht diskutiert. Eine erhöhte Fluoreszenz ist von Finazzi et al. bei Algen mit verringerter RuBisCO-Aktivität beobachtet worden [75]. Auch ein Defekt des Photosystems kann zu erhöhter Fluoreszenz führen [156]. Eine verringerte Wachstumsrate aufgrund der defekten CCMs und damit durch einen limitierenden Kohlenstoff-Eintrag in die Zelle ist denkbar [157, 77]. Auch Transportlimitierungen durch Diffusion wurden für höhere Pflanzen von Ethier et al. vorgeschlagen [158]. Bei der Größe von Einzellern werden gemäß der Theo-

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

rie keine Diffusionslimitierungen erwartet [94]. Umsatzraten von Hefen, die Durchmesser von der gleichen Größenordnung haben wie die Mikroalge *C. reinhardtii*, sind wesentlich höher. In den durchgeführten Experimenten sollte aufgrund des höheren Stofftransports bei weiterer Erhöhung des CO₂-Partialdrucks eine Steigerung der Wachstumsrate erreicht werden. Dies ließ sich mit den Experimenten in Abschnitt 4.3.2 nicht nachweisen.

pCO₂-/pO₂-Kinetik von *C. reinhardtii* CC1860

Für den Organismus *C. reinhardtii* CC1860 wurde die Abhängigkeit der Wachstumsrate und der Glycolatproduktionsrate vom CO₂- und O₂-Partialdruck aufgenommen. Dies erfolgte bei O₂-Partialdrücken von 16 % bzw. 42 % des Gesamtdrucks und CO₂ Partialdrücken im Bereich von 0,038 bis ca. 3 % des Gesamtdrucks im Rührkessel-Reaktor, wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben. So war eine Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate und der Glycolatproduktionsrate für die jeweiligen Partialdrücke im quasistationären Zustand des Organismus möglich. Die Auftragung der Wachstumsrate als Funktion des CO₂-Partialdrucks zeigt für beide Sauerstoffpartialdrücke einen Verlauf der Wachstumsrate, welcher auf die RuBisCO-Kinetik zurückführbar ist. Dass von der gemessenen spezifischen Wachstumsrate auf die Carboxylierungsrate der RuBisCO rückgeschlossen werden kann, untermauert auch der Einfluss des variierten O₂-Partialdrucks auf die spezifische Wachstumsrate. Gleichung 2.4 beschreibt, wie eine Änderung des O₂-Partialdrucks die Carboxylierungsrate beeinflusst. In Anlehnung an die von Laing [21] vorgeschlagene Auftragung des Verhältnisses von Carboxylierungs- zu Oxygenierungsrate in Abhängigkeit des Partialdruckverhältnisses von O₂ zu CO₂, wurde das Verhältnis der Kohlenstoffassimilierungsrate in Abhängigkeit vom Partialdruckverhältnis aufgetragen. Dies zeigt eine gleiche Kohlenstoffassimilierungsrate für das gleiche Verhältnis von O₂ zu CO₂ (s. Abbildung 4.10). Entgegen der RuBisCO-Kinetik erreicht das Wachstum der Alge schon bei CO₂-Partialdrücken größer Null den Wert $\mu = 0$. Dies ist auf den Kohlenstoffbedarf der Glycolatbildung und den des Erhaltungsstoffwechsels zurückzuführen. Dieser Partialdruck von pCO₂ = 0,12 % ist höher als der Partialdruck Γ^* , bei dem die spezifische Carboxylierungsrate der RuBisCO der spezifischen Rate des Kohlenstoffverlusts durch die Oxygenierungsreaktion entspräche (s. Abschnitt 2.1.2). Grund für diesen höheren CO₂-Partialdruck ist die Veratmung der CH₂O-Äquivalente in den Mitochondrien zur intrazellulären Energiegewinnung außerhalb des Chloroplasten [40]. Insbesondere bei den geringen CO₂-Partialdrücken, die durch die hohe Glycolatproduktionsrate im Fokus dieser Arbeit stehen, darf der Erhaltungsstoffwechsel durch die Verstoffwechslung von CH₂O-Äquivalenten nicht vernachlässigt werden. Farquhar, Caemmerer und Berry schlagen daher die Erweiterung

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

der RuBisCO-Kinetik um einen Respirationsterm vor [22]. Das Vorliegen einer intrazellulären Stoffwechselaktivität trotz einer Wachstumsrate von Null zeigt auch die Messung der vom Organismus prozessierten Photonen (Abbildung 4.12b). Hierauf wird genauer in Kapitel 5.4 eingegangen.

Die CO₂-Limitierung kann bei dem gewählten erhöhten Sauerstoff-Partialdruck ohne Schädigung des Organismus über eine lange Prozesszeit aufrechterhalten werden. Eine Schädigung der Zellen durch zu hohe Sauerstoff-Partialdrücke wird in der Literatur diskutiert. In einigen Untersuchungen wurde eine Auswirkung auf die spezifische Wachstumsrate der Grünalge *Chlorella vulgaris* durch O₂ erst bei einem Anteil von 95 % (v/v) nachgewiesen [145]. In weiteren Untersuchungen wurde bei der Grünalge *Neochloris oleoabundans* schon bei einer Erhöhung des O₂-Partialdrucks von 21 % auf 42 % des Gesamtdrucks eine um 15 % verringerte Wachstumsrate ermittelt [159]. Für die CCM-Mutante, die durch die verringerte aktive CO₂ Aufnahme eine besondere Anfälligkeit aufweisen könnte, wurden in dieser Arbeit schädigende Sauerstoff-Partialdrücke im Bereich von > 70 % des Gesamtdrucks nachgewiesen (s. Abschnitt 4.1.4). Hierbei ist von einer langsamen Schädigung, verursacht etwa durch Sauerstoffradikale, auszugehen. Auch hohe CO₂-Partialdrücke von 2 bis 4 % des Gesamtdrucks können diese Schädigung nicht verhindern. Nach der RuBisCO-Kinetik sollten bei diesem CO₂-Partialdruck trotz hoher O₂-Partialdrücke von 98 bzw. 96 % Carboxylierungsraten von über 95 % erreicht werden. Ein direkter Einfluss auf ein Enzym, wie es bei der RuBisCO-Kinetik der Fall ist, kann ausgeschlossen werden. Somit ist die Ursache für eine verringerte Wachstumsrate des Organismus kein Stress im Sinne einer Schädigung.

Die Verringerung des CO₂-Partialdrucks geht mit signifikanten Änderungen im Organismus einher. Kurzzeitige Effekte im Minuten-Bereich, die zu einer Änderung der Fluoreszenz führen, werden schon in der Literatur beschrieben [74, 69]. Dies konnte auch in Experimenten in dem Mini-Plattenreaktor über Stunden bis zur Einnahme eines neuen quasistationären Zustands nachverfolgt werden (s. Abschnitt 4.2.1). Diese Beobachtung wurde durch die Messung der Fluoreszenz im quasistationären Zustand für den jeweils eingestellten CO₂-Partialdruck ergänzt, wobei der nichtlineare Zusammenhang zwischen ETR und Lichtintensität berücksichtigt wurde (s. Abbildung 4.12). Eine Betrachtung des Chlorophyllgehalts in den Zellen ergibt eine kontinuierliche Reduktion des Chlorophyllanteils in dem betrachteten Prozesszeitraum. Die Anpassungszeit ist so langsam, dass ein quasistationärer Zustand trotz der langen Versuchsdauer nicht erreicht wurde. Einher geht diese Änderung mit einer Abnahme des Stärkegehalts. Ramazanov et al. beobachteten die Ausbildung einer Stärke-Hülle um den Pyrenoiden anstelle der Verteilung in der Zelle bei einer C-Limitierung [160]. Der gesamte Kohlenhydratanteil der Zelle nimmt in den hier durchgeführten Messungen von ca. 60 % auf ca. 40 %

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

ab. Der Ausbeutekoeffizient von Stickstoff ist durch die Verringerung des CO₂-Partialdrucks nicht verändert, wohingegen die Ausbeutekoeffizienten von Schwefel und Phosphor für den limitierten Zustand höher sind.

Zudem wurde der Einfluss des CO₂- und O₂-Partialdrucks auf die Glycolatexkretionsrate untersucht. Es erfolgte die Anwendung des Modellansatzes der RuBisCO-Kinetik von Farquhar [161] und ihrer *in situ*-Beschreibung von von Caemmerer [40] für die vollständige Exkretion von Glycolat durch die Alge (s. Abbildung 2.4b). Demnach ist eine stetige Steigerung der Glycolatbildung in dem Organismus bei Reduktion des CO₂-Partialdrucks unterhalb von 1 % des Gesamtdrucks zu erwarten. Entgegen dieser Erwartung zeigt die Bestimmung des exkretierten Glycolats einen sehr schmalen Peak bei einem Partialdruck zwischen 0,1 und 0,2 % des Gesamtdrucks für die CCM-Mutante CC1860 (s. Abbildung 4.9b). Für das Verhältnis der maximalen Oxygenierungsrate der RuBisCO zu der maximalen Carboxylierungsrate wurde von Jordan und Ogren [44] ein Faktor von 1/3,7 ermittelt (s. Tabelle 2.1). Die Glycolatexkretionsrate liegt um den Faktor 9 unter dem erwarteten. Eine Induktion von Stoffwechselwegen zum Recycling von Glycolat bei geringen CO₂-Partialdrücken ist naheliegend und wird in der Literatur beschrieben [162]. Die Untersuchung der Ausbildung der Stoffwechselwege von Stabenau zeigt eine Verringerung der Glycolatproduktion innerhalb von 14 h in der Grünalge *Mougeotia* durch die Induktion des Glycolatrecyclings [153]. Kurzzeitige Experimente in den Mini-Plattenreaktoren zeigen eine Verringerung der Exkretionsrate innerhalb eines ähnlichen Zeitraums (s. Abbildung 4.4). Durch die Adaption an hohe CO₂-Partialdrücke werden die Stoffwechselwege von CCMs und Glycolatrecycling in diesen Experimenten bei der Prozessumstellung auf geringe CO₂-Partialdrücke nicht induziert. Die kurzen Prozesszeiten von ca. 40 h erlauben die Messung der Glycolatexkretion vor bzw. während der Induktion dieser Stoffwechselwege. Nach Umstellung der Prozessbedingungen von hohen auf geringe CO₂-Partialdrücke und einen O₂-Partialdruck von 42 % des Gesamtdrucks zeigen die Algen ein wesentlich höheres Potential zur Glycolatexkretion als im quasistationären Zustand des Rührkessels. Auch die Partialdrücke, bei denen die Glycolatexkretion einsetzt, sind höher (s. Abbildung 4.5b). Die hohe Produktionsrate kann jedoch nicht über längere Zeit aufrechterhalten werden. Die spezifische Glycolatproduktionsrate reduziert sich auf Werte wie sie auch im quasistationären Zustand gemessen werden. Das Potential des Glycolatrecyclings wird in der Literatur mit ca. 5 bzw. 10 μmol/(mg_{Chl a} h) angegeben [57, 51]. Für die Umrechnung der auf Chlorophyll bezogenen in eine biomassespezifische Rate wurde ein Chlorophyllanteil des Organismus CC1860 von 20 mg/g in dieser Arbeit nachgewiesen (s. Abbildung 4.8). Durch die Abnahme des Chlorophylls in den Zellen über längere Zeiträume ist ein Bezug auf die Biomasse nur für einen kurzen Zeitraum möglich. Die biomassespezifische Recyclingrate be-

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

trägt somit zwischen 182,5 und 365 mg_{Glyc}/g_X/d. Die Recyclingrate von Glycolat liegt also im Bereich der Exkretionsrate in den Mini-Plattenreaktoren direkt nach der Umstellung der Prozessbedingungen. Die Induktion des Stoffwechsels könnte zu der Verringerung der Exkretionsrate führen. In der Literatur wurden mit verschiedenen Hemmstoffen höhere Glycolatexkretionsraten gemessen. Diese Hemmstoffe können verschiedene Stoffwechselwege des Glycolatrecyclings inhibieren [163, 164, 51]. Der Zusatz ist jedoch häufig nur über kurze Zeiträume möglich, da die Zellen sonst irreparabel geschädigt werden. Der Inhibitor EZA konnte erfolgreich über längere Zeit eingesetzt werden (persönliche Mitteilung A. Günther). EZA inhibiert die Kohlenstoffaufnahme des Organismus und damit die Photosynthese [165]. Durch Fluoreszenzmessungen konnte Tyrrell [149] eine um 50 % bzw. 90 % reduzierte Kohlenstoffaufnahme in dem Cyanobakterium *Synechococcus sp.* nachweisen. Moroney stellte die Carboanhydrasen-inhibierende Wirkung von EZA in *C. reinhardtii* heraus [166]. Die für halbmaximales Biomassewachstum benötigte HCO₃⁻-Konzentration erhöhte sich durch den Zusatz von EZA von 5 bzw. 0,6 µmol/l auf 60 µmol/l für pH-Werte von 5,1 bzw. 8. Ein steigender Effekt auf die Glycolatexkretionsrate bis zu einer Verfünffachung der Exkretionsrate ohne EZA wird von Jahnke beschrieben und durch Messungen von Bergman unterstützt [146, 147, 148]. Die Zugabe von EZA bei den quasistationären Turbidostat-Bedingungen ermöglichte den Nachweis höherer Glycolatexkretionsraten der CCM-Mutante über lange Zeiträume und bei höheren CO₂-Partialdrücken im Vergleich zu der Referenz ohne Zugabe von EZA (s. Abbildung 4.13b). Eine veränderte Affinität zu CO₂, analog zu den Messungen von Moroney et al. [166], konnte bei Vergleich der Carboxylierungsraten mit und ohne Inhibitorzusatz nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.13a). Hingegen führt der Zusatz von EZA zu einer höheren Wachstumsrate bei ansonsten identischen Prozessbedingungen. Auch die erhöhten Elektronentransportraten unterstreichen dies. In Schüttelkolben-Experimenten konnte dies jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies ist wahrscheinlich auf eine Zersetzung der verwendeten EZA-Lösung zurückzuführen. Über die Biomassebildungsraten und der Glycolatexkretionsrate wurde auf die intrazelluläre Oxygenierungs- und Carboxylierungsrate der RuBisCO rückgeschlossen. Durch die Ermittlung der Sensitivität des Gesamtorganismus CC1860 wird ein Vergleich mit der in der Literatur beschriebenen RuBisCO möglich (s. Abbildung 4.14). Der Gesamtorganismus hat mit $S = 78,05$ eine ähnliche Selektivität, wie es die aufgereinigte RuBisCO aufweist. Durch Jordan und Ogren wurde ein Wert von $S = 61$ bestimmt. Spätere Bestimmungen von Uemura et al. und Zhu et al. weisen eine etwas höhere Selektivität von $S = 66$ bzw. $70,5 (+2,2)$ auf [41, 167, 168]. Durch den kombinierten Zusatz von EZA mit einer CCM-Mutante CC1860 ist somit eine kontinuierliche Produktion von Glycolat möglich. Eine genauere Betrachtung der spezifischen Raten in dem Organismus und der Ausbeutekoeff-

4. Auslegung eines Prozesses zur Glycolatproduktion

fizienten erfolgt bei der Modellierung des Prozesses.

Energieausbeute von CC1860 bei verschiedenen Partialdruckverhältnissen

Aus dem Lichteintrag in den Reaktor wurde der Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{X,Ph}$ bei hohem CO_2 -Partialdruck berechnet (s. Tabelle 4.3). Kliphuis verfolgt mit der Aufnahme von transmittierten Photonen durch einen Plattenreaktor ein ähnliches Ziel [50]. Sie gibt einen Ausbeutekoeffizienten für *C. reinhardtii* von $1,25 \text{ g}_X/\text{mol}_{Ph}$ bei einer Photonenflussrate von $80 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ an. Speziell für den Organismus CC1860 wurde in dem verwendeten Rührkessel ein geringerer Ausbeutekoeffizient von $0,9 \text{ g}_X/\text{mol}_{Ph}$ ($147 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) im lichtlimitierten, jedoch CO_2 -unlimitierten Wachstum ermittelt. Eine Verringerung des Ausbeutekoeffizienten bei Erhöhung der Lichtintensität wurde von Takache et al. beobachtet. Bei einer Photonenflussdichte von $110 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ weisen sie einen Ausbeutekoeffizienten von $1,1 \text{ g}_X/\text{mol}_{Ph}$ und bei $500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ einen Ausbeutekoeffizienten von $0,73 \text{ g}_X/\text{mol}_{Ph}$ nach [169]. Diese Verringerung des Ausbeutekoeffizienten ist durch den Bezug auf die gesamte eingestrahelte Photonenflussrate begründet [73]. Eine Erweiterung zu dieser Betrachtung stellt die Messung der photosynthetischen Effizienz dar. Hierdurch können die Photonen in prozessierte Photonen und fluoreszierte Photonen unterschieden werden. Die Betrachtung des Photonenflusses ermöglicht eine wesentlich exaktere Abschätzung der Photonenausbeuten und den Bezug auf die Umsatzraten des Kohlenstoffs. Dies ist im Falle von Mikroalgen ansonsten nicht möglich, da der Zusammenhang zwischen Kohlenstoffassimilation und Photonenbedarf im Gegensatz zu höheren Pflanzen nicht linear ist [73]. Werden die Ausbeutekoeffizienten des Wildtyps und der CCM-Mutante auf die prozessierten Photonen bezogen, so reduziert sich die Diskrepanz in den Ausbeutekoeffizienten von 60 % auf 15 %. Die so vorgenommene Unterteilung der eingestrahelten Photonen in fluoreszierte und prozessierte Photonen ermöglicht die Bilanzierung des Photosystems auch in Bereichen des kohlenstofflimitierten Wachstums und damit die Betrachtung der energetischen Raten im Organismus. Die Photonenausbeute lässt in den betrachteten Bereichen von Lichtintensität und CO_2 -Partialdruck einen sehr guten Rückschluss auf die verringerten spezifischen Raten zu. Dies wurde in ähnlicher Form auch bei höheren Pflanzen u.a. von Ruuska beobachtet [170]. Eine weitere energetische Bilanzierung erfolgt in 5.2.3.

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

5.1. Zielsetzung der Modellbildung

Die Bildung eines strukturierten Modells soll helfen das Prozessverständnis zu vertiefen. Die Kenntnis der Stoffwechselwege innerhalb des Organismus ermöglicht die optimale Auslegung des Prozesses und zeigt weitere Verbesserungspotentiale auf. Aufbauend auf der von Farquhar hergeleiteten RuBisCO-Kinetik [161] kann die CO_2 - und O_2 -abhängige Carboxylierungs- und Oxygenierungsrate des Enzyms ermittelt werden. Die Übertragung der RuBisCO-Kinetik in den Zusammenhang des gesamten Organismus erfordert die Berücksichtigung weiterer Stoffwechselwege. Die systembiologische Modellierung bildet den Gesamtorganismus mittels exakter Massen- und Energiebilanzen ab. Neben stöchiometrisch definierten Reaktionen im Organismus verbleiben Stoffwechselwege, die aufgrund ihrer Komplexität nicht stöchiometrisch aufgeklärt sind oder organismusspezifisch bestimmt werden müssen. Die Anpassung dieser Freiheitsgrade des Modells auf die experimentellen Daten ermöglicht zudem die Ermittlung nicht direkt messbarer spezifischer Raten wie etwa dem Erhaltungsstoffwechsel. Durch eine Varianzanalyse kann der Fehler bei der Anpassung der Messdaten ermittelt werden. Diese unterstützt die Aussagekraft der bestimmten Parameter. Durch die Berücksichtigung der Kinetik des Photosystems ist es möglich zwischen verschiedenen Limitierungen zu unterscheiden. Die Ermittlung von energetischen Ausbeutekoeffizienten ermöglicht die optimale Anpassung des spezifischen Photonenstroms auf die Umsatzraten im Organismus. So können Wirkungsgradverluste, bedingt durch Fluoreszenz, vermieden werden.

5.2. Modellstruktur

Das Modell ist untergliedert in den Bilanzraum der einzelnen Zelle sowie den des gesamten Reaktors (s. Abbildung 5.1). Auf Zellebene werden die spezifischen Bildungsraten des Orga-

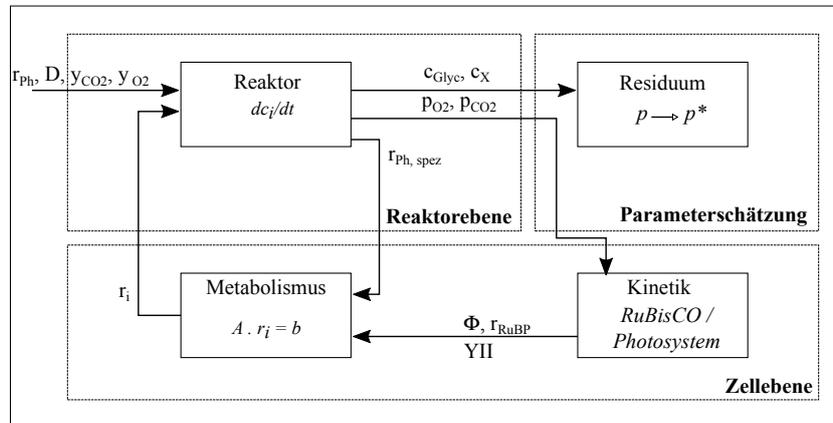


Abbildung 5.1.: Schematische Aufteilung des in Simulink implementierten Modells. c_X, c_{Glyc} : Konzentrationen von Biomasse und Glycolat im Medium; r_i : spezifische Bildungsraten innerhalb des Organismus (s. 5.2), $r_{Ph,abs}$: biomassespezifische Rate absorbierter Photonen, $r_{Ph,spez}$: biomassespezifische Photoneneinflussrate, r_{RuBP} : Umsatzrate der RuBisCO an Ribulose-1,5-bisphosphat, YII : photosynthetische Aktivität des Organismus, p_0, p^* : Start und optimierte Parameter, Φ : Anteil von Carboxylierungs- zu Oxygenierungsrate der RuBisCO.

nismus berechnet. Die Berechnung beruht einerseits auf den im Reaktor eingestellten CO_2 - und O_2 -Partialdrücken. Aus ihnen können die Carboxylierungs- und Oxygenierungsrate des Enzyms RuBisCO berechnet werden. Aus der Rate der eingestrahelten Photonen und der Biomassekonzentration wird die spezifische Rate absorbierter Photonen $r_{Ph,abs}$ berechnet. Die Kinetik des Photosystems wird berücksichtigt durch die Einteilung von absorbierten Photonen in prozessierte und in von der Zelle als Fluoreszenz abgestrahlte Photonen. Diese Einteilung wurde durch die Messung der photosynthetischen Aktivität (YII) in Abhängigkeit von der Lichtintensität und dem CO_2 -Partialdruck experimentell ermittelt. Das Verhältnis von Oxygenierung zu Carboxylierung, der von der RuBisCO umgesetzte Anteil an Ribulose-1,5-bisphosphat sowie der Anteil an prozessierten Photonen bilden den Ausgangsvektor des „Kinetik“-Blocks. Zusammen mit der spezifischen Photoneneinflussrate wird im Block „Metabolismus“ die Unterscheidung getroffen, ob eine Lichtlimitierung oder eine RuBisCO-Limitierung die Bildungsrate des Organismus begrenzt. Ausgehend vom tatsächlich umgesetzten Ribulose-1,5-bisphosphat beschreiben in diesem Block Massen- und Energiebilanzen die Stöchiometrie des Organismus. Hierbei werden die Kohlenstoff- und Sauerstoffbilanz sowie die Energiebilanz von ATP und NADPH auf die relevanten Stoffwechselwege begrenzt und z.T. unter Beachtung

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

der Netto-Bilanz zusammengefasst (s. Abbildung 5.2). Durch die bekannten Stöchiometrien gelingt die Kopplung von Massen- und Energiebilanz. Neben bekannten Stöchiometrien verfügt das Modell auch über Freiheitsgrade, die nicht direkt bestimmbar sind und spezifisch für den Organismus und die Kultivierungsbedingungen angepasst werden müssen. Dies sind die Raten des Recycling-Stoffwechsels und der Tagrespiration. Kinetische Konstanten (z.B. die RuBisCO-Parameter $r_{C,max}$, $r_{O,max}$, k_C , k_O) und Ausbeutekoeffizienten (z.B. die Nutzung von Photonen zur Bildung von ATP oder NADPH sowie der energetische Ausbeutekoeffizient von gebildeter Biomasse pro Mol ATP) werden in dem Modell als Freiheitsgrade implementiert. Die Ermittlung der Werte dieser Parameter gelingt über die Anpassung an experimentelle Daten. Hierzu werden die biomassespezifischen Bildungsdaten aus dem Block „Metabolismus“ auf Reaktorebene gemäß der Gleichung 3.7 über die Prozesszeit integriert und die prozesszeitabhängigen Konzentrationen von Biomasse und Glycolat berechnet. Experimentelle Bedingungen wie die Verdünnungsrate werden hierbei berücksichtigt. Diese berechneten Werte werden auf Reaktorebene mit den experimentell ermittelten Daten verglichen, um ausgehend von den Startwerten p , die optimalen Parameter des Modells (p^*) zu ermitteln. Als Kriterium wurde hierfür die Minimierung des quadrierten Fehlers gewählt.

5.2.1. Kinetik des Gesamtorganismus

Die Kinetik des gesamten Organismus wird durch verschiedene einzelne Kinetiken begrenzt. In dem Modell wurde zwischen der Limitierung der Bildungsdaten aufgrund der Kinetik des Enzyms RuBisCO und der Kinetik des Photosystems unterschieden. Für den Fall des RuBisCO-limitierten Wachstums des Organismus entspricht die Carboxylierungsrate $r_{RuBP,Carb}$ im Organismus der Carboxylierungsrate der RuBisCO r_C , wie in Gleichung 2.3 beschrieben bzw. in Anhang D.1 hergeleitet wird. Entsprechendes gilt für die Oxygenierungsrate $r_{RuBP,Oxyg}$ des Gesamtorganismus und r_O der Oxygenierungsrate der RuBisCO (s. Gleichung 2.4). Die gesamte spezifische Umsatzrate des Ribulose-1,5-bisphosphats $r_{RuBP,reg}$ entspricht der Summe der Carboxylierungs- und der Oxygenierungsrate (Gleichung 5.1). Das Verhältnis der Raten Φ ergibt sich aus Gleichung 2.5.

$$r_{RuBP,reg} = r_{RuBP,Carb} + r_{RuBP,Oxyg} = r_C + r_O \quad (5.1)$$

Für den lichtlimitierten Fall ist nicht die RuBisCO-Kinetik, sondern die Kinetik des Photosystems bzw. die entsprechenden Raten der ATP- und NADPH-Bildung für die Regenerierung von Ribulose-1,5-bisphosphat limitierend. In diesem Fall können die Carboxylierungsrate r_C

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

bzw. Oxygenierungsrate r_O der RuBisCO nicht erreicht werden (s. Ungleichung 5.2). Die maximale Umsatzrate wird in diesem Fall aus dem Energiebedarf des Organismus berechnet. Die vom Organismus prozessierten Photonen wurden mittels der photosynthetischen Aktivität nach Gleichung 5.3 aus den absorbierten Photonen berechnet. Die verbleibenden Photonen werden vom Organismus als Fluoreszenz abgestrahlt und werden so von dem System dissipiert. Die weiteren stöchiometrischen Gleichungen für den Energiebedarf des Organismus und die Bildung von ATP und NADPH im Photosystem werden in Abschnitt 5.2.3 angegeben. Das Verhältnis Φ der Carboxylierungs- und Oxygenierungsrate gilt auch für den Fall der Lichtlimitierung (siehe Herleitung der RuBisCO-Kinetik in Anhang D.1).

$$r_{RuBP,reg} \leq r_C + r_O \quad (5.2)$$

$$r_{Ph,proz} = r_{Ph,abs} \cdot YII \quad (5.3)$$

5.2.2. Bilanzierung der Stoffströme

Die Massenbilanzen berücksichtigen die Kohlenstoff- und Sauerstoffströme in dem Organismus. Die Stoffwechselwege im Organismus sind in Abbildung 5.2 gezeigt. Die spezifische Gesamtumsatzrate von Ribulose-1,5-bisphosphat $r_{RuBP,regen}$ folgt aus der limitierenden Kinetik der Licht- bzw. RuBisCO-Reaktion (s. Abschnitt 5.2.1). Die Carboxylierungs- und Oxygenierungsrate $r_{RuBP,Carb}$ bzw. $r_{RuBP,Oxyg}$ werden aus dem partialdruckabhängigen Verhältnis Φ der Carboxylierungs- und Oxygenierungsrate berechnet (siehe Gleichungen 2.5 bzw. innerhalb des Organismus Gleichung 5.4). Bei der Carboxylierung reagiert ein Molekül CO_2 mit einem Molekül Ribulose-1,5-bisphosphat (C_5) zu zwei Molekülen Phosphoglycerat (C_3) (Knoten 1 in Abbildung 5.2). Die Gleichung 5.6 beschreibt die Kohlenstoffbilanz der Reaktion. Pro Carboxylierungsreaktion wird ein Mol CO_2 und ein Mol Ribulose-1,5-bisphosphat umgesetzt, siehe Gleichung 5.5.

$$5 \Phi r_{RuBP,Carb} + 5 r_{RuBP,Oxyg} = 0 \quad (5.4)$$

$$r_{CO_2} - r_{RuBP,Carb} = 0 \quad (5.5)$$

$$r_{CO_2} + 5 r_{RuBP,Carb} - 3 r_{Glycerat,Carb} = 0 \quad (5.6)$$

Für die Oxygenierungsreaktion gelten drei stöchiometrische Verknüpfungen (Knoten 2 in Ab-

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

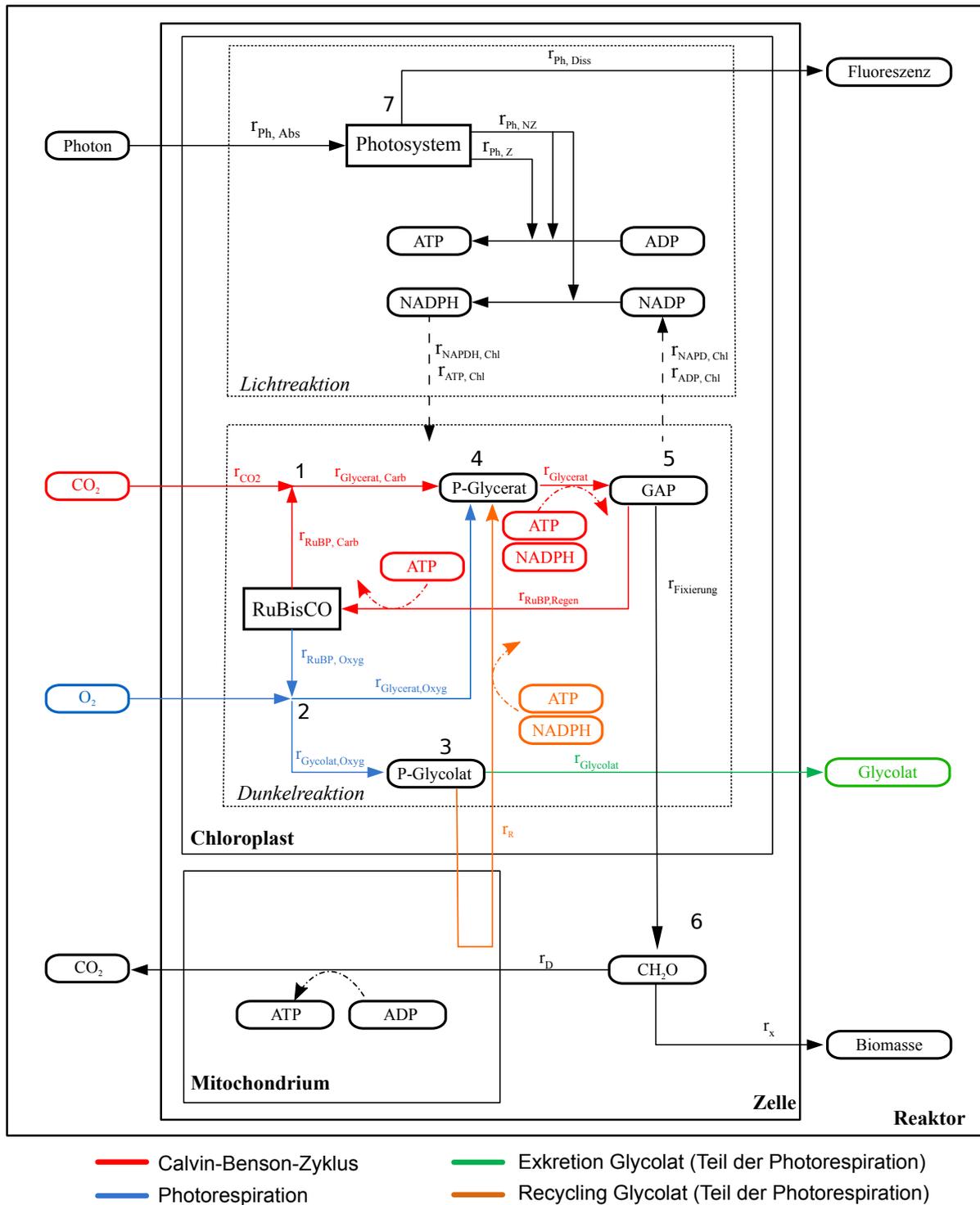


Abbildung 5.2.: Modell der Biomasse und Glycolatbildung aus CO_2 , O_2 und Photonenenergie, reduziert auf die wichtigsten Metabolite (abgerundete Rechtecke). Betrachtet wurden die Kinetiken der RuBisCO und des Photosystems (eckige Rechtecke). Die Bilanzierung erfolgte über die Knotenpunkte (1 bis 7). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Produkte ADP und NADP aus Reaktionen von ATP und NADPH nicht dargestellt.

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

bildung 5.2). Ein Molekül Sauerstoff wird pro Reaktion umgesetzt (Gleichung 5.7) und es entstehen je ein Molekül Phosphoglycolat (Gleichung 5.8) und ein Molekül Phosphoglycerat (Gleichung 5.9).

$$r_{RuBP,Oxyg} - r_{O_2} = 0 \quad (5.7)$$

$$r_{RuBP,Oxyg} - r_{Glycerat,Oxyg} = 0 \quad (5.8)$$

$$r_{RuBP,Oxyg} - r_{Glycolat,Oxyg} = 0 \quad (5.9)$$

Das Glycolat wird entweder exkretiert oder entsprechend dem in Abschnitt 2.1.1 beschriebenen Glycolatrecycling in den Calvin-Benson-Zyklus zurückgeführt. Wird das Glycolat recycelt, so werden zwei Moleküle Glycolat unter Abspaltung eines Moleküls CO_2 zu einem Molekül P-Glycerat (C_3) regeneriert. Dieser Recyclingstoffwechselweg hat eine maximale spezifische Rate r_R . Für die Bilanzierung im quasistationären Gleichgewicht ist die Recyclingrate entweder so hoch wie die Oxygenierungsrate oder nimmt einen maximalen Wert von r_R an (Gleichung 5.11). Ist die Glycolatbildungsrate höher, so wird überschüssiges Glycolat in das Medium exkretiert. Ist die Glycolatbildungsrate geringer als die maximale Recyclingrate, so erfolgt eine komplette Rückführung des in der RuBisCO-Reaktion gebildeten Phosphoglycolats. Die Kohlenstoffbilanz der Glycolatexkretion um den Knotenpunkt 3 (Abbildung 5.2) gibt Gleichung 5.10 wieder. Der Wert des Parameters r_R ist ein Freiheitsgrad des Modells und wird durch eine spätere Anpassung an die experimentell ermittelten Daten innerhalb einer Parameterschätzung ermittelt (s. Abschnitt 5.3).

$$2 r_{Glycolat,Oxyg} - 2 r_{Glycolat} - 2 r_R = 0 \quad (5.10)$$

$$r_R \leq r_O \quad (5.11)$$

Phosphoglycerat wird sowohl in der Oxygenierungs- als auch in der Carboxylierungsreaktion gebildet. Aus dem Glycolat kann 75 % des Kohlenstoffs in Form von Glycerat dem Calvin-Benson-Zyklus zugeführt werden. Diese Stoffwechselwege werden in einer Kohlenstoffbilanz um den Knotenpunkt 4 (Abbildung 5.2) in Gleichung 5.12 berücksichtigt.

$$3 r_{Glycerat,Carb} + 3 r_{Glycerat,Oxyg} + \frac{3}{2} r_R - 3 r_{Glycerat} = 0 \quad (5.12)$$

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

Ribulose-1,5-bisphosphat wird aus Glycerat regeneriert und der RuBisCO zugeführt. Der überschüssige Kohlenstoff wird für die weitere Verwendung im Organismus in Form von Zucker-Äquivalenten als CH_2O fixiert. Dies wird durch die Kohlenstoffbilanz um den Punkt 5 in Abbildung 5.2 in Gleichung 5.13 berücksichtigt.

$$3 r_{\text{Glycerat}} + 5 r_{\text{RuBP}} - r_{\text{Fixierung}} = 0 \quad (5.13)$$

Der in Form von CH_2O -Äquivalenten fixierte Kohlenstoff steht außerhalb des Chloroplasten für die Gewinnung von Energie und Reduktionsäquivalenten (Tagrespiration) sowie zum Aufbau von Biomasse zur Verfügung. In Gleichung 5.14 wurde diese Verwertung von CH_2O -Äquivalenten für die Bildung von Biomasse und die Bildung von Energieträgern berücksichtigt. Für die Neubildung von Biomasse wird der anteilmäßige Kohlenstoff $e_{C,X}$ des Organismus benötigt. Die Respiration wurde durch den Parameter r_D berücksichtigt. Dieser Parameter ist ein Freiheitsgrad des Modells. Sein Wert wird durch die Anpassung an die experimentellen Daten über eine Parameterschätzung ermittelt.

$$r_{\text{Fixierung}} - e_{C,X} r_X - r_D = 0 \quad (5.14)$$

Gleichung 5.5 bis 5.14 bilden die stöchiometrischen Gleichungen des Organismus. Die Umrechnung von fixiertem Kohlenstoff in Biomasse erfolgt aufgrund des C-Gehaltes der Biomasse $e_{C,X}$. Der zu schätzende Parametersatz der kinetischen Konstanten umfasst die RuBisCO-Parameter sowie den durch $e_{C,X}$ beschriebenen Anteil von Kohlenstoff des Organismus. Letzterer ist direkt linear abhängig von der Tagrespiration. Es wird der in der Literatur angegebene Kohlenstoffanteil von $e_{C,X} = 0,5$ verwendet [143, 50].

5.2.3. Bilanzierung der Energieströme

Für die Kopplung von Massenbilanz und Energiebilanz wird die modellierte Stöchiometrie des Organismus um die Bilanzierung der absorbierten Photonen ergänzt. Die benötigten Reduktionsäquivalente (NADPH) und die nötige Energie (ATP) werden aus der Lichtreaktion gewonnen. Aufgrund der vorliegenden Reaktorkonstruktion kann davon ausgegangen werden, dass die in den Reaktor eingestrahlt Photonen vollständig von den Algen absorbiert werden. Diese spezifische Photonenflussrate $r_{Ph,Abs}$ wird aus der Geometrie und der Lichtintensität

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

des Beleuchtungsmoduls sowie der Biotrockenmasse in dem Reaktor gemäß Gleichung 5.15 berechnet.

$$r_{Ph,Abs} = \frac{r_{Ph,0} A_{LED}}{V_R c_X} \quad (5.15)$$

Mit A_{LED} der Fläche des Beleuchtungsmoduls, $r_{Ph,0}$ der eingestellten Photonflussrate des LED-Moduls, gemessen mit einem planaren Photonflussensor und V_R dem Volumen des Mediums im Reaktor. Die absorbierten Photonen werden von dem Photosystem entweder prozessiert oder als Fluoreszenz abgestrahlt (s. Knotenpunkt 7 in Abbildung 5.2 sowie Gleichung 5.16). Die Messung der Fluoreszenz ermöglicht die Aufteilung der eingestrahnten Photonen nach photochemisch genutzten und nicht genutzten (Fluoreszenz) Photonen und gibt die Kinetik des Photosystems vor (Gleichung 5.3).

$$r_{Ph,Abs} - r_{Ph,Proz} - r_{Ph,Dis} = 0 \quad (5.16)$$

Die Energie der prozessierten Photonen kann von dem Organismus auf zwei Weisen verwendet werden (Gleichung 5.17). So wird über den nichtzyklischen Elektronentransport durch die Ausbildung eines Protonengradienten und die Übertragung von Elektronen auf NADP in der Nettobilanz NADPH und ATP gebildet (Gleichung 5.19). In dem zyklischen Elektronentransport erfolgt lediglich die Bildung von ATP (Gleichung 5.18). Mit Hilfe der in Tabelle 2.2 gegebenen Ausbeuten an ATP pro Photon ($Y_{ATP,PhZ}$ bzw. $Y_{ATP,PhNZ}$) und NADPH pro Photon ($Y_{NADPH,PhNZ}$) wird über den Photonenstrom eine Energiebilanz erstellt.

$$r_{Ph,Proz} - r_{Ph,Z} - r_{Ph,NZ} = 0 \quad (5.17)$$

$$r_{ATP} - \frac{1}{4} Y_{ATP,PhZ} \cdot r_{PhZ} - \frac{1}{4} Y_{ATP,PhNZ} \cdot r_{PhNZ} = 0 \quad (5.18)$$

$$r_{NADPH} - \frac{1}{4} Y_{NADPH,PhNZ} \cdot r_{PhNZ} = 0 \quad (5.19)$$

Die Bildungsrate von ATP und NADPH des Photosystems ist stöchiometrisch gekoppelt mit dem Bedarf von ATP bzw. NADPH für die Stoffumsätze im Organismus (Gleichung 5.20 und 5.21).

$$r_{ATP} - r_{Glycerat} - (0,5 + 4/3 * 0,5) r_R - r_{RuBP} - \frac{1}{Y_{X,ATP}} r_X = 0 \quad (5.20)$$

$$r_{NADPH} - r_{Glycerat} - r_R = 0 \quad (5.21)$$

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

Das im Calvin-Zyklus gebildete CH_2O wird für die Bildung von Energieträgern und Reduktionsäquivalenten genutzt sowie als Kohlenstoffquelle für die Bildung von Biomasse. Eine Aufteilung in NADPH und ATP außerhalb des Chloroplasten wurde nicht vorgenommen. Auch in weiteren Modellen gelten 2,5 Mol ATP als Äquivalent zu 1 Mol NADPH [47]. Der ATP- und NADPH-Bedarf des Organismus für die Bildung neuer Biomasse wird in dem Parameter $Y_{X,ATP}$ zusammengefasst. Weiterhin wird für die Biomassebildung CH_2O entsprechend dem Kohlenstoffanteil $e_{C,X}$ des Organismus assimiliert. Die durch die Tagatmung zurückgewonnene Energie aus den CH_2O -Äquivalenten wird durch den Parameter $Y_{ATP,D}$ im Modell berücksichtigt. Die auf Massenbilanzen beruhende Gleichung 5.14 kann so um die Energiebilanz erweitert werden (Gleichung 5.22).

$$r_{\text{Fixierung}} - (e_{C,X} + Y_{X,ATP}) \cdot r_X + Y_{ATP,D} \cdot r_D = 0 \quad (5.22)$$

5.3. Anpassung der Modell-Parameter

Das erstellte Modell verfügt über einen Parametersatz, der aus den vier kinetischen RuBisCO-Konstanten $r_{C,max}$, k_C , $r_{O,max}$ und k_O besteht. Weitere Parameter sind die spezifische Rate der Tagrespiration r_D , die spezifische Wiederverwertungsrate von Glycolat r_R sowie der Anteil von Kohlenstoff in der Zelle $e_{C,X}$. Die Ausbeutekoeffizienten von ATP und NADPH des Photosystems ($Y_{NADPH,PhNZ}$, $Y_{ATP,PhNZ}$, $Y_{ATP,Ph,Z}$) sowie die Biomasseausbeute aus ATP ($Y_{X,ATP}$) und die ATP-Ausbeute aus der Tagrespiration ($Y_{ATP,D}$) sind weitere zu berücksichtigende Größen für die Energiebilanz. Zunächst wird gesondert die Schätzbarkeit der vier RuBisCO-Parameter betrachtet (Abschnitt 5.3.1). Nicht schätzbare Parameter (z.B. aufgrund ihrer linearen Abhängigkeit) wurden mittels Varianzanalyse identifiziert. Die simulierten Werte der Konzentrationen werden durch die Minimierung des quadratischen Fehlers an die Messdaten der in Tabelle 4.2 aufgeführten Experimente angepasst. Dies geschieht über eine Parameteranpassung der Freiheitsgrade des Modells. Die Datenanpassung erfolgt unter Berücksichtigung der Massenbilanzen für den Fall der RuBisCO-Limitierung. Zur Abbildung der Lichtlimitierung werden die Energiebilanzen hinzugezogen. Datengrundlage für die Parameterschätzung sind die in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Experimente im quasistationären

Gleichgewicht. Durch eine zeitlich dynamische Varianzanalyse wird der Fehler des jeweiligen geschätzten Parameters auf Grundlage des vorhandenen Datensatzes berechnet.

5.3.1. Sensitivitätsanalyse der RuBisCO-Kinetik

Die Carboxylierungs- und Oxygenierungsrate der aufgereinigten RuBisCO abhängig vom CO₂- und O₂-Partialdruck ist in Abbildung 2.4a aufgetragen. Die Reaktionsraten sind abhängig von den vier kinetischen Parametern k_C , k_O , $r_{C,max}$ und $r_{O,max}$. Der Auslegung der Experimente zur Bestimmung der Konstanten ging eine Sensitivitätsanalyse der RuBisCO-Reaktion voraus. Hierbei wurde die Abhängigkeit der Carboxylierungs- und Oxygenierungsrate (Gleichungen 2.3 und 2.4) von den vier kinetischen Parametern als Funktion des CO₂- bzw. O₂-Partialdrucks ermittelt. Die Betrachtung der Sensitivität χ_{abs} erfolgte durch die partielle Ableitung der Reaktionsraten hinsichtlich des jeweiligen Parameters (Gleichung 5.23). Eine Normierung auf den Wert des jeweiligen Parameters p und der spezifischen Bildungsrate r_i führt zu der relativen Sensitivität χ_{rel} (Gleichung 5.24). Je höher die Sensitivität ist, desto empfindlicher reagiert das System auf Änderungen des jeweiligen Parameters. Ist die Sensitivität niedrig, so verhält sich das System robust gegenüber Änderungen des Parameters. Für die Versuchsplanung bedeutet dies, dass Parameter mit niedriger Sensitivität aus der Reaktionsrate nur schwer ermittelbar sind.

$$\chi_{abs} = \frac{\partial r_i}{\partial p_i} \quad (5.23)$$

$$\chi_{rel} = \frac{\partial r_i}{\partial p_i} \frac{p_i}{r_i} \quad (5.24)$$

Zur Auslegung der Experimente wurde die Sensitivität mit dem Parametersatz für die aufgereinigte RuBisCO berechnet (Tabelle 2.1). Die relativen Sensitivitäten der Carboxylierungs- und der Oxygenierungsrate bezüglich der jeweiligen Parameter k_C , k_O , $r_{C,max}$ und $r_{O,max}$ sind in Abbildung 5.3 dargestellt. Abbildung 5.3a zeigt die relative Sensitivität der Carboxylierungs- und Oxygenierungsrate als Funktion des CO₂-Partialdrucks bei einem konstanten O₂-Partialdruck von 42 % des Gesamtdrucks. Abbildung 5.3b zeigt entsprechend die relative Sensitivität der beiden Reaktionsraten als Funktion des O₂-Partialdrucks bei einem konstanten CO₂-Partialdruck von 0,2 % des Gesamtdrucks. Die Sensitivität der Carboxylierungsrate ist bei einem CO₂-Partialdruck von über 0,5 % des Gesamtdrucks gering hinsichtlich der Änderung der Parameter k_C und k_O (Abbildung 5.3a). Eine Ermittlung dieser beiden Parameter ist die-

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

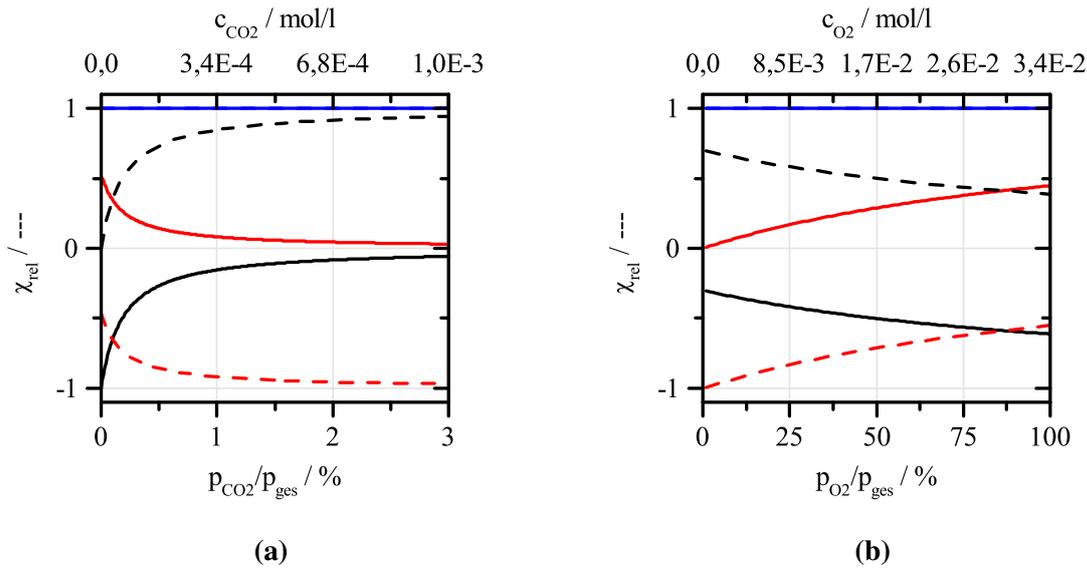


Abbildung 5.3.: Relative Sensitivität der (—) Carboxylierungsrate bzw. (- -) Oxygenierungsrate der RuBisCO in Abhängigkeit vom (a) CO₂-Partialdruck (bei konstanten 42 % O₂) und (b) O₂-Partialdruck (bei konstanten 0,2 % CO₂) und bezogen auf die Parameter (—) k_C , (—) k_O , (—) $r_{C,max}$ bzw. $r_{O,max}$ und abhängig vom O₂-Partialdruck bei einem konstanten CO₂-Partialdruck von 0,2 % CO₂ des Gesamtdrucks.

sem Bereich kaum möglich bzw. mit einem hohen relativen Fehler behaftet. Unabhängig vom CO₂ und O₂-Partialdruck hat der Parameter $r_{C,max}$ mit $\chi_{rel} = 1$ den gleichen relativen Einfluss auf die Carboxylierungsrate. $r_{C,max}$ kann daher bei hohem CO₂-Partialdruck gut anhand der Carboxylierungsrate ermittelt werden, da hier die relative Sensitivität der Carboxylierungsrate hoch ist, wohingegen die Konstanten k_C und k_O kaum einen Einfluss haben. In dem Bereich unter 0,5 % CO₂ des Gesamtdrucks führt eine Änderung der jeweiligen Parameter k_C oder k_O zu einer stärkeren Änderung der Carboxylierungsrate und somit zu einer höheren relativen Sensitivität. Durch die Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks kann diese Sensitivität noch weiter gesteigert werden. In Abbildung 5.3b ist dies für einen CO₂-Partialdruck von 0,2 % des Gesamtdrucks gezeigt. Der Einfluss von k_O und k_C auf die Oxygenierungsrate ist gegenläufig zu ihrem Einfluss auf die Carboxylierungsrate. Die relative Sensitivität der Oxygenierungsrate (mit gestrichelten Linien dargestellt) konvergiert mit steigendem CO₂-Partialdruck gegen den Wert 1. Eine Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks, wie in Abbildung 5.3b dargestellt, führt zu einer Verringerung der relativen Sensitivität. Die relative Sensitivität von $r_{O,max}$ ist mit $\chi_{rel} = 1$ konstant. Der Parameter $r_{O,max}$ kann somit ermittelt werden, wenn der CO₂-Partialdruck unter ca. 0,5 % des Gesamtdrucks liegt. Gut ersichtlich ist die jeweilige Zunahme bzw. Abnahme der relativen Sensitivität der Parameter k_C und k_O in Abhängigkeit vom CO₂- oder O₂-Partialdruck. In keinem Bereich hat nur einer der beiden Parameter eine hohe relative

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

Sensitivität. Eine getrennte Ermittlung von k_C und k_O ist daher schwierig. Für die Auslegung der Experimente wurden aufgrund dieser Ergebnisse CO_2 -Partialdrücke von über 1 % des Gesamtdrucks für die Betrachtung von $r_{C,max}$ anhand der Carboxylierungsrate sowie von k_O und k_C anhand der Oxygenierungsrate gewählt. CO_2 -Partialdrücke unterhalb von 0,5 % des Gesamtdrucks wurden für die Bestimmung von $r_{O,max}$ anhand der Oxygenierungsrate und von k_O und k_C anhand der Carboxylierungsrate eingestellt. Die Betrachtung der Selektivität in Gleichung 2.6 zeigt, dass die Werte k_C , k_O , $r_{O,max}$ und $r_{C,max}$ linear voneinander abhängig sind. Die Sensitivitätsanalyse von Carboxylierungs- und Oxygenierungsrate bezüglich der einzelnen RuBisCO-Parameter dient der Auslegung der Experimente, um die jeweiligen Parameter über eine Parameterschätzung bestimmen zu können (s. Abschnitt 5.3.1). Die Analyse zeigt, dass insbesondere die Parameter k_C und k_O nur schwer unabhängig voneinander zu ermitteln sind. Um die jeweils einzelne Schätzbarkeit der RuBisCO-Parameter zu untersuchen, erfolgte eine separate Anpassung der in Abbildung 4.13a gegebenen spezifischen Wachstums- und Glycolatproduktionsraten des Experiments durch Zugabe des Hemmstoffs EZA. Hierbei wurden die spezifischen Bildungsrate von Biomasse und Glycolat mit einer erweiterten RuBisCO-Kinetik angepasst (s. Gleichung 5.3.1 und 5.3.1 mit $c_{\text{CO}_2,min} = 0,09$ %). Dieser Ansatz folgt der in der Literatur üblichen Erweiterung der RuBisCO-Kinetik um den CO_2 -Partialdruck Γ^* [22].

$$r_C = \frac{r_{C,max} \cdot (c_{\text{CO}_2} - c_{\text{CO}_2,min})}{(c_{\text{CO}_2} - c_{\text{CO}_2,min}) + k_C \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{O}_2}}{k_O}\right)} \quad (5.25)$$

$$r_O = \frac{r_{O,max} \cdot c_{\text{O}_2}}{c_{\text{O}_2} + k_O \cdot \left(1 + \frac{(c_{\text{CO}_2} - c_{\text{CO}_2,min})}{k_C}\right)} \quad (5.26)$$

Die simultane Anpassung beider Raten erfolgte mittels Minimierung des Fehlerquadrats von gemessenen und berechneten Werten. Der entsprechende Matlab-Code ist in Anhang D.2 aufgeführt. Für die Anpassung der Bildungsrate wurden $i = 10$ verschiedene Startwerte definiert und die optimierten Parameter nach der Anpassung der Kinetik verglichen (Tabelle 5.1). Die Festlegung der Startwerte $k_{i,0}$ und $r_{i,max,0}$ erfolgte hierbei durch die Variation der Literaturwerte $k_{i,Lit}$ aus Tabelle 2.1 nach dem Schema $k_{i,0} = k_{i,Lit} \cdot 1/(i^2 \cdot 0,25)$, mit $i = 1 \dots 40$. Die Variation der Startwerte für die Parameterschätzung von $r_{i,max,0}$ erfolgte nach dem gleichen Schema für die maximal bestimmten experimentellen Raten für Biomasse- und Glycolatproduktion ($r_{C,max,0} = 20,9 \text{ mol}_{C,X}/\text{g/h}$ bzw. $r_{O,max,0} = r_{O,max,0}/3,7$). Hierdurch wurde bestätigt, dass die jeweiligen Werte der vier Parameter k_C , k_O , $r_{O,max}$ und $r_{C,max}$ über Größenordnungen

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

gen variieren können. Das jeweilige Verhältnis der kinetischen Konstanten, berechnet nach der Selektivität in Gleichung 2.6, ist hingegen mit einer relativen Standardabweichung von 0,1 % um den Wert $S = 74,8$ konstant.

Tabelle 5.1.: Schätzung der RuBisCO-Parameter mit verschiedenen Startparametern sowie der entsprechend optimierten Parameter und deren Verhältnis. Der Schätzalgorithmus ist in Anhang D.2 gegeben.

Durchlauf i	Optimierter Parameter				S
	$r_{C,max}^*$ in mol/g/h	k_C^* in mol/l	$r_{O,max}^*$ in mol/g/h	k_O^* in mol/g/h	—
1	2,74E-03	-6,47E-04	3,40E-05	-6,01E-04	74,86
2	3,55E-03	5,55E-14	5,98E-04	6,96E-13	74,45
3	3,52E-03	-1,40E-06	5,92E-04	-1,75E-05	74,32
4	2,74E-03	-6,47E-04	3,40E-05	-6,01E-04	74,86
5	3,55E-03	-2,74E-09	5,97E-04	-3,43E-08	74,44
6	3,52E-03	-1,07E-06	5,97E-04	-1,35E-05	74,39
7	2,74E-03	-6,47E-04	3,40E-05	-6,01E-04	74,86

5.3.2. RuBisCO-limitierte Kinetik

Die Experimente werden im Folgenden auf Grundlage des Modells der Stoffstrombilanzierung im Gesamtorganismus und der Annahme einer RuBisCO-limitierten Kinetik betrachtet. Die Bildungsrate von Biomasse und Glycolat werden also nicht durch weitere überlagernde Kinetiken, wie etwa einer Lichtlimitierung, eingeschränkt. Die stöchiometrischen Beziehungen im Organismus berücksichtigen die Gleichungen 5.5 bis 5.14 und ergeben die stöchiometrische Matrix A des Metabolismus (s. Abbildung 5.1). Der zu schätzende Parametersatz des Modells besteht somit aus den RuBisCO-Konstanten k_C , k_O , $r_{O,max}$ und $r_{C,max}$ sowie dem Kohlenstoffanteil der Biomasse $e_{C,X}$ und den spezifischen Raten r_D und r_R . Eine Varianzanalyse auf Grundlage der Fisher-Informationsmatrix (s. Abschnitt 3.5.4) sowie die Sensitivitätsanalyse in Abschnitt 5.3.1 zeigen, dass die vier RuBisCO-Parameter durch Experimente bei konstantem Sauerstoffpartialdruck (also insbesondere bei den Experimenten mit EZA und CCM2, s. Tabelle 4.2) nur mit hohem Fehler oder gar nicht unabhängig voneinander ermittelbar sind. Durch eine Reduktion der zu schätzenden Parameter wird dieser Fehler verringert. Die relative Aufteilung in Oxygenierungs- und Carboxylierungsrate der RuBisCO-Kinetik ist

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

als Selektivität S mit nur einem Parameter beschreibbar. Neben der relativen Aufteilung von Oxygenierungs- und Carboxylierungsrate kann aus der Anpassung der Daten die maximale spezifische Carboxylierungsrate $r_{C,max}$ berechnet werden. Die gute Bestimmbarkeit dieses Parameters zeigt auch die vom CO_2 -Partialdruck unabhängige hohe Sensitivität der Carboxylierungsrate vom Parameter $r_{C,max}$ (Abschnitt 5.3.1). Entsprechend ist der mittels Varianzanalyse berechnete Fehler bei der Schätzung von $r_{C,max}$ gering. Die Oxygenierungsrate ist durch das Recycling von Glycolat durch dessen Konzentration im Medium nur bedingt zugänglich. Das Verhältnis von Carboxylierungsrate zu Oxygenierungsrate wird in der Literatur für die aus *C. reinhardtii* aufgereinigte RuBisCO als $r_{C,max}/r_{O,max} = 3,7$ angegeben. Die vier RuBisCO-Parameter können mit diesen Daten auf zwei reduziert werden. So wurde bei der Anpassung der Experimente CCM2 und EZA vorgegangen. Um die Annahmen zu validieren, erfolgte zudem eine Schätzung aller vier RuBisCO-Parameter für die Experimente CCM3 und CCM4. Die Prozesseinstellungen dieser Experimente unterscheiden sich lediglich in den eingestellten O_2 -Partialdrücken von 16 % bzw. 42 % des Gesamtdrucks. Werden die Messdaten aus beiden Experimenten verwendet, sind die vier Parameter der RuBisCO nach der Analyse mittels Fisher-Informationsmatrix gut schätzbar. Zusätzlich erfolgte die Schätzung der einzelnen Experimente CCM2 und CCM3 mit den Literaturangaben der Parameter k_C und k_O und dem Verhältnis $r_{O,max}/r_{C,max}$. Als Startwerte für die Parameterschätzung wurde die maximale Carboxylierungsrate $r_{C,max} = 0,003 \text{ mol/g/h}$ gewählt, was der Kohlenstoffassimilierungsrate im Fall maximalen Wachstums entspricht. r_D und r_R wurden zum Start der Schätzung gleich Null gesetzt. Die Startwerte für die Parameter k_C , k_O , $r_{O,max}$ entsprachen den Literaturangaben. Die Schätzung erfolgte wie in Abschnitt 3.5.6 beschrieben. Die optimierten Parameter sind in Tabelle 5.2 aufgeführt. Eine genaue zeitliche Betrachtung der Simulation erfolgt für das Experiment EZA. Der Parametersatz für die Simulation ist in Tabelle 5.2 aufgeführt (Parametersatz 5.2).

In Abbildung 5.4 sind die Durchflussrate und die Gaspartialdrücke sowie die online gemessene optische Dichte der Suspension in Abhängigkeit von der Prozesszeit aufgetragen. Die eingestellte optische Dichte wurde über den Prozessverlauf zweimal geändert, um den Extinktionskoeffizienten der Suspension so anzupassen, dass eine gleichmäßige Lichtverteilung in dem Reaktor gewährleistet ist (s. Abschnitt 3.2.3). Gemäß Gleichung 2.3 und 2.4 wurden aus den Gaspartialdrücken die Carboxylierungs- und Oxygenierungsrate der RuBisCO berechnet. Durch Lösen des Gleichungssystems $A \cdot r_i = b_i$ wurden die weiteren spezifischen Raten r_i aus der stöchiometrischen Matrix A ermittelt. Durch Integration der spezifischen Biomasse- und Glycolatbildungsrate im Reaktorblock wurden die in Abbildung 5.5 dargestellten Konzentrationen von Biomasse und Glycolat berechnet. Der quadratische Fehler von

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

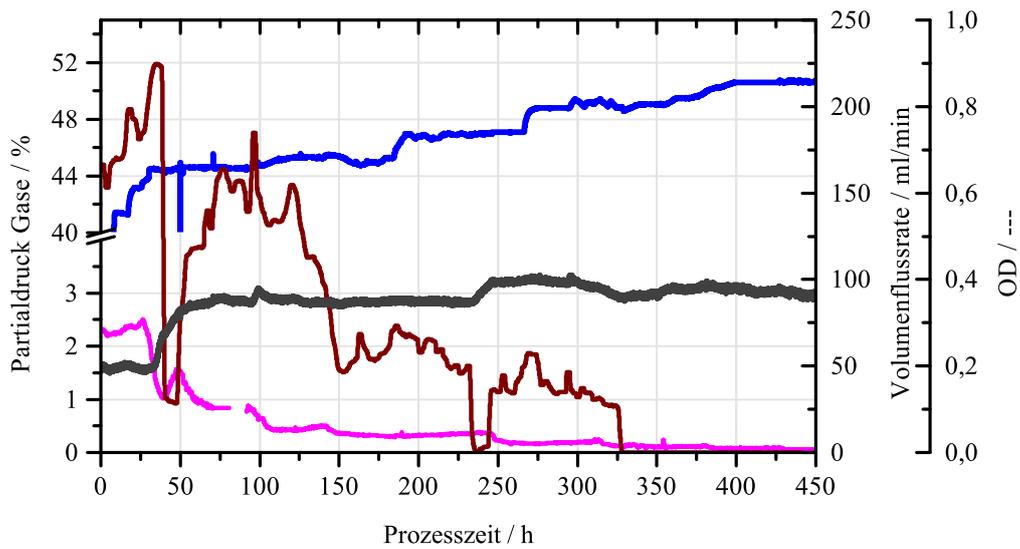


Abbildung 5.4.: Eingangsdaten der Simulation für die Parameterschätzung des Experiments EZA: Partialdruck von (—) CO_2 und (—) O_2 in Bezug auf den Gesamtdruck, (—) Volumflussrate des Mediums, (—) online aufgenommene optische Dichte

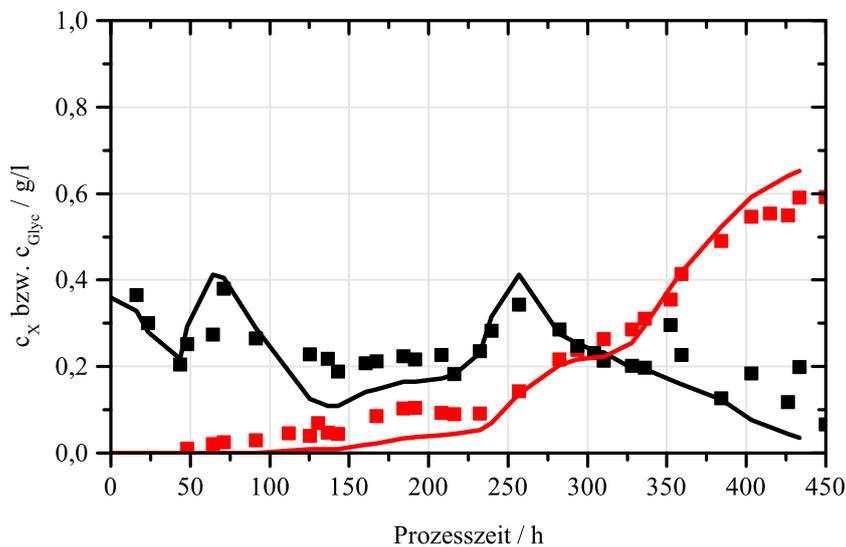


Abbildung 5.5.: Die (—, —) berechnete und (■) gemessene Biomasse- bzw. (■) Glycolatkonzentrationen in dem Reaktor während des Experiments EZA.

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

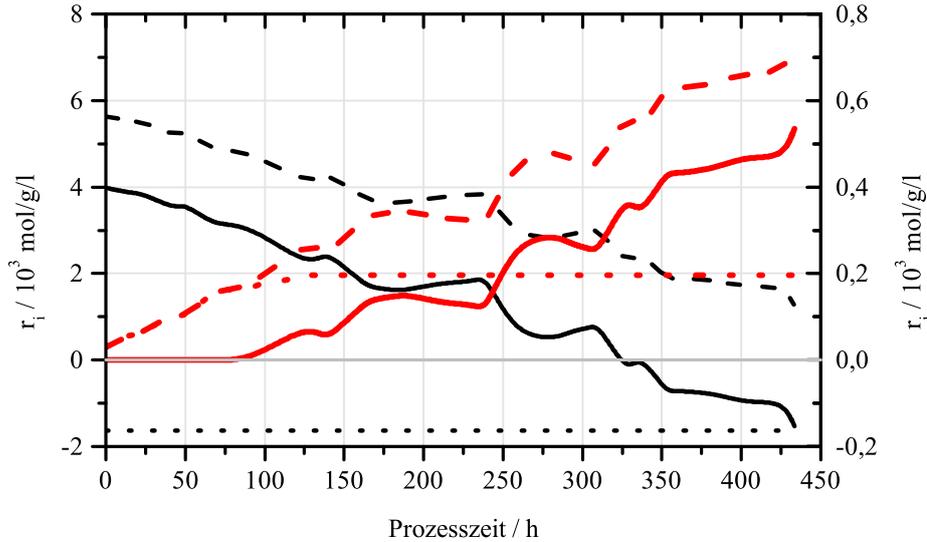


Abbildung 5.6.: Simulierte spezifische Bildungsraten des Experiments EZA: (—) effektive Biomassebildungsrate r_X , (- -) Carboxylierungsrate der RuBisCO r_C , (· - ·) Tagrespiration der RuBisCO r_D , (—) effektive Glycolatexkretionsrate r_{Glyc} , (- -) Oxygenierungsrate der RuBisCO r_O , (· - ·) Glycolatre-cyclingrate r_R .

1,15 g²/l² für diese Anpassung zeigt, dass die simulierten Daten mit denen der realen Messung gut übereinstimmen. Abweichungen in der Prozessführung vom quasistationären Zustand des Turbidostaten, also $dc_X/dt = 0$, werden in der Differentialgleichung 3.7 zur Beschreibung der Bildungsraten berücksichtigt und von dem Modell ebenfalls gut angepasst. Die Änderung der optischen Dichte der Suspension führt zu einer Änderung der Biomassekonzentration in den Zeiträumen zwischen 0 bis 75 h sowie zwischen 225 h bis 300 h. Durch verringerte oder erhöhte Durchflussraten wurde der quasistationäre Zustand der Biomassekonzentration kurzfristig verlassen, was zu einer entsprechenden Zu- bzw. Abnahme der Biomassekonzentration führt. In der Prozesszeit von 125 bis 200 h wird die Biomassekonzentration von dem Modell leicht unterschätzt. Dies führt durch die Integration der spezifischen Glycolatbildungsrate zwangsläufig zu der Unterschätzung der Glycolatkonzentration. Der CO₂-Partialdruck liegt in diesem Zeitraum bei 0,42 % des Gesamtdrucks bzw. nach Gleichung 3.10 bei einer Konzentration von $c_{CO_2} = 1,43 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Die Betrachtung der Carboxylierungsrate der RuBisCO in Abbildung 2.4 oder 4.13 zeigt, dass durch die Werte von k_C und k_O bei Verringerung des CO₂-Partialdrucks in diesem Bereich eine starke Verringerung der Carboxylierungsrate bewirkt wird. In Abbildung 5.6 sind die spezifischen Bildungsraten der Oxygenierungsreaktion der intrazellulären RuBisCO $r_{RuBP,Oxyg}$, die spezifische Glycolatexkretionsrate r_{Glyc} und die spezifische Rate des Glycolatre-cyclings r_R aufgetragen. Die Ausbildung eines quasistationären

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

Zustands nach Änderung der Partialdrücke ist durch die konstanten spezifischen Bildungsra-
ten zu erkennen (in den Zeiträumen PZ = 72 bis 91, 169 bis 238, 260 bis 310, 354 bis 427 h).
Bis zu einer Prozesszeit von 93 h weisen $r_{RuBP,Oxyg}$ und r_R gemäß der Ungleichung 5.11 den
gleichen Wert auf. Das in der Oxygenierungsreaktion der RuBisCO gebildete P-Glycolat kann
vollständig recycelt werden und die Exkretionsrate von Glycolat r_{Glyc} ist damit gleich Null.
Ab einer Prozesszeit von 93 h wird die geschätzte maximale Wiederverwertungsrate erreicht
und intrazellulär gebildetes P-Glycolat wird exkretiert ($r_{Glyc} > 0$).

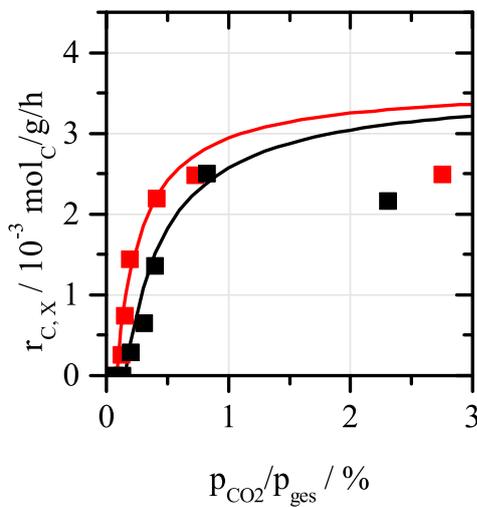
Für die Biomassebildung r_X sind die Carboxylierungsrate der RuBisCO $r_{RuBP,Carb}$ und die
Tagatmung r_D relevant. Diese werden zusammen mit der Fixierungsrate von Kohlenstoff in
Form von Biomasse $r_{C,X}$ in Abbildung 5.6 dargestellt. Analog zu der Oxygenierung innerhalb
des Organismus werden bei der Carboxylierung quasistationäre Gleichgewichte bei den spezi-
fischen Bildungsraten angenommen. Die konstante Tagrespiration führt zu einer Verringerung
der Biomassebildungsrate und im Fall von sehr geringen CO_2 -Partialdrücken auch, wie expe-
rimentell bestätigt, zu einem Abbau von Biomasse.

Die Schätzung der Parameter erfolgte für die weiteren Experimente analog zu dem oben be-
schriebenen Vorgehen. In Tabelle 5.2 werden die Werte der geschätzten Parameter aufgeführt.
Zur Bewertung der Modellgüte werden hier auch die quadratischen Fehler angegeben. Für
eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Anpassungen der Experimente wurden in Ab-
bildung 5.7 die spezifischen Biomasse- und Glycolatproduktionsraten als Funktion des CO_2 -
Partialdrucks aufgetragen. Die durchgezogenen Linien entsprechen den berechneten Werten
aus der Modellanpassung. Die Punkte entsprechen den bestimmten Raten aus Abschnitt 4.
Die Abbildung 5.7 zeigt die Biomassebildungsrate mit und ohne den Zusatz von EZA. Ana-
log sind die Glycolatbildungsrate in der Abbildung 5.8 dargestellt. Durch die gleichzeitige
Schätzung der Experimente CCM3 und CCM4 (s. Tabelle 5.2 Schätzung # 4) wurden die Wer-
te der Parameter k_C und k_O für die *in situ*-RuBisCO-Kinetik ermittelt. Auch bei Beachtung
des größeren Datensatzes beider Experimente bei jeweils unterschiedlichem O_2 -Partialdruck
können die Werte von k_C und k_O nur mit hohem Fehler bestimmt werden (s. Tabelle 5.3).
Der quadratische Fehler zwischen simulierten und gemessenen Konzentrationen von Biomas-
se und Glycolat ist höher als die Summe der jeweils einzelnen Schätzungen bei denen die
Werte von k_C und k_O aus der Literatur für die aufgereinigte RuBisCO vorgegeben wurden.
Die kinetischen Konstanten unterscheiden sich im Falle von k_C um ca. 7 %, im Falle von k_O
um 43 % von den Literaturangaben. Der Wert der aus den vier Parametern berechneten Se-
lektivität ist mit $S = 33,04$ fast 50 % geringer als der Literaturwert. Die Varianzanalyse zeigt,
dass insbesondere der Parameter k_O nur mit hohem Fehler schätzbar ist (s. Parametersatz # 4
Tabelle 5.3). Der hohe Schätzfehler und der geringe Wert von S deuten darauf hin, dass der

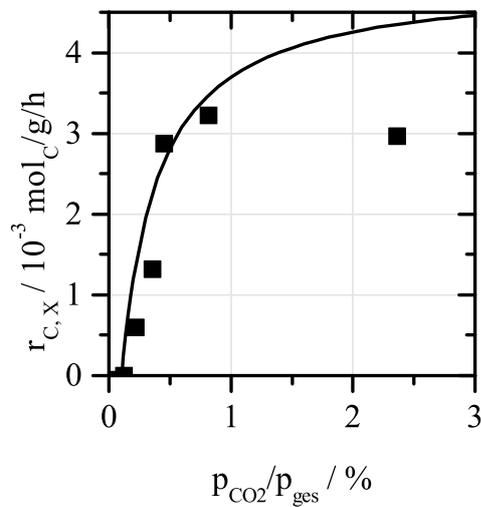
5. Modellbildung der Glycolatproduktion

Tabelle 5.2.: Angepasste Parameter sowie der quadratische Fehler für die jeweiligen Experimente. Parameter für die keine Werte geschätzt wurden, sind mit „—“ gekennzeichnet. k_C und k_O wurden den Werten aus Tabelle 2.1 gleichgesetzt. Im Falle der nicht geschätzten Raten wurden diese gleich Null gesetzt. Bei Parametersatz # 4 wurden die Experimente CCM3 und CCM4 simultan mit dem gleichen Parametersatz angepasst.

Exp.	#	Parameter						Fehler
		k_C in $\cdot 10^{-5}$ mol/l	k_O in $\cdot 10^{-4}$ mol/l	$r_{C,max}$ in $\cdot 10^{-3}$ mol/g/h	$r_{O,max}$ in $\cdot 10^{-3}$ mol/g/h	r_D in $\cdot 10^{-3}$ mol/g/h	r_R in $\cdot 10^{-4}$ mol/g/h	
CCM2	1	—	—	2,65	0,72	0,23	0,53	0,11
CCM3	2	—	—	5,16	1,38	2,09	3,50	7,35
CCM4	3	—	—	4,93	1,33	1,76	2,04	4,05
CCM3/4	4	3,10	2,77	4,23	1,14	1,06	3,50	9,95/4,94
EZA	5.1	—	—	5,65	0,15	1,23	—	1,94
	5.2	—	—	5,91	1,60	1,62	2,09	1,13



(a) $r_{C,X}$ ohne EZA



(b) $r_{C,X}$ mit EZA

Abbildung 5.7.: Berechnete (—) und gemessene (■) spezifische Raten der Kohlenstoffassimilierung durch das Biomassewachstum. (a) Ohne den Zusatz von EZA, berechnet mit dem Parametersatz # 2 in Tabelle 5.2 für einen O_2 Partialdruck von (■) 16 % bzw. (■) 45 % des Gesamtdrucks (b) Mit dem Zusatz von EZA, berechnet mit dem Parametersatz # 5.2 in Tabelle 5.2 für einen O_2 Partialdruck von (■) 42 % des Gesamtdrucks.

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

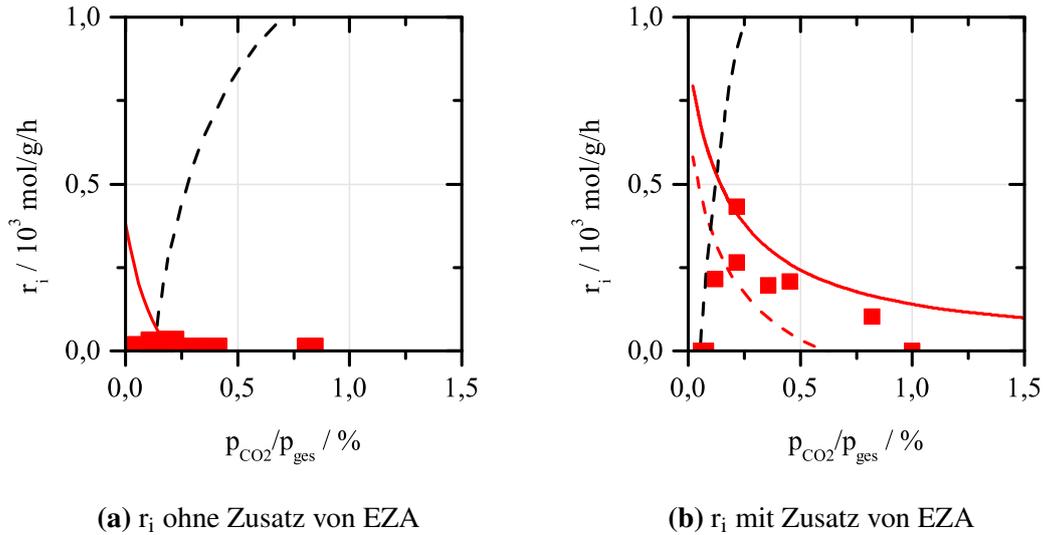


Abbildung 5.8.: Berechnete (—) und gemessene (■) spezifische Raten der Glycolatexkretion sowie die (- -) spezifische Rate der Kohlenstoffassimilation ($r_{RuBP,Carb} - r_D$). (a) Ohne die Zusatz von EZA berechnet mit dem Parametersatz 2 in Tabelle 5.2 und den experimentellen Daten von Exp. CCM3. (b) Mit Zusatz von EZA berechnet nach (- -) Parametersatz 5.1 ($r_R = 0$ mol/g/h) bzw. (—) Parametersatz 5.2 (mit $r_R \neq 0$ mol/g/h) in Tabelle 5.2 und den experimentellen Daten von Exp. EZA.

Wert k_O unterschätzt wurde. Eine Anpassung mit den Literaturangaben von k_C und k_O erfolgte ebenfalls (s. Parametersatz # 2 und # 3 in Tabelle 5.3). Ein Vergleich der Bildungsraten des Parametersatzes # 4 mit den Parametersätzen # 2 und #3 zeigt für den jeweils geschätzten Parameter von $r_{C,max}$ Abweichungen von 19 % für CCM2 und 15 % für CCM3. Die Abweichungen für die weiteren Parameter betragen jeweils 50 % bzw. 40 % für r_D und 0 % bzw. 70 % für r_R . Der mittels Varianzanalyse berechnete Schätzfehler der Parameter wird bei der Verwendung der Literaturdaten um eine Potenz verringert (s. Tabelle 5.3). Da der Schätzfehler bei den weiteren Experimenten noch höher ist, werden für die folgende Ermittlung der Modell-Freiheitsgrade k_C und k_O aus der Literatur vorgegeben.

Für die maximalen spezifischen Carboxylierungsraten der Experimente CCM3 und CCM4 (beide $I_0 = 347 \mu E/(m^2s)$) wurden so Werte von $5,16 \cdot 10^{-3}$ bzw. $4,93 \cdot 10^{-3}$ mol/g/h ermittelt. Der Wert der Tagrespiration r_D liegt im Bereich von 35 bzw. 40 % der jeweiligen maximalen Carboxylierungsrate. Dieser hohe Anteil der Tagrespiration erklärt den minimal notwendigen CO_2 -Partialdruck, bei dem eine Kohlenstoffassimilation in Form von Biomasse möglich ist. Dieser minimale CO_2 -Partialdruck beträgt 0,11 % bei einem O_2 -Partialdruck von ca. 42 % des Gesamtdrucks. Die exakte Bilanzierung von Kohlenstoff ermöglicht die Unterscheidung zwischen Kohlenstoffbedarf für die Tagrespiration und dem Verlust von assimiliertem Kohlenstoff durch Glycolatexkretion oder Glycolatrecycling. Da die Glycolatexkretion

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

bei den Experimenten sehr gering ist, kann hier von einem CO_2 -Partialdruck Γ^* von annähernd 0,01 % des Gesamtdrucks für den C-Bedarf der Glycolatbildung ausgegangen werden. Aus den für $r_{C,max}$ ermittelten Werten und dem Verhältnis der Oxygenierungsreaktion zur Carboxylierungsreaktion von $r_{O,max}=r_{C,max}/3,7$ wird die Oxygenierungsrate der RuBisCO berechnet. Die tatsächliche Exkretionsrate von Glycolat nimmt in den Experimenten CCM3 und CCM4 einen um den Faktor 9 geringeren Wert an als erwartet. Dass dies nicht durch die RuBisCO-Kinetik erklärbar ist, zeigt die hohe Glycolatexkretion bei Zusatz von EZA. Durch die Anpassung der Recyclingrate r_R des Glycolats kann die Glycolatkonzentration in dem Modell berechnet werden. Die angepasste Recyclingrate beträgt bei den Experimenten CCM3 und CCM4 73,9 bzw. 71,4 % des intrazellulär gebildeten Glycolats. Wurde EZA zugesetzt, ergab die Schätzung eine um 13 % höhere Carboxylierungsrate. Die Tagatmung wird hierbei mit 23,3 % der maximalen Carboxylierungsrate $r_{C,max}$ wesentlich geringer geschätzt als in den Experimenten ohne EZA-Zugabe. Da diese Werte in der Berechnung linear voneinander abhängig sind, kann eine Unterschätzung des Werts der Tagatmung zu einer Unterschätzung der maximalen Carboxylierungsrate führen. Mit 0,12 % des Gesamtdrucks ist der minimale CO_2 -Partialdruck für die Kohlenstoffassimilation den Werten der Schätzung der CCM3 und CCM4-Experimente sehr ähnlich. Die Glycolatkonzentration kann im Falle des EZA-Zusatzes mit der spezifischen Wiederverwertungsrate r_R oder ohne sie (d.h. $r_R = 0$) gut angepasst werden (s. Abbildung 5.8b). Für den Fall einer Restaktivität der Wiederverwertung liegt der Wert dieser Rate im Bereich von ca. 30 % des intrazellulär gebildeten Glycolats.

Bei dem Experiment CCM2 wurde eine geringere Lichtintensität von $147 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ eingestellt. Eine Anpassung der Messdaten gelingt nur mit einer wesentlich geringeren maximalen Carboxylierungsrate der RuBisCO von $r_{C,max} = 2,65 \cdot 10^{-3} \text{ mol/g/h}$. Damit ist der Parameter um den Faktor von ca. 2 geringer als bei den Experimenten CCM3 und CCM4 mit einer Lichtintensität von $347 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$. Es muss beachtet werden, dass die Parameter aufgrund von wenigen Messwerten bei geringem CO_2 -Partialdruck nur mit hoher Unsicherheit geschätzt werden können (s. Tabelle 5.3). Trotzdem ist ein reduziertes Wachstum aufgrund einer Änderung der maximalen Carboxylierungsrate unwahrscheinlich. Neben der RuBisCO-Limitierung ist daher eine energetische Limitierung der Bildungsraten mit einzubeziehen. Dies wird in dem folgenden Abschnitt 5.3.3 betrachtet.

5.3.3. Energetische Ausbeute des Organismus

Die Gleichungen 5.15 bis 5.22 erweitern die Massenbilanzen des Modells um die Energiebilanz des Organismus. So kann neben den RuBisCO-limitierten Bildungsraten die energeti-

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

Tabelle 5.3.: Untere Schranke der Streuung der Parameterschätzfehler-Kovarianzmatrix durch die Fisher-Informationsmatrix.

Exp.	#	Schätzfehler der Parameter					
		γ_{l,k_C}	γ_{l,k_O}	$\gamma_{l,r_{C,max}}$	$\gamma_{l,r_{O,max}}$	γ_{l,r_D}	γ_{l,r_R}
		%	%	%	%	%	%
CCM2	1	—	—	89,62	—	601,35	589,40
CCM3	2	—	—	11,34	—	11,95	19,61
CCM4	3	—	—	10,54	—	12,50	35,60
CCM3/4	4	2169,58	967,59	1242,94	—	—	215,36
EZA	5.1	—	—	6,47	—	8,26	—
	5.2	—	—	6,47	—	8,89	17,04

sche Ausbeute des Organismus und eine eventuelle lichtlimitierte Kinetik untersucht werden. Die vom Organismus umgesetzte Energie wird aus der Flussrate der eingestrahnten Photonen (s. Abschnitt 5.2.3) und der Kinetik des Photosystems berechnet (s. Abschnitt 5.2.1). Die aus der Photonenflussrate berechnete Umsatzrate an Ribulose-1,5-bisphosphat wurde nach der Gleichung 2.5 der RuBisCO-Reaktion mit einer Selektivität von $S = 61 \text{ mol/mol}$ auf die Carboxylierungs- und die Oxygenierungsreaktion aufgeteilt [41]. Der zu schätzende Parametersatz des Modells besteht aus den Freiheitsgraden der Massenbilanz (r_D , r_R und dem Kohlenstoffanteil des Organismus, der gleich $e_{CX} = 0,5 \text{ gC/g}_X$ gesetzt wurde). Die Freiheitsgrade der Energiebilanzierung sind die Ausbeuten an ATP und NADPH, gebildet im nichtzyklischen Elektronentransport ($Y_{ATP,PhNZ}$ und $Y_{NADPH,PhNZ}$) sowie im zyklischen Elektronentransport ($Y_{ATP,PhZ}$) des Photosystems. Diese Ausbeutekoeffizienten der Photonen hinsichtlich ATP und NADPH können biologisch bedingt zwischen den in Tabelle 2.2 aufgeführten Werten variieren. Für die Parameterschätzung wurden diese Werte als Grenzen der Ausbeutekoeffizienten gesetzt. Die vom Organismus umgesetzte Energie wird gemäß Gleichung 5.22 in einen vom Biomassewachstum abhängigen sowie einen vom Biomassewachstum unabhängigen Term aufgeteilt. Der für die Biomasseneubildung benötigte Energiebedarf wurde in dem zu schätzenden Parameter $Y_{X,ATP}$ zusammengefasst. Die Bildung von ATP aus CH_2O -Äquivalenten bei der Tagrespiration r_D wird durch den Parameter $Y_{ATP,D}$ berücksichtigt. Im Folgenden werden die Werte der Parameter durch Minimierung des quadratischen Fehlers von der gemessenen zu der berechneten Biomasse- und Glycolatkonzentration ermittelt.

Abbildung 5.9 zeigt die Eingangsparameter für die Berechnung der Bildungsraten des Expe-

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

riments EZA in Abhängigkeit von der Prozesszeit. Die Eingangsparameter sind die Partialdrücke von CO_2 und O_2 sowie die Verdünnungsrate D (Analog zu Abbildung 5.6). Zusätzlich wird aus der Messung der Kinetik des Photosystems die gemessene photosynthetische Aktivität (Y_{II}) vorgegeben. Nicht gezeigt ist als weiterer Eingangsparameter die über die Prozesszeit konstant vorgegebene Photonenflussrate von $I_0 = 232 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$. Die mit dem Modell berechneten und die gemessenen Glycolat- und Biomassekonzentrationen sind analog zu Abbildung 5.5 in Abbildung 5.10 dargestellt. Die Werte der für die Berechnung verwendeten Parameter sind in Tabelle 5.4 als Parametersatz # 9 angegeben. Die Daten können mit einem geringen quadratischen Fehler von 0,4 angepasst werden. Die Auftragung der spezifischen Raten in Abbildung 5.11 zeigt die gekoppelte Bilanzierung von Masse- und Energieströmen. Biomasse- und Glycolatbildung haben einen unterschiedlichen ATP- und NADPH-Bedarf. Der Bedarf von Energie- und Reduktionsäquivalenten nimmt bei geringerem CO_2 -Partialdruck und daraus resultierenden verringerten Bildungsraten ab; die verringerte Rate prozessierter Photonen verdeutlicht dies. Mit verringerter Wachstumsrate und erhöhter Glycolatproduktionsrate sinkt zudem das Verhältnis von umgesetzten ATP/NADPH. Dies erfordert eine Anpassung des Photosystems der Algen. Da die Ausbeutekoeffizienten über die Prozesszeit konstant sind, ist die Anpassung im Verlauf der Prozesszeit an einer Veränderung der Aufteilung der Photonen zwischen zyklischem (ATP-Produktion) und nichtzyklischem (NADPH- und ATP-Produktion) Elektronentransport zu erkennen. Die Verringerung des Bildungsratenverhältnisses von ATP/NADPH ist in Abbildung 5.11 gezeigt. Während für die Deckung des ATP-Bedarfs bei hohen CO_2 -Partialdrücken Elektronen teilweise zyklisch transportiert wurden, ist bei geringen CO_2 -Partialdrücken diese Rate gleich Null.

Eine Fehlerbetrachtung der geschätzten Parameter ist in Tabelle 5.5 dargestellt. Ein wesentliches Ziel der gekoppelten Betrachtung von Stoff- und Energieumsatz ist die Berechnung der energetischen Ausbeutekoeffizienten. Nur mit genauer Kenntnis des Energieumsatzes im Organismus gelingt es, eine effiziente Auslegung des Prozesses der Glycolatproduktion zu erreichen und Limitierungen aufzuklären. Durch die Fisher-Analyse kann der Fehler der ermittelten Parameter berechnet werden. Die Schätzbarkeit und die Höhe des Fehlers sind abhängig von dem Parametersatz. So können nach der Fisher-Analyse die Parameter r_D , r_R und $Y_{ATP,D}$ nur mit sehr hohem relativen Fehler gemeinsam geschätzt werden (s. Tabelle 5.5 berechnet für EZA). Die Varianzanalyse der Datengrundlage zeigt, dass der berechnete relative Schätzfehler für die spezifischen Rate der Tagrespiration r_D und des Glycolatrecyclings r_R mit über 10^4 % sehr hoch ist (s. Tabelle 5.5). Die Parameter r_D und r_R sind bei hohen Lichtintensitäten und geringen spezifischen Bildungsraten durch die RuBisCO-Limitierung begründet. Der hohe Anteil an Fluoreszenz (s. Abbildung 5.11) zeigt, dass in dem Bereich geringer CO_2 -

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

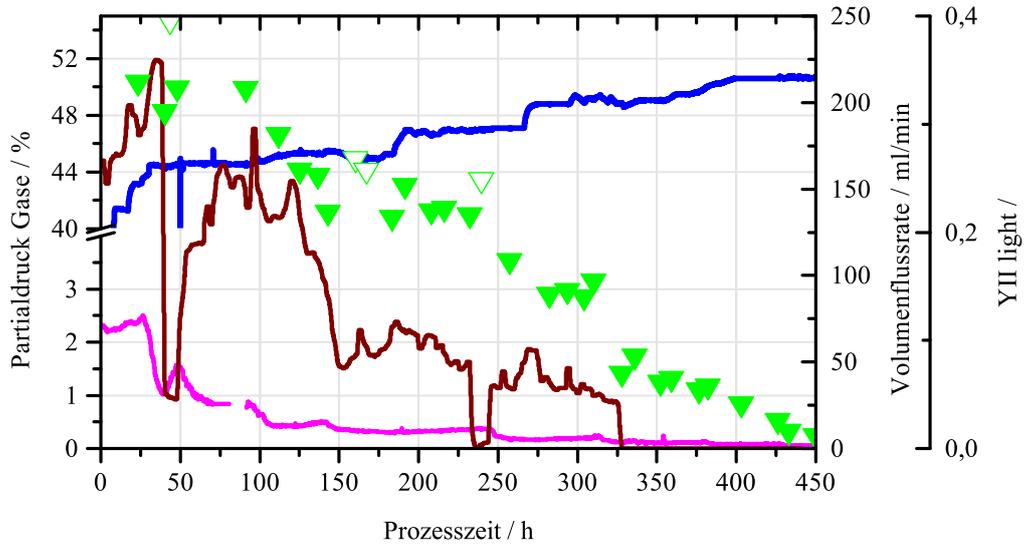


Abbildung 5.9.: Eingangdaten des Modells: (—) O₂-Partialdruck, (—) CO₂-Partialdruck, (—) Volumenstrom Medium, (▽) YII.

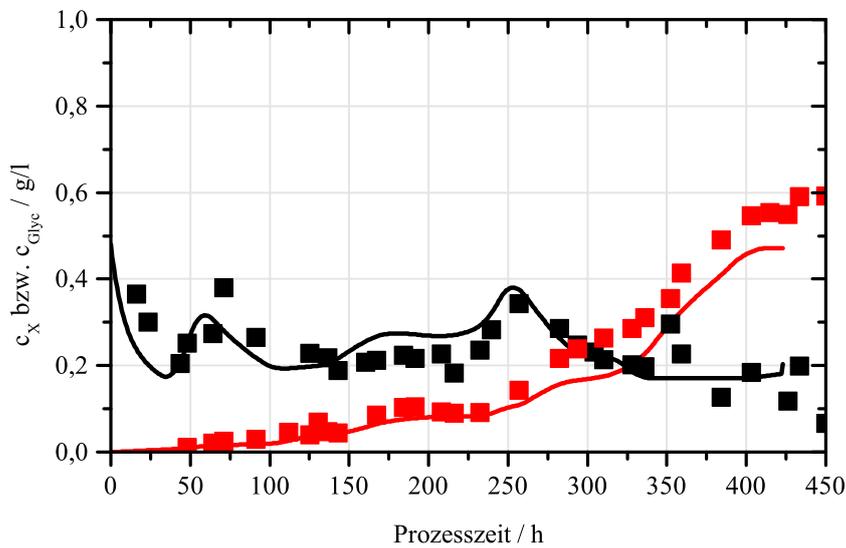


Abbildung 5.10.: Berechnete (—, —) und gemessene (■) Konzentrationen der (■) Biomasse und des (■) Glycolats. Für die Berechnung wurde Parametersatz # 9 aus Tabelle 5.2 verwendet.

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

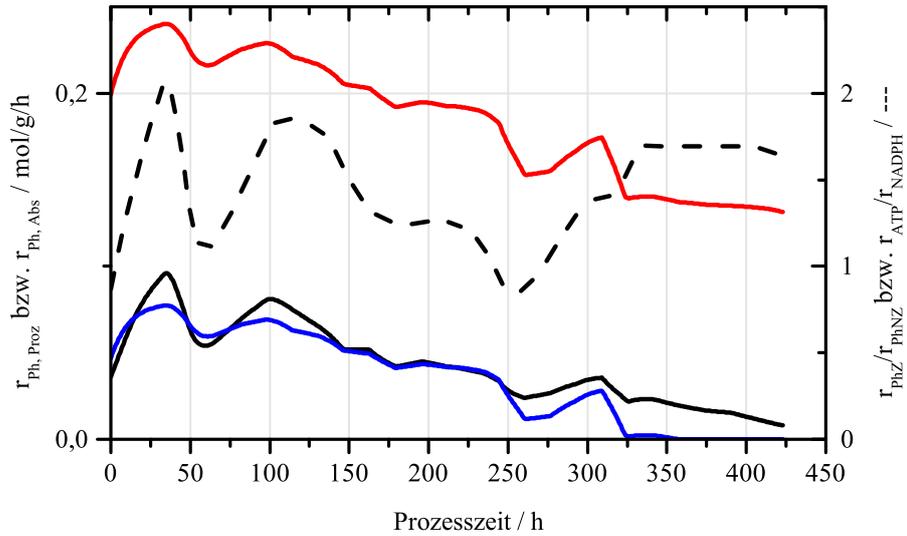


Abbildung 5.11.: Berechnete spezifische Raten der (- -) absorbierten $r_{Ph,abs}$ und (—) prozessierten Photonen $r_{Ph,proz}$, der Anteil von (—) r_{PhNZ}/r_{PhZ} sowie (—) r_{ATP}/r_{NADPH} . Für die Berechnung wurde Parametersatz # 9 aus Tabelle 5.2 verwendet.

Tabelle 5.4.: Angepasste Parametersätze $Y_{ATP,PhNZ}$, $Y_{ATP,PhZ}$, $Y_{X,ATP}$ und $Y_{ATP,D}$ berechnet aus dem um die Photonenbilanz erweiterten Gleichungssatz. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{X,Ph,Proz}$ wurde aus den modellierten Daten der spezifischen Biomassebildung und der Rate prozessierter Photonen berechnet. Die spezifischen Raten r_D und r_R wurden aus der Schätzung (s. Tabelle 5.2) übernommen und als konstant angenommen. Der quadratische Fehler der berechneten und gemessenen Daten ist außerdem angegeben.

Exp.	#	Parameter					Fehler
		$Y_{ATP,PhNZ}$	$Y_{ATP,PhZ}$	$Y_{X,ATP}$	$Y_{X,Ph,Proz}$	$Y_{ATP,D}$	
		in mol/mol	in mol/mol	in mol/mol	in g/mol	in mol/mol	
CCM2	6	1,57	1,33	1,79	1,38	-0,04	0,01
CCM3	7	1,34	1,33	1,87	1,39	-0,48	0,08
CCM4	8	1,33	1,33	2,17	1,68	-1,10	0,25
EZA	9	1,37	1,33	0,38	1,12	-0,44	0,35

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

Tabelle 5.5.: Untere Schranke der Streuung $\gamma_{l,i}$ der Parameterschätzfehler-Kovarianzmatrix durch die Fisher-Informationsmatrix. Der jeweilige Fehler des Parameters i ist für die Messdaten der einzelnen Experimente und den in Tabelle 5.4 aufgeführten Werten der Parameter berechnet.

Exp.	Schätzfehler der Parameter				
	$\gamma_{l,Y_{ATP,PhNZ}}$	$\gamma_{l,Y_{X,ATP}}$	γ_{l,r_D}	$\gamma_{l,Y_{ATP,D}}$	γ_{l,r_R}
	in %	in %	in %	in %	in %
EZA	11,72	7,05	5,93E+08	5,93E+08	1,14E+04
	11,04	6,68	—	80,60	—
CCM2	206,77	1367,84	—	967,95	—
	—	471,82	—	5370,58	—
CCM3	544,17	2812,85	—	17,17	—
	—	43,12	—	17,01	—
CCM4	1090,84	4737,24	—	367,72	—
	—	79,00	—	18,78	—

Partialdrücke die Kinetik des Organismus bei den vorliegenden experimentellen Bedingungen nicht lichtlimitiert ist. Daher wurden die Werte der spezifischen Raten r_D und r_R aus der Anpassung der RuBisCO-Kinetik (Abschnitt 5.3.2) zur weiteren Anpassung der Messdaten mit dem gekoppelten Modellansatz vorgegeben. Der Fehler der Ausbeutekoeffizienten wird dadurch bei der Parameteranpassung reduziert (s. Tabelle 5.5). Für das Experiment CCM2 wurde ein signifikant abweichender Wert für r_D geschätzt. Daher wurde dieser Wert in der Schätzung ebenfalls als Freiheitsgrad belassen. Der Wert wird dabei mit $2 \cdot 10^{-3}$ mol/g/h nahe dem der geschätzten Erhaltungsstoffwechsel in Tabelle 5.2. Die Anpassung von r_D und r_R mit dem gekoppelten Modell ist prinzipiell möglich. So wurde mit dem erweiterten Modell die Tagrespiration r_D für das Experiment CCM3 bei der Lichtintensität von $347 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ auf einen Wert von $1,55 \cdot 10^{-3}$ mol/g/h geschätzt. Dieser Wert liegt ca. 25 % unter dem der Tagrespiration, der aufgrund der reinen C-Bilanz (s. Abschnitt 5.2.2) ermittelt wurde.

Die Parametersätze # 6 bis # 9 wurden durch Anpassung der Ausbeutekoeffizienten $Y_{X,ATP}$, $Y_{ATP,PhZ}$, $Y_{ATP,PhNZ}$ sowie $Y_{ATP,D}$ aufgrund der stofflich und energetisch gekoppelten Bilanzierung ermittelt. Für die Glycolatproduktion, d.h. in einem Bereich geringen CO_2 - Partialdrucks, ist insbesondere der Energiebedarf des Erhaltungsstoffwechsels des Organismus interessant. Der Wert des Ausbeutekoeffizienten der Tagrespiration beträgt zwischen $Y_{ATP,D} = -0,04 \text{ mol}_{ATP}/\text{mol}_{\text{CH}_2\text{O}}$ und $-1,10 \text{ mol}_{ATP}/\text{mol}_{\text{CH}_2\text{O}}$. Im Calvin-Benson-Zyklus werden pro Mol

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

CH₂O-Äquivalent 2 Mol ATP und 1 Mol NADPH aufgewendet (s. Abbildung 5.2). Ein Mol NADPH ist äquivalent zu 2,5 Mol ATP [47]. So können bei der Verstoffwechslung von CH₂O 15 % des ATP aus der Carboxylierungsreaktion wiedergewonnen werden. Der ermittelte Energiebedarf des Erhaltungsstoffwechsels ($r_d \cdot Y_{ATP,D}$) der drei Experimente bei 317 bzw. 347 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ beträgt im Mittel $-1,22 \cdot 10^{-3} \text{ mol}_{\text{ATP}}/\text{g}/\text{h}$ (+/- 48 %). Der Energiebedarf des Erhaltungsstoffwechsels der Alge bei einer Lichtintensität von 147 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ beträgt $-7,15 \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{ATP}}/\text{g}/\text{h}$. Der Fehler ist jedoch bei diesem Experiment aufgrund einer geringen Datengrundlage bei geringem CO₂-Partialdruck hoch.

Die Werte für die ATP-Ausbeute des Photosystems $Y_{ATP,Ph,Z}$ und $Y_{ATP,Ph,NZ}$ und den ATP-Bedarf zur Biomassebildung $Y_{X,ATP}$ sind direkt linear voneinander abhängig. Daher kann die Fisher-Informationsmatrix nicht aufgestellt werden und der jeweilige Fehler der drei Parameter nicht einzeln bestimmt werden. Durch die lineare Abhängigkeit sind die einzelnen Werte von $Y_{ATP,Ph,Z}$, $Y_{ATP,Ph,NZ}$ und $Y_{X,ATP}$ nur bedingt belastbar. Die Zusammenfassung der drei Ausbeutekoeffizienten zu dem Parameter $Y_{X,PhProz}$ lässt Aussagen über die Biomasseausbeute pro Photon zu (s. Tabelle 5.5). Als Bezugswert für die Ausbeute der gebildeten Biomasse wird die spezifische Rate der prozessierten Photonen gewählt. Dadurch wird die Energieausbeute unabhängig von der Kinetik des Photosystems. Für die Betrachtung des Energiebedarfs zur Biomassebildung wurden die Experimente CCM3, CCM4 ($I_0 = 347 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$) und CCM2 ($I_0 = 147 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$) verwendet. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{X,PhProz}$ für die Experimente CCM3 und CCM4 beträgt $Y_{X,PhProz} = 1,39 \text{ g}/\text{mol}$ bzw. $1,68 \text{ g}/\text{mol}$ und für das Experiment CCM2 $Y_{X,PhProz} = 1,39 \text{ g}/\text{mol}$. Für den Vergleich der energetischen Ausbeutekoeffizienten zur Biomasseneubildung mit dem Energiebedarf der C-Fixierung in dem Calvin-Benson-Zyklus ist es besser molare Verhältnisse zu verwenden. Für die Umrechnung wird ein Kohlenstoffanteil im Organismus von $e_{C,X} = 0,5 \text{ g}_C/\text{g}_X$ angenommen. So erhält man die Ausbeutekoeffizienten von $Y_{C,PhProz} = 0,058$; $0,058$ und $0,070 \text{ mol}_C/\text{mol}_{\text{PhProz}}$ für die Experimente CCM2, CCM3 und CCM4. Der ATP- und NADPH-Bedarf des Calvin-Benson-Zyklus (s. oben) beträgt bei optimal angepasstem Photosystem 4 prozessierte Photonen pro Mol fixiertem Kohlenstoff. Der Ausbeutekoeffizient von Mol Kohlenstoff pro Mol Photon $Y_{C,PhProz}$ des Calvin-Benson-Zyklus beträgt somit $0,25 \text{ mol}_C/\text{mol}_{\text{PhProz}}$. Die energetische Ausbeute im Hinblick auf den fixierten Kohlenstoff in Form von CH₂O wird im Vergleich zu dem in Biomasse assimiliertem Kohlenstoff also im Mittel um 75,3 % verringert.

In Abbildung 5.12 sind die RuBisCO-limitierten sowie die energetisch limitierten Ausbeuten der Biomassebildungsraten abhängig vom CO₂-Partialdruck sowie für zwei Lichtintensitäten aufgetragen. Die Werte der RuBisCO-limitierten Wachstumsraten wurden aus dem Parameteratz # 3 aus Tabelle 5.2 für einen Sauerstoffpartialdruck von 21 % des Gesamtdrucks berech-

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

net. Für die Bildungsrate der Biomasse als Folge des energetischen Photonennflusses wurde die jeweils maximal erreichbare Wachstumsrate aufgetragen. Diese Wachstumsraten wurden mit dem Parametersatz # 6 für eine Lichtintensität von $347 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ bzw. # 8 für $147 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ aus Tabelle 5.4 berechnet.

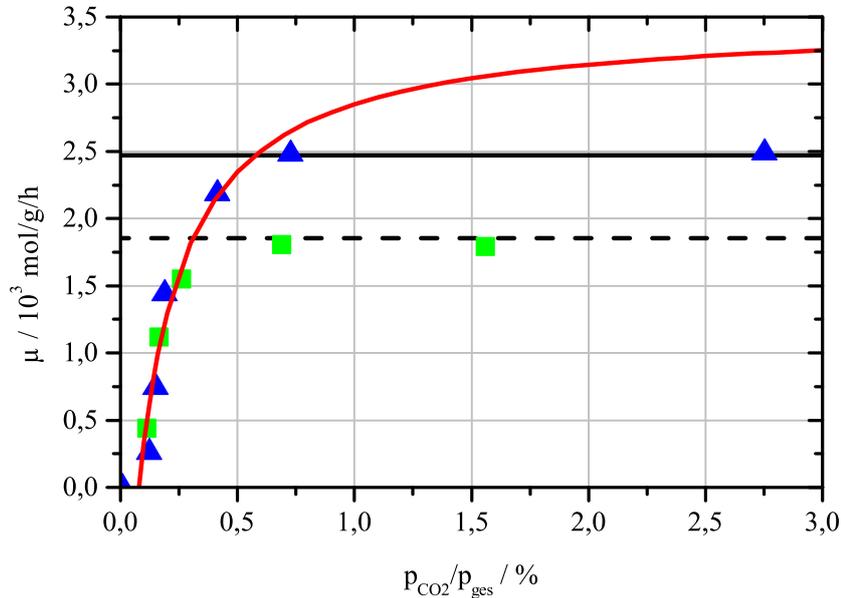


Abbildung 5.12.: Berechnete (—) und gemessene (■) Biomassebildungsraten als Funktion des CO_2 -Partialdrucks. (—) RuBisCO-limitierte Bildungsrate berechnet für $p_{\text{O}_2}/p_{\text{ges}} = 21 \%$ mit Parametersatz # 3 (s. Tabelle 5.2), (—) bzw. (- -) lichtlimitierte Bildungsrate bei (▲) 347 bzw. (■) 147 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ berechnet für $p_{\text{O}_2}/p_{\text{ges}} = 21 \%$ mit Parametersatz # 6 bzw. # 8 (s. Tabelle 5.4). Die Raten wurden bei den Experimenten CCM2 und CCM4 bei jeweils 21 bzw. 16 % O_2 des Gesamtdrucks gemessen.

Für hohe CO_2 -Partialdrücke werden die maximal möglichen Umsatzraten der RuBisCO nicht erreicht (siehe hierzu auch Abbildung 5.7b). Die Auftragung der geschätzten maximalen Wachstumsrate aus der Anpassung über die Lichtkinetik zeigt insbesondere bei dem Experiment bei 147 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$, dass die Wachstumskinetik durch die zur Verfügung stehenden Photonen begrenzt ist. Auch bei höheren Photonennflussraten von 347 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ kann die maximale Wachstumsrate durch die Lichtabhängigkeit des Wachstums besser dargestellt werden als durch die RuBisCO-Kinetik. Für einen geringen CO_2 -Partialdruck von unter ca. 0,5 % CO_2 bei einem O_2 -Partialdruck von 16 % des Gesamtdrucks ist die Wachstumsrate durch die RuBisCO-Kinetik limitiert. Der Verlauf der Wachstumsrate kann somit durch die Kopplung der Licht- bzw. RuBisCO-Kinetik ermittelt werden.

5.4. Diskussion des Modells

Das erstellte Modell soll die Bildung von Glycolat und Biomasse im Organismus *C. reinhardtii* CC1860 mathematisch beschreiben. Die Bildungsraten des Organismus werden durch verschiedene Kinetiken begrenzt. Für die Kultivierung von Mikroalgen sind dies insbesondere die Verfügbarkeit von CO₂, anorganischen Nährstoffen und Lichtenergie. Die Bildungsraten sind somit abhängig von Enzymkinetiken und der Kinetik des Photosystems. Erstgenanntes basiert wiederum auf intrazellulären Konzentrationen, zweites auf der Höhe der Photonflussrate. Über die stöchiometrische Bilanzierung werden die Stoff- und Energieflüsse im Modell verknüpft. So können unterschiedliche Limitierungen innerhalb des Organismus aufgeklärt werden. Durch die Induktion von alternativen Stoffwechselwegen kann der Organismus sich bedingt an die Umgebungsbedingungen anpassen. Neben bekannten Stöchiometrien hat das Modell daher Freiheitsgrade, die spezifisch vom Organismus und von den Wachstumsbedingungen abhängen. Diese Freiheitsgrade können durch die Anpassung von simulierten an experimentell ermittelte Datensätze bestimmt werden.

Das hier beschriebene Modell wurde mit dem Ziel der Prozessoptimierung der Glycolatproduktion erstellt. Die gut aufgeklärten Stoffwechselwege des Organismus *C. reinhardtii* (z.B. [47] oder ChlamyCyc- und KEGG-Datenbanken) wurden für die Bilanzierung des Organismus auf die für Biomasse- und Glycolatproduktion wichtigsten Metaboliten und Stoffwechselwege reduziert. Komplexe Stoffwechselwege wurden unter Berücksichtigung der stofflichen und energetischen Netto-Bilanz zusammengefasst (s. Abbildung 5.2). Die Freiheitsgrade des Modells wurden mittels Varianzanalyse auf ihre lineare Abhängigkeit überprüft (s. Abschnitt 3.5.4) und so gewählt, dass sie durch eine Parameterschätzung ermittelbar sind. Diese statistische Anpassung der Freiheitsgrade an experimentelle Daten klärt organismusspezifische und nicht direkt messbare Raten von Stoffwechselwegen oder Werte von kinetischen Parametern auf. Die gekoppelte Bilanzierung von Energie- und Stoffströmen lässt Aussagen über energetische Ausbeutekoeffizienten zu. Im Sinne einer Modellbildung wurde die Komplexität des Organismus durch die folgenden Annahmen vereinfacht:

Dem verwendeten Organismus *C. reinhardtii* CC1860 wurde eine so nachhaltige Schädigung der CCMs unterstellt, dass eine aktive Aufnahme von CO₂ aus dem Medium nicht möglich ist. Der intrazelluläre Partialdruck der Gase wurde dem im Medium gleichgesetzt. Letzterer wurde aus den Abgasanteilen der Reaktorbegasung bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass ein quasistationäres Gleichgewicht zwischen Gas- und Flüssigphase vorliegt. Die Notwendigkeit der Berücksichtigung eines intrazellulären Diffusionskoeffizienten bei der Beschreibung der Carboxylierungs- und Oxygenierungskinetik wird für höhere mehrzellige Pflanzen

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

in der Literatur diskutiert (z.B. [158]). Aufgrund der kurzen Diffusionswege in der einzelnen Mikroalge wurde hier eine Limitierung durch den Stofftransport in dem Organismus ausgeschlossen. Insbesondere bei dem relativ langsamen Stoffwechsel im Vergleich zu heterotrophen Organismen (z.B. Hefen [171]) erscheint dies zulässig [94]. Eine Verschiebung des $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ -Gleichgewichts durch kompartimentabhängige Unterschiede des pH-Werts, wie z.B. von Keymer [172] und Raven [52] untersucht, wurde vernachlässigt. Auf Reaktorebene konnte durch die getrennte Regelung von pH-Wert und Gaszufuhr der CO_2 -Partialdruck exakt eingestellt werden.

Ausgehend von den CO_2 - und O_2 -Partialdrücken kann das von Farquar et al. publizierte Modell der RuBisCO-Kinetik zur Beschreibung der Oxygenierungs- und Carboxylierungsrate des Enzyms angewendet werden [161]. Dieser Modellansatz für die RuBisCO-Kinetik wurde wegen seiner mechanistischen Herleitung gewählt. Dies ist ein Vorteil, daher findet der Ansatz eine breite Verwendung. Andere Vorgehensweisen, z.B. durch einen generalisierten Michaelis-Menten Ansatz [173], weisen diese Stärke nicht auf. Auch Collatz et al. kritisieren den Ansatz einer generalisierten Michaelis-Menten-Kinetik, da hierbei die tatsächlichen Reaktionsschritte der RuBisCO nicht berücksichtigt werden [174]. Der Ansatz von Farquhar ermöglicht die Beschreibung der RuBisCO-Kinetik mit vier Parametern. Diese können nochmals zu einem Parameter, der Selektivität S , zusammengefasst werden (s. Gleichung 2.6). All diese Parameter müssen spezifisch für den Organismus bestimmt werden [161]. Für die aus dem Organismus aufgereinigte RuBisCO kann die Carboxylierungs- und Oxygenierungsrate direkt über die Bildungsrate der Reaktionsprodukte gemessen werden (z.B. in [41, 168]). Für die hier untersuchte intrazelluläre RuBisCO-Kinetik erfolgt dies indirekt über die Wachstums- und Glycolatexkretionsraten. Die Bestimmbarkeit der einzelnen kinetischen RuBisCO-Parameter bei verschiedenen O_2 und CO_2 -Partialdrücken wurde in Abschnitt 5.3.1 mittels Sensitivitätsanalyse untersucht. Schon die Zusammenfassung von vier kinetischen Parametern zu einem (der Selektivität S , Gleichung 2.6), mit dem die RuBisCO-Kinetik beschreibbar ist, zeigt die lineare Abhängigkeit der Konstanten. Insbesondere die unabhängige Schätzung von k_C und k_O ist auf Grundlage der gewonnenen Ergebnisse nur bedingt möglich (s. Abschnitt 5.3.1). Eine Anpassung der experimentell ermittelten Biomassebildungsraten mit Hilfe einer modifizierten RuBisCO-Kinetik auf Grundlage des mechanistischen Modells von Farquhar [22] bestätigt dies (s. Tabelle 5.1). Die über Größenordnungen variierenden Werte der einzelnen Parameter weisen stets die gleiche Selektivität S auf. Die Schätzung aller vier RuBisCO-Parameter aufgrund der ermittelten experimentellen Daten ist möglich (s. Parametersatz # 4, Tabelle 5.2). Der Schätzfehler für die weiteren Modell-Parameter wird bei Anpassung aller RuBisCO-Parameter jedoch höher. Dies zeigt der durch Varianzanalyse ermittelte Fehler für die weiteren

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

Parameter z.B. der Tagrespiration r_D und des Potentials des Glycolatrecyclings r_R (Tabelle 5.3). Da diese Größen für die Prozessauslegung besonders interessant sind, wurden auch publizierte kinetische Daten der aufgereinigten RuBisCO zur Berechnung herangezogen. Diese kinetischen Parameter der RuBisCO wurden für das aufgereinigte Enzym durch unterschiedliche Methoden und von verschiedenen Autoren für *C. reinhardtii* und weitere Organismen bestimmt [41, 167, 168]. Die Werte für die charakteristische Selektivität der aufgereinigten RuBisCO liegen in einem Bereich von $S = 61$ mol/mol bis $S = 72$ mol/mol. Vergleichende Untersuchungen hinsichtlich der Kinetik von aufgereinigter und intrazellulär vorliegender RuBisCO sind selten, wurden jedoch von Caemmerer et al. [175] und Harley et al. [59] vorgenommen. In diesen Untersuchungen konnte eine gute Übereinstimmung der kinetischen Konstanten von aufgereinigter RuBisCO und von im Organismus vorliegender RuBisCO festgestellt werden. Diese Erkenntnisse werden durch Anpassung der experimentellen Ergebnisse bei Verwendung der Literaturdaten k_C , k_O und dem Verhältnis von $r_{C,max}/r_{O,max}$ in Abschnitt 5.3.2 in dieser Arbeit bestätigt.

Die Varianzanalyse mit den jeweiligen experimentellen Datensätzen zeigt, dass die maximale Carboxylierungsrate $r_{C,max}$ des Organismus mit geringem Fehler geschätzt werden kann (s. Tabelle 5.3). Dieser Parameter wurde über die Prozesszeit als konstant angenommen und ist damit unabhängig von dem CO_2 -Partialdruck. Diese Annahme impliziert einen konstanten aktiven Anteil von RuBisCO im Organismus. Die Herleitung der Enzymkinetik zeigt die Abhängigkeit der Carboxylierungsrate von der Enzymkonzentration [22]. Hudson bestätigt diesen Zusammenhang in einer höheren Pflanze experimentell [176]. Die Anpassung des aktiven RuBisCO-Anteils in verschiedenen Wachstumsstadien wird in der Literatur diskutiert (z.B.[32, 33, 177]). Eine Abweichung der Wachstumsrate von der CO_2 -abhängigen Carboxylierungsrate der RuBisCO ist bisher nur für hohe CO_2 -Partialdrücke nachgewiesen worden. Diese Abweichung wird durch weitere limitierende Kinetiken begründet [59, 175]. Eine Verringerung des RuBisCO-Anteils geht aus diesen Untersuchungen nicht hervor. Eine beschriebene Reduktion des RuBisCO-Anteils durch eine Stickstofflimitierung wurde durch die experimentellen Bedingungen ausgeschlossen [178]. Eine Verringerung des Enzymanteils der RuBisCO könnte sich auf den Stickstoffausbeutekoeffizienten des Organismus auswirken. Dieser ist jedoch unter CO_2 -limitierten und nichtlimitierten Bedingungen identisch (s. Tabelle 4.1). Die Anpassung der experimentellen Daten an das Modell mit konstantem $r_{C,max}$ zeigt, dass die Konzentrationsänderungen von Glycolat und Biomasse im Reaktor bei den jeweilig eingestellten Partialdruckverhältnissen in den zu erwarteten quasistationären Zustand übergehen (s. Abbildung 5.5). Durch diese gute Anpassbarkeit der experimentellen Daten an die angenommene RuBisCO-Kinetik wird die Annahme eines konstanten aktiven RuBisCO-Anteils

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

in dem betrachteten Rahmen validiert. Eine Bestimmung des RuBisCO-Anteils in der Zelle könnte das Modell sinnvoll erweitern. Dazu ist es jedoch notwendig den aktiven Anteil der RuBisCO zu ermitteln. Der komplizierte Aktivierungsmechanismus erschwert diese Bestimmung.

Die Übertragung der RuBisCO-Kinetik in den Kontext der Photosynthese wurde insbesondere von von Caemmerer, Farquhar und Berry auf mechanistischer Ebene vorgenommen [22, 179, 40]. Sie erweitern das Modell der RuBisCO-Kinetik auf den Gesamtorganismus durch die Berücksichtigung der Tagrespiration des Organismus und der Kinetik des Photosystems. In dieser Arbeit wurde der mechanistische Modell-Ansatz des RuBisCO-limitierten und lichtlimitierten Wachstums von Farquhar, von Caemmerer und Berry aufgegriffen und im systembiologischen Sinne umgesetzt. Durch den systembiologischen Ansatz wurden die einzelnen Stoff- und Energieströme exakt und stöchiometrisch gekoppelt bilanziert. Der Verlust von Lichtenergie durch Umwandlung in Wärme oder einer Übertragung von PSI zu PSII (Photosystem-Shift) wurde in den Berechnungen nicht berücksichtigt. Durch die genaue Einstellung des Absorptionskoeffizienten in dem zylindrischen Rührkessel wurde ein sehr homogenes Lichtfeld im Reaktor erzeugt. So konnten wachstumssteigernde Effekte durch einen Hell-Dunkel-Zyklus vernachlässigt werden [135, 95]. Die Energiebilanzierung innerhalb des Organismus gelingt durch die Aufteilung der eingestrahnten Photonen in einen vom Photosystem prozessierten und einen in Form von Fluoreszenz abgestrahlten Anteil. Hierzu wurde die Fluoreszenz sowohl in Abhängigkeit vom CO_2 -Partialdruck als auch in Abhängigkeit von der Lichtintensität erfasst. So konnte der nichtlineare Zusammenhang von Fluoreszenz und Kohlenstoffassimilation bei Mikroalgen berücksichtigt werden [73, 170]. Die Adaption des Photosystems an die stöchiometrische Bereitstellung von Energie- und Reduktionsäquivalenten, wie sie etwa von Forti et al., Finazziet al. und Cardol et al. [66, 67, 68] gezeigt werden, wurde durch die Implementierung von zyklischem und nichtzyklischem Elektronentransport einbezogen. So können die prozessierten Photonen das Verhältnis zwischen NADPH und ATP entsprechend der Stöchiometrie decken. Die Ausbeutekoeffizienten von Photonen zu NADPH oder ATP wurden als zeitlich konstant betrachtet und sind damit während des Experiments auch unabhängig von dem Partialdruckverhältnis von CO_2/O_2 . Dies stellt eine Vereinfachung gegenüber der Vielzahl der möglichen Stoffwechselwege und der zeitlichen Dynamik der Anpassung des Photosystems dar (s. Tabelle 2.2 sowie [170]). Der Wert des Verhältnisses von zyklischem zu nichtzyklischem Elektronentransport kann daher nur relativ über den Prozessverlauf betrachtet werden. Die Parameter $Y_{ATP,PhZ}$, $Y_{ATP,PhNZ}$ und $Y_{ATP,X}$ sind linear abhängig und daher nicht unabhängig voneinander aussagekräftig. Die Zusammenfassung der energetischen Ausbeutekoeffizienten zu $Y_{X,PhProz}$ lässt hingegen Aussagen über die energetische Ausbeute

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

te der Biomassebildung zu. Durch den Bezug auf die prozessierten Photonen ist der Faktor unabhängig von der Kinetik des Photosystems und erlaubt eine Aussage über den Energiebedarf der Dunkelreaktionen im Organismus. Der Bezug auf die prozessierten Photonen ist sinnvoll, da Energieverluste durch eine erhöhte Fluoreszenz bei hohen Photonenflussraten durch eine geeignete Auslegung des Reaktors verhindert werden können. Im Falle hoher CO_2 -Partialdrücke gelingt die Differenzierung zwischen Photosystem-limitiertem Wachstum und RuBisCO-limitiertem Wachstum (s. Abbildung 5.12). Die erfolgreiche Simulation der verringerten Wachstumsrate aufgrund einer Lichtlimitierung bei einer Photonenflussrate von $147 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ zeigt dies. Bei einem auf der alleinigen RuBisCO-Kinetik basierenden Modell wäre die Verringerung nur durch die Halbierung des kinetischen Parameters $r_{C,max}$ der RuBisCO erklärbar (s. Tabelle 5.2). Durch die Bilanzierung von fixiertem Kohlenstoff und absorbierten Photonen konnte der Energiebedarf innerhalb des Organismus in einen wachstumsabhängigen Anteil sowie einen vom Biomassezuwachs unabhängigen Anteil des Erhaltungsstoffwechsels aufgeteilt werden (s. Abbildungen 5.6 und 5.11). Der mit den experimentellen Daten angepasste Ausbeutekoeffizient der Biomasseneubildung $Y_{X,PhProz}$ beträgt $1,48 \text{ g}_X/\text{mol}_{Ph, Proz}$ ($\pm 9,3 \%$) (s. Tabelle 5.2). Der Mittelwert und die Standardabweichung wurde aus den drei Experimenten ohne den Zusatz von EZA/DMSO ermittelt. Mit dem experimentspezifischen Wert von $Y_{X,PhProz}$ kann die von der RuBisCO-Kinetik abweichende geringere Wachstumsrate bei hohen CO_2 -Partialdrücken sehr gut simuliert werden (s. Abbildung 5.12). Kliphuis et al. ermittelten mit $Y_{X,PhProz} = 1,57 \text{ g}_X/\text{mol}_{Ph, Proz}$ einen ähnlichen Ausbeutekoeffizienten [50]. In ihren Berechnungen berücksichtigt Kliphuis einen pauschalen Anteil der Fluoreszenz von 0,8. Eine Betrachtung der Messwerte in Abbildung 4.12a sowie ein Vergleich mit der Literatur zeigen, dass dies der maximale Wert von YII ist. Dies lässt vermuten, dass der tatsächliche Wert für YII etwas geringer ist. Der Vergleich der Energieausbeute für die Neubildung von Biomasse mit dem Energiebedarf der Kohlenstofffixierung in Form von CH_2O -Äquivalenten im Calvin-Benson-Zyklus ergibt eine Reduktion des Wirkungsgrads um 75 % durch die Biomasseneubildung des Organismus. Dieser Wert ist ähnlich dem von Tredici [6] angegebenen Verlust von 67 % und wird somit durch die Messergebnisse dieser Arbeit gestützt.

Wesentliches Ziel dieser Arbeit ist die Modellierung der Photorespiration. Bisherige Modelle der Photosynthese fokussieren sich auf höhere Pflanzen. Da in diesen das gebildete P-Glycolat vollständig recycelt wird, beschränkt sich bei höheren Pflanzen die Betrachtung auf den Kohlenstoff- und Energieverlust durch das Recycling. Die Exkretion von Glycolat durch Mikroalgen wird von verschiedenen Autoren untersucht (z.B. [51, 154]). Sie widmen sich der Aufklärung des Glycolatstoffwechsels oder der indirekten Erforschung der CCMs. Eine mechanistische Betrachtung der Photorespiration, wie für die Photosynthese durchgeführt,

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

wird von den Autoren nicht vorgenommen. Die Photorespiration wird in dem hier vorgestellten Modell durch die Exkretion und das Recycling von Glycolat in den Masse- und Energiebilanzen berücksichtigt. P-Glycolat wird insbesondere bei verhältnismäßig geringen CO_2 -Partialdrücken gebildet. Da die Carboxylierungsrate bei geringem CO_2 -Partialdruck abnimmt, erhöht sich die spezifische Rate der Tagatmung anteilmäßig. Durch die systembiologische Bilanzierung der Stoffströme ist eine genaue Aussage über den durch Respiration verstoffwechselten Anteil von Kohlenstoff und dem für die Glycolatproduktion verwendeten Kohlenstoff möglich. Dies ist ein Vorteil gegenüber bisherigen mechanistischen Modellen von höheren Pflanzen. In diesen wird der Verlust von organisch gebundenem Kohlenstoff in der Photorespiration durch einen der Carboxylierungsrate äquivalenten CO_2 -Partialdruck Γ^* berücksichtigt. Hierzu ist jedoch die Kenntnis des exkretierten Glycolatanteils notwendig [40]. Die Anpassung des in dieser Arbeit vorgestellten Modells an die experimentell ermittelten Messdaten zeigt, dass trotz der Vereinfachung der Stoffwechselwege und ohne die genaue Kenntnis von Regulationsmechanismen die Biomasse- und Glycolatproduktion erfolgreich simuliert werden können. Die statistische Auswertung experimenteller Daten durch eine Parameterschätzung klärt die nicht direkt bestimmbareren Stoffwechselwege der Tagrespiration r_D und des Glycolatrecyclings r_R auf (s. Tabelle 5.2 bzw. Abbildung 5.6). Die Auftragung der spezifischen Wachstumsrate als Funktion des CO_2 -Partialdrucks zeigt den deutlichen Übergang von den Photosystem-limitierten Bildungsraten zu den RuBisCO-limitierten Bildungsraten (s. Abbildung 5.12). Die Abhängigkeit der Carboxylierungsrate und Oxygenierungsrate der RuBisCO vom CO_2 - und O_2 -Partialdruck kann in Abbildung 5.7a sehr gut nachvollzogen werden. Sehr gut ersichtlich ist auch die Reduktion des Wachstums zu $\mu = 0$ 1/d bei einem deutlich von Null verschiedenen CO_2 -Partialdruck. Die Kohlenstoffbilanz um die RuBisCO und den Gesamtorganismus ermöglicht die Unterscheidung zwischen verringerter Biomassebildung aufgrund des Verlustes von organisch gebundenem Kohlenstoff beim Recycling von Glycolat (Photorespiration) und der Verstoffwechslung von CH_2O -Äquivalenten in der Tagrespiration. Es konnte ein Anteil der Tagrespiration, bezogen auf die maximale Carboxylierungsrate, von ca. $r_D/r_{C,max} = 30$ % für den Organismus bestimmt werden. Die Kohlenstoffausbeute in Form von Biomasse aus Kohlenhydraten ist damit in Mikroalgen deutlich höher als in heterotrophen Organismen. In letzteren liegt die Kohlenstoffausbeute aus Kohlenhydraten in Form von Biomasse bei ca. 50 %. Die höhere Ausbeute von Mikroalgen ist durch die Nutzung von ATP und NADPH aus der Photosynthese z.B. für den Aufbau von Stärke als Speicherstoff oder der Bildung von DNA erklärbar. Durch die Tagrespiration von CH_2O -Äquivalenten wird Biomasse erst ab einem deutlich von Null bzw. Γ^* abweichendem CO_2 -Partialdruck gebildet (s. Abbildung 2.4). Aus dieser Abweichung des CO_2 -Partialdrucks lässt sich der Erhaltungsstoff-

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

wechsel des Organismus bestimmen (s. Abbildung 5.6). Durch die Bilanzierung der Photonen kann der ATP-Bedarf des Erhaltungsstoffwechsels ($Y_{ATP,D} \cdot r_D$) ermittelt werden (s. Tabelle 5.4). Der mittlere ATP-Bedarf des Erhaltungsstoffwechsels von 1,22 mmol_{ATP}/g_X/h liegt im gleichen Bereich wie der von Kliphuis et al. bestimmte Wert von 2,85 mmol_{ATP}/g_X/h [50]. Durch die Anpassung der Messdaten mit dem Freiheitsgrad des Glycolatrecyclings r_R kann bewiesen werden, dass der Organismus in der Lage ist bis zu 70 % des gebildeten Glycolats zu recyceln (s. Tabelle 5.2). Für eine technische Umsetzung muss der Recycling-Stoffwechsel von Glycolat reduziert werden. EZA hat einen inhibierenden Effekt auf das Glycolatrecycling (s. Abbildung 5.8). Die Modellierung der *in situ*-RuBisCO-Kinetik zeigt, dass die von der Oxygenierungsreaktion maximal zu erwartende Glycolatproduktion des Organismus in den EZA-Experimenten annähernd erreicht wird (s. Abbildung 5.8b). Der mittels Varianzanalyse berechnete relative Schätzfehler beträgt 17 % (Tabelle 5.3). Daher ist unsicher, in wie weit der Stoffwechselweg des Glycolatrecyclings vollständig inhibiert wurde oder eine weitere Erhöhung von ca. 30 % möglich ist (siehe Abbildung 5.8b). Die optimale Glycolatproduktion bei einem Verhältnis von Carboxylierungs- zu Oxygenierungsreaktion $\Phi = r_C/r_O = 2$ wird bei geringen CO₂-Partialdrücken erreicht. Abhängig vom O₂-Partialdruck wird auch die Carboxylierungsrate der RuBisCO verringert. Für einen O₂-Partialdruck von 45 % ist nach Gleichung 2.5 und unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels ein CO₂-Partialdruck von ca. 0,2 % des Gesamtdrucks optimal für die Produktion von Glycolat. Bei diesem geringen CO₂-Partialdruck beträgt die Carboxylierungsrate der RuBisCO nur 51,4 % ihres maximal erreichbaren Werts. Der relative Anteil der Tagrespiration, bezogen auf die Carboxylierungsrate der RuBisCO, nimmt dabei auf ca. 53,3 % zu. Durch den erhöhten Anteil der Tagatmung kann die theoretisch mögliche Wirkungsgradsteigerung, die sich potentiell bei der Bildung von Glycolat aus den verringerten Verlusten bei der Biomasseneubildung ergäbe, nicht erreicht werden. Ein weiterer Einflussfaktor ist die geringere Verbrennungsenthalpie von Glycolat (7,6 kJ/kg) im Vergleich zu Biomasse (20 kJ/kg) [180, 27]. Rechnungen für einen O₂-Partialdruck von 42 % des Gesamtdrucks, bei denen berücksichtigt wird, dass der gleiche Anteil an Photonen in Biomasse bzw. Glycolat prozessiert wird, ergeben eine Wirkungsgradsteigerung von 19 % bedingt durch den Energieverlust der Tagatmung, durch die verringerte Verbrennungsenthalpie und die verringerte Glycolatbildungsrate im Vergleich zur maximalen Wachstumsrate. Durch eine Erhöhung des O₂-Partialdrucks (z.B. auf 60 % bzw. 80 % des Gesamtdrucks) und bei Einhaltung des Partialdruck-Verhältnisses für eine optimale Glycolatbildung ($\Phi = 2$) könnte die Glycolatproduktion um 7 bzw. 12 % als Folge der erhöhten Carboxylierungsrate gesteigert werden. Der Vergleich der schon beschriebenen verringerten Wachstumsrate von CC1860 mit der der Wildtypalge WT 11-32b zeigt aufgrund der Unterschiede in der maximal erreichbaren

5. Modellbildung der Glycolatproduktion

spezifischen Wachstumsrate ein weiteres Potential für die Glycolatproduktion von 50 %. Die im Vergleich zum Wildtyp geringe maximale spezifische Wachstumsrate der CC1860 Mutante konnte nicht durch das Modell erklärt werden. Zwar kann die verringerte Wachstumsrate mit einem lichtlimitierten Ansatz angepasst werden, die Aufteilung in prozessierte und fluoreszierte Photonen zeigt jedoch eine Absättigung des Photosystems der CCM-Mutante bei geringeren Photonenflussraten. Der Organismus CC1860 weist somit noch ein energetisches Potential für weiteres Wachstum auf (s. Abbildung 4.12a). Ob die RuBisCO-Kinetik durch einen verringerten Anteil an RuBisCO oder durch ein geschädigtes Photosystem beeinflusst wird, ist unklar. Die erhöhte Wachstumsrate bei Zusatz von EZA könnte auf eine höhere RuBisCO-Aktivität hindeuten. Eine Klärung kann jedoch nur über die gleichzeitige Messung des aktiven RuBisCO-Anteils erfolgen.

Die experimentellen Daten, gestützt durch das erstellte Modell, zeigen, dass durch die Einstellung der Prozessbedingungen die Biomasseneubildung weitgehend unterdrückt werden kann und validiert somit das Konzept der Produktion im Biofilm-Reaktor (s. Kapitel 6). Weiterhin können energetische Limitierungen bedingt durch das Photosystem das Wachstum der Algen reduzieren. Weitere zu beachtende Limitierungen sind z.B. die Transportwege in der Zelle (Phosphatshuttles) [181].

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

Für die effiziente Produktion von Glycolat entstand im Rahmen dieser Arbeit ein Reaktor zur Kultivierung von immobilisierten Mikroalgen. Dieser soll eine kontinuierliche Produktion von Glycolat mit einem geringen Bedarf an Betriebsenergie für den Reaktor ermöglichen. In diesem Abschnitt werden zuerst die Stoffströme berechnet, um den Nährstoff- und Kohlenstoffbedarf der Mikroalgen in dem Reaktor abzuschätzen. Das Reaktorkonzept wird in energetischer Hinsicht mit Reaktoren, die dem Stand der Technik entsprechen, verglichen. Es wurden geeignete Materialien für die Realisierung einer Membranbegasung und der Immobilisierung der Mikroalgen ausgewählt. Die Peripherie des Reaktors wurde aufgrund vorangegangener Berechnungen ausgelegt. Der flächenspezifische Chlorophyllgehalt der Kultivierung von Mikroalgen ermöglicht die Abschätzung der Lichtabsorption des Biofilms. Die Ergebnisse der Glycolatproduktion in der Suspensionskultur wurden auf den Biofilm-Reaktor übertragen. Für die homogene Verteilung des Lichts über die Tiefe des Biofilms wurde das Konzept der Lichtverteilung mittels lichtleitender Einbauten weiterverfolgt und in Suspensionskultivierungen validiert.

6.1. Stoffliche Auslegung des Reaktorbetriebs

Für die Auslegung des Reaktors und der Peripherie wurden die eingetragenen Stoffströme abgeschätzt. Es wurde von einer PCE des Biofilms von 5 % ausgegangen. Für das Jahresmittel der solaren Einstrahlung wurde eine Lichtintensität von 153 W/m^2 angenommen [8]. Dies entspricht bei einem Energiegehalt der Photonen von $0,211 \text{ J}/\mu\text{E}$ einer Lichtintensität von $725 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ [102]. Für die Betrachtung von Versorgungsspitzen wurde eine maximale Intensität von $2500 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ bzw. $526,3 \text{ W/m}^2$ angenommen. Bei der Berechnung der Stoffströme wurde zwischen folgenden zwei Betriebsphasen des Prozesses unterschieden:

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

1. Wachstum der Algen für die Gewinnung von Biomasse: Für die Zusammensetzung der Algen wurden die in Tabelle 4.1 angegebenen Werte angenommen. Zudem wurde von einem Kohlenstoffanteil von 50 % (w/w) der Gesamtmasse ausgegangen [143, 50]. Der Energiegehalt der Biomasse beträgt 20 kJ/g [182].
2. Produktion von Glycolat ohne weitere Zunahme der Biomasse: Eine Nährstoffzufuhr ist in diesem Prozessschritt nicht notwendig. Das Glycolat muss abgeführt werden, um eine toxische Konzentration nicht zu überschreiten. In Experimenten hatte eine maximale Konzentration von ca. 1 g/l keinen schädigenden Einfluss auf die Mikroalgen. Dieser Wert wurde daher für die Berechnung der Flussrate des Mediums zugrunde gelegt. Der Einfluss höherer Konzentrationen wurde nicht untersucht. Bei den Berechnungen wurde von einem Energiegehalt des Glycolats von 7,6 kJ/mol ausgegangen [180].

Tabelle 6.1 führt die die Bildungsraten von Biomasse und Glycolat für die beiden Szenarien des Reaktorbetriebs und zwei Einstrahlleistungen auf. Aus den Biomassebildungsraten wurde der Verbrauch der Nährstoffe berechnet und damit die minimale Flussrate von 1-fachem TP-Medium zur Deckung des Nährstoffverbrauchs ermittelt. Der zudem aufgeführte Kohlenstoffbedarf ist wichtig für die Auslegung der Begasung in Abschnitt 6.3. Für den Betriebszustand der Glycolatbildung wurde der zum Abtransport von Glycolatlösung benötigte Medienstrom berechnet.

6.2. Vergleich der Betriebsleistung von Photobioreaktoren

Ein zentrales Kriterium bei der Konstruktion des Reaktors war ein minimaler Energieeintrag für dessen Betrieb. Ein horizontales Reaktorkonzept sowie eine Begasung über Membranen reduzieren die aufzuwendende Betriebsenergie für Begasung und Durchmischung. Im Folgenden wird das Konzept des Biofilm-Reaktors mit weiteren Reaktoren, die dem Stand der Technik entsprechen, hinsichtlich der aufzuwendenden Betriebsenergie für Begasung und Durchmischung verglichen.

1. Rohrreaktor: Es wurde ein vertikaler Rohrreaktor mit 10 übereinanderliegenden Röhren pro Reaktor angenommen [107]. Die Röhren haben einen Durchmesser von $d_R = 0,05$ m. Der horizontale Abstand der Reaktoren entspricht mit 0,5 m der optimalen Auslegung

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

Tabelle 6.1.: Bildungs- und Aufnahmeleistungen von Biomasse und Glycolat für die zwei Betriebszustände des Biofilmreaktors sowie zwei verschiedene Sonneneinstrahlleistungen, die Aufnahmeleistungen von Stickstoff, Schwefel, Phosphor und Kohlenstoff für die Bildung von Biomasse und Glycolat.

Flächenbezogene Rate	Einheit	Bildungs- und Aufnahmeleistungen bei	
		153,0 W/m ²	526,3 W/m ²
Biomassezuwachs	g/m ² /s	$3,83 \cdot 10^{-4}$	$1,32 \cdot 10^{-3}$
Stickstoff	g/m ² /s	$1,48 \cdot 10^{-6}$	$5,08 \cdot 10^{-6}$
Schwefel	g/m ² /s	$7,40 \cdot 10^{-8}$	$2,55 \cdot 10^{-7}$
Phosphor	g/m ² /s	$1,94 \cdot 10^{-7}$	$6,68 \cdot 10^{-7}$
Kohlenstoff	mol/m ² /s	$4,19 \cdot 10^{-5}$	$1,44 \cdot 10^{-4}$
Flussrate Medium	ml/m ² /s	$6,14 \cdot 10^{-3}$	$2,11 \cdot 10^{-2}$
Glycolatbildung	g/m ² /s	$1,01 \cdot 10^{-3}$	$3,46 \cdot 10^{-3}$
Kohlenstoff	mol/m ² /s	$2,65 \cdot 10^{-5}$	$9,11 \cdot 10^{-5}$
Flussrate Medium	ml/m ² /s	1,01	3,46

von [183]. Für die Berechnung von Volumen etc. wird somit von 20 Röhren pro Meter ausgegangen. Eine Pumpe befördert das Medium mit einer Geschwindigkeit von $v_1 = 0,6$ m/s durch die Röhren des Reaktors. Für den Gasaustausch ist ein 2 m hoher Riser vorgesehen, der mit $\dot{V}_g = 0,17$ vvm Gasmisch durchströmt wird. Mit Ausnahme des Abstands der Röhren wurden für die Dimensionierung des Reaktors Werte von Bosma übernommen [107].

2. Flat-Plate-Reaktor: Der Reaktor hat eine Füllhöhe von 1,24 m und eine Dicke von 0,07 m [106]. Die einzelnen Reaktoren haben einen Abstand von 0,2 m, also liegen 4 Reaktoren pro Meter [183] vor. Der Reaktor wird durch aufsteigende Blasen gemischt und begast. Für eine optimale Durchmischung und einen optimalen Gastransfer wurde eine Durchmischung von 0,25 vvm angenommen [106].
3. Open-Pond: Der gesamte Reaktor hat eine Länge von 9 m, eine Breite von 3 m und eine Füllhöhe von 0,2 m. Die berechneten Werte wurden auf eine Reaktorfläche von 1 m² bezogen. Der Reaktor wird mit einer Flussrate von 0,25 m/s durchmischt. Eine Begasung erfolgt nur über die Oberfläche [107]
4. Biofilm-Reaktor: Eine Konstruktion des Biofilm-Reaktors ist in Abschnitt 6.6 beschrieben. Das mit Medium überströmte Kultivierungskompartment hat eine Höhe von 10 mm.

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

Das Begasungskompartiment hat eine Höhe von 1 mm. Die Gas- und Medium- Volumenströme entsprechen den Werten der Tabelle 6.1. Die berechneten Werte wurden auf eine Reaktorfläche von 1 m² bezogen.

Die Kenngrößen sind den entsprechenden Veröffentlichungen entnommen und in der Tabelle 6.2 flächenspezifisch zusammengefasst. Für den Rohrreaktor und den Flat-Plate-Reaktor wurde hierbei von einem Abstand der Reaktoren von 0,5 bzw. 0,2 m ausgegangen. Dieser optimale Abstand der Reaktoren wurde für Rohrreaktoren von Slegers berechnet [183]. Er ist abhängig von der Geometrie sowie dem Sonnenstand und somit auch dem Breiten- und Längengrad. Der Abstand von 0,2 m bzw. 0,5 m ist optimal für Südeuropa. Für die Vergleichbarkeit wurde für alle Reaktoren der flächenspezifische Energiebedarf $L_{ges, A}$ für Begasung und Durchmischung gemäß Abschnitt 3.5.5 berechnet. Hierfür wurden der Druckabfall der Flüssigkeit über die Reaktorlänge und der zu überwindende hydrostatische Gegendruck für die Begasung des Reaktors berechnet. Für die Durchströmung des Begasungssegments des Biofilm-Reaktors wurde die Kompression der Luft vernachlässigt. Dies ist bei einer Gasgeschwindigkeit von $v_g < 0,3$ Mach zulässig [184]. Für die Validierung des berechneten Leistungseintrags mit gemessenen Daten aus der Literatur wurde der volumetrische Leistungseintrag $L_{ges, v}$ ebenfalls berechnet (s. Tabelle 6.2).

Die Strömung in Rohrreaktor und Open-Pond liegt bei der betrachteten Fließgeschwindigkeit im turbulenten Bereich. Durch die lange Rohrstrecke ist über den Rohrreaktor ein Druckabfall von 0,25 bar pro Meter Anlagenstrecke zu verzeichnen. Im Open-Pond ist durch den hohen Querschnitt der Druckverlust trotz turbulenter Strömung und höherer Flussraten wesentlich geringer. Der betrachtete Biofilm-Reaktor weist mit einer Reynolds-Zahl $Re < 1,13 \cdot 10^{-2}$ als einziger Reaktor ein laminares Strömungsprofil auf. Durch die zusätzlichen geringen Volumenströme wird eine weitere Reduktion des Leistungseintrags erzielt.

6.3. Auswahl einer Membran für die Be- und Entgasung des Kultivierungssegments

Die Bestimmung von Stofftransportkoeffizienten durch Membranen in einem Messstand ist in Abschnitt 3.5.2 beschrieben. Der Stofftransportkoeffizient wurde hier gesondert für die Gase O₂ und CO₂ bestimmt. Die Membranen wurden aufgrund einer Literaturrecherche bezüglich ihrer Eignung für biologische Prozesse ausgewählt. Das Material und die entsprechenden Herstellerangaben zu den Membranen sind in Tabelle 6.3 aufgeführt. Die gemessenen

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

Tabelle 6.2.: Geometrie, Betriebsgrößen und berechneter Druckabfall bzw. Leistungseintrag für vier Reaktortypen. Der Leistungseintrag für die Flüssigphase (L_l) und die Gasphase (L_g) wurde gemäß Abschnitt 3.5.5 durchgeführt und ist flächenspezifisch ($L_{ges, A}$) bzw. volumenspezifisch ($L_{ges, V}$) angegeben. Die Angabe bzw. Berechnung der Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit (v_l), der Volumenflussrate der Flüssigkeit (\dot{V}_l), der Reynoldszahl (Re), des Rohrreibungsbeiwerts (λ), des Druckgradienten aufgrund der Rohrreibung (Δp_{Rr}), des Druckgradienten aufgrund der Hydrostatik (Δp_{Hs}), des insgesamt resultierender Druckgradienten ($\Delta p_{ges, l}$) und des Volumenstroms der Gasphase (\dot{V}_g) ist in den genannten Quellen bzw. in Abschnitt 3.5.5 gegeben.

	Einheit	Flat-Plate	Rohr-reaktor	Open-Pond	Biofilm-Reaktor
Geometrie					
Länge	m	1	1	1	1
Breite	m	0,07	—	1	1
Durchmesser	m	—	0,05	—	—
Höhe, Reaktor	m	1,24	—	0,19	0,01
Höhe, Riser	m	—	2	—	—
Reaktoren pro m	1/m	4	20	1	1
Pumprate					
v_l	m/s	—	0,6	0,25	0,0005
\dot{V}_l	m ³ /s/m ²	—	$9,98 \cdot 10^{-4}$	$5,01 \cdot 10^{-2}$	$5,01 \cdot 10^{-6}$
Re	—	—	$7,73 \cdot 10^3$	$1,09 \cdot 10^4$	$1,13 \cdot 10^{-2}$
λ	—	—	$3,38 \cdot 10^{-2}$	$3,10 \cdot 10^{-2}$	$5,73 \cdot 10^3$
Δp_{Rr}	bar	—	0,05	$4,99 \cdot 10^{-5}$	$7,27 \cdot 10^{-5}$
Δp_{Hs}	bar	—	0,20	—	—
$\Delta p_{ges, l}$	bar	—	0,25	$4,99 \cdot 10^{-5}$	$3,57 \cdot 10^{-3}$
Begasung					
\dot{V}_g	vvm	0,25	0,17	—	$5 \cdot 10^{-6}$
\dot{V}/V	m ³ /s/m ²	$1,45 \cdot 10^{-3}$	$1,43 \cdot 10^{-4}$	—	$3,57 \cdot 10^{-2}$
$\Delta p_{ges, g}$	bar	0,12	0,20	—	$3,57 \cdot 10^{-7}$
Leistung					
L_l	W/m ²	—	22,13	0,25	$1,79 \cdot 10^{-3}$
L_g	W/m ²	17,24	2,69	—	$1,83 \cdot 10^{-7}$
$L_{ges, A}$	W/m ²	17,24	24,82	0,25	$1,79 \cdot 10^{-3}$
$L_{ges, V}$	W/m ³	49,66	412,93	1,25	0,01

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

Stofftransportkoeffizienten der Membranen sowie der Stofftransport bei reiner Oberflächenbegasung (Messung durch Robert Dillschneider, nicht veröffentlicht), sind in Abbildung 6.1 dargestellt. Für O₂ sind die Stofftransportkoeffizienten der unterschiedlichen Membranen sehr ähnlich und weichen um maximal 18 % voneinander ab. Der mittlere Stofftransportkoeffizient aller Membranen beträgt $k_1 = 4,34 \cdot 10^{-6}$ m/s. Verglichen mit der Oberflächenbegasung ist der Transportkoeffizient durch eine Membran um den Faktor 2,4 geringer. Für CO₂ sind die Transportkoeffizienten mit einer relativen Abweichung 85 % vom minimalen zum maximalen Wert deutlich unterschiedlich. Die Membranen aus Teflon ($k_1 = 4,02 \cdot 10^{-6}$ m/s) und Polypropylen ($k_1 = 4,44 \cdot 10^{-6}$ m/s) weisen die höchsten Transportkoeffizienten auf. Aufgrund des guten Stoffüberganges und der Autoklavierbarkeit der PTFE-Membran wurde diese für die weiteren Kultivierungen verwendet.

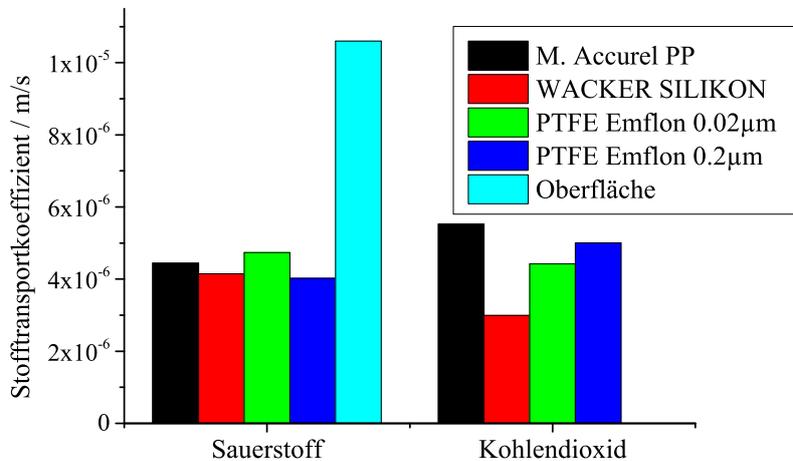


Abbildung 6.1.: Stofftransportkoeffizient k_1 einer Grenzfläche Wasser-Luft und von Membranen unterschiedlicher Materialien für die Gase O₂ und CO₂.

Tabelle 6.3.: Ausgewählte Membranen für die Gasversorgung des Biofilm-Reaktors.

Hersteller	Handelsname	Material	Porengröße	Dicke
—	—	—	µm	µm
Membrana	Accurel	Polypropylen	0,1	100
Wacker	Elastosil	Silikon	dicht	200
Pall	Emflon	PTFE	0,2	200
Pall	Emflon	PTFE	0,02	200

6.4. Auswahl einer Immobilisierungsmatrix

Für die Immobilisierung von Mikroalgen werden in der Literatur unterschiedliche Verfahren beschrieben wie z.B. der Einschluss in Hydrogele [185] oder die Fixierung auf anorganischen Materialien in Form eines Biofilms (s. Abschnitt 2.2.2). In dieser Arbeit wurden der Einschluss in Hydrogele (Alginat und Agarose) und die Bildung von Biofilmen an der Oberfläche unterschiedlicher Materialien verfolgt. Der Einschluss von Mikroalgen in Hydrogelen war prinzipiell möglich, allerdings ist der Herstellungsprozess sehr aufwändig und damit die Kontaminationsgefahr hoch. Wurden die Algen in Alginat-Kugeln eingeschlossen, quollen diese im Langzeitbetrieb ab ca. 4 Tagen auf und wurden fragil. Im Falle von beiden Einschlussmethoden wuchsen Algen außerhalb der Matrix im Medium, wodurch die Immobilisierung für den Langzeitbetrieb ungeeignet ist. Durch den Einschluss wurde zudem kein Biofilm, sondern nur eine Immobilisierung erreicht. Daher wurde der Ansatz des Einschlusses in Hydrogele verworfen. Aus einer Literaturstudie ging hervor, dass Baumwolle ein geeignetes Material für die Bildung eines Biofilms ist. Für die weitere Arbeit mit dem horizontalen Reaktor wurden die Algen auf einer Textiloberfläche aus Baumwolle (Frottana Walkfrottier, flächenspezifische Masse 380 g/m²) immobilisiert. Dieses Material erwies sich als gut geeignet für den Rückhalt der Algen im Reaktor. Im kontinuierlichen Betrieb mit einer Flussrate von 0,2 ml/min betrug die Konzentration der Algen im Auslauf des Reaktors 5 mg/l. Da der Reaktor während des Prozessverlaufs geschlossen war, konnte der Chlorophyllgehalt nur nach Ende der Kultivierung bestimmt werden. Für eine qualitative Bewertung ist die Kultivierung in dem Biofilm-Reaktor in Abbildung 6.10 dokumentiert. Die Zellen wuchsen homogen über die Fläche verteilt bis zu einem dichten Film. Zum Ende der Kultivierung wurde das Vlies an fünf unterschiedlichen Stellen bezüglich der flächenspezifischen Chlorophyllbeladung charakterisiert. Der Zellaufschluss erfolgte hierfür mittels Dimethylsulfoxid (siehe Abschnitt 3.4.2). Der Biofilm wies zu Prozessende einen mittleren flächenspezifischen Chlorophyllgehalt von 1147,1 mg/m² (+/- 106,3 mg/m²) auf. Für eine Absorption von 90 % des eingestrahnten Lichts werden theoretische Chlorophylldichten von 300 mg/m² benötigt [124]. Das in den Reaktor einfallende Licht wird somit mit zu über 90 % absorbiert.

6.5. Homogenisierung der Lichtintensität in Photobioreaktoren

Für die Herstellung der lichtleitenden Einbauten wurden zunächst verschiedene Materialien auf ihre Eignung für den Einbau in Photobioreaktoren getestet und eine Methodik für ihre Herstellung entwickelt. Die Auslegung der Struktur erfolgte aufgrund der Betrachtung des Brechungsindex des Materials und der Absorption der Algensuspension. Die hergestellten Strukturen wurden auf ihre lichtstreuende Eigenschaft untersucht. Eine Validierung des Konzepts erfolgte in vergleichenden Kultivierungen in Mini-Plattenreaktoren.

6.5.1. Herstellung und Charakterisierung von lichtleitenden Einbauten

Die lichtleitenden Strukturen wurden nach einer Replikatechnik durch die Abformung von Kugelpackungen hergestellt (s. Abschnitt 3.3). Als Abformmaterial wurden kugelförmige Hydrogele verwendet, die in ihrem Durchmesser variabel waren. Für den Einsatz in Photobioreaktoren wurden verschiedene Materialien für die Herstellung der lichtleitenden Einbauten auf ihre Eignung getestet. Optimale Materialien zeichnen sich durch die folgenden Eigenschaften aus:

- Transparentes Material
- Streuung des Lichts an der Grenzfläche der Struktur in das Wasser, d.h. Brechungsindex signifikant unterschiedlich zu Wasser ($n_{H_2O}(\lambda = 680 \text{ nm}) = 1,33$)
- Autoklavierbarkeit ($T = 121^\circ\text{C}$, $p = 1 \text{ bar}$, Wasserdampf)
- Für Algen nicht toxisches Material

Ein Material mit optimalem Brechungsindex fokussiert das Licht in das Kugellinnere. Die Abbildungsgleichung 6.1 beschreibt die Brechung des Lichts an einer Kugeloberfläche [186].

$$\frac{n_1}{g} + \frac{n_2}{b} = \frac{n_2 - n_1}{r} \quad (6.1)$$

Mit den Brechungsindizes der beiden Materialien n_1 und n_2 , der gegenstandsseitigen Brennweite g , der bildseitigen Brennweite b und dem Radius der Kugel r . Bei der Beleuchtung von Photobioreaktoren wird von achsenparallelem Licht ($g \rightarrow \infty$) ausgegangen. Für einen

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

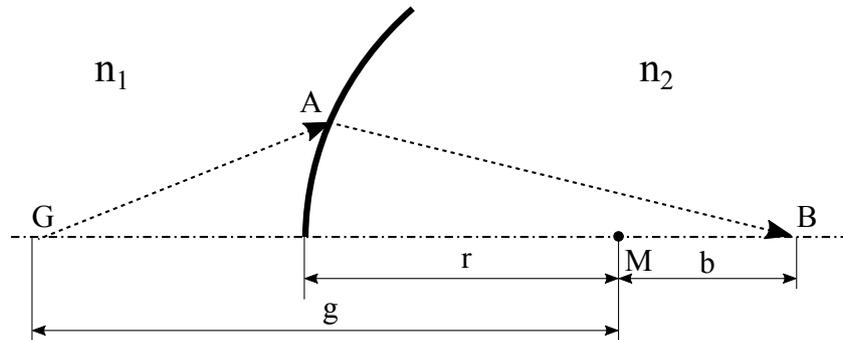


Abbildung 6.2.: Brechung eines Lichtstrahls an einer Kugeloberfläche, welche die Materialien mit den Brechungsindizes n_1 und n_2 voneinander trennt, nach Meschede [186]. G: Gegenstandsseitige Brennweite mit der Entfernung g vom Mittelpunkt der Kugel, B: Bildseitige Brennweite mit der Entfernung b vom Mittelpunkt der Kugel, M: Mittelpunkt der Kugel mit Radius r .

Kugelradius von 5 mm gilt für eine vollständige Fokussierung des auf die Kugeloberfläche auftreffenden Lichts eine maximale bildseitige Brennweite von $b = 10$ mm. Um dies zu erreichen, muss das Verhältnis der Brechungsindizes von Wasser und Material ein Verhältnis von $n_2/n_1 = 2$ erfüllen. Brechungsindizes mit einem doppelt so hohen Wert des Brechungsindex wie Wasser (also $n_2 = 2,66$) sind selten und nicht einfach zu bearbeiten (Sultanova, Kasarova, und Nikolov 2012). In einer Literaturrecherche stellten sich zweikomponentige Epoxidharze und ein kaltvernetzendes Silikon als potentiell geeignete Materialien heraus. Die Herstellerangaben und der Brechungsindex sind in Tabelle 6.4 aufgeführt. Für die Epoxidharze existieren keine Herstellerangaben. Brechungsindizes vergleichbarer Epoxidharze liegen im Bereich von $n_2 = 1,48 \dots 1,55$ (swiss-composite: Rütapox L 20 – SL oder Proxy-Sytems: Epoxyd-Gießharzsystem „wasserklar“).

Tabelle 6.4.: Herstellerangaben und Brechungsindex der getesteten Materialien für die Herstellung von lichtleitenden Einbauten (LL).

Hersteller	Handelsname	Material	Brechungsindex bei $\lambda = 680$ nm
Epple Chemie	epple Chemie 6908	Epoxidharz	n.A.
Epple Chemie	epple Chemie 7149	Epoxidharz	n.A.
Wacker	Elastosil RT 604	Silikon	1,41

Aus den Materialien wurden Prüfkörper hergestellt und nach den oben angegebenen Kriterien untersucht. Das Silikon erfüllt alle Kriterien für den Einsatz in Photobioreaktoren. Die

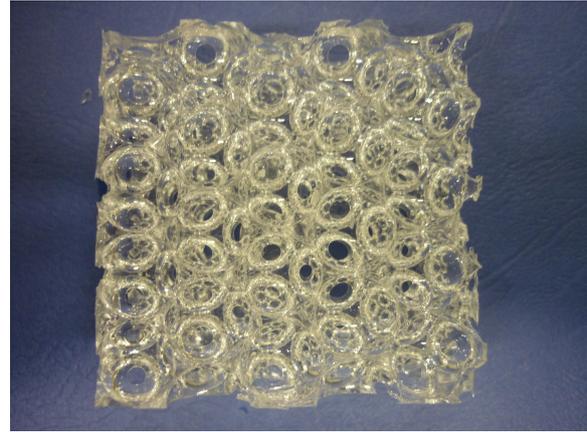
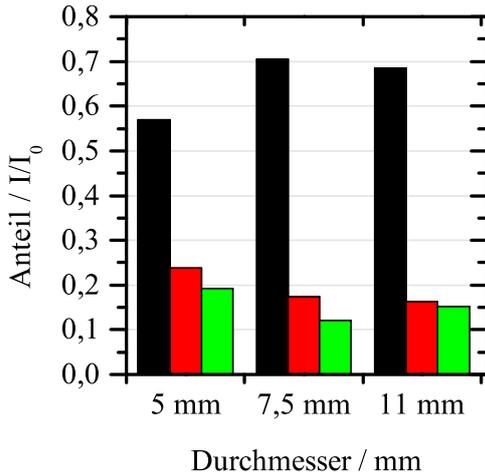
6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

weiteren Materialien sind aufgrund von Opazität und Verformung nach dem Autoklavieren ungeeignet. Die Herstellung der Strukturen wurde mit Silikon weiterverfolgt. Dies weist mit einem Brechungsindex $n_{\text{Silikon}}(\lambda = 680 \text{ nm}) = 1,41$ ein Verhältnis zu Wasser von 1,06 auf. Damit ist die Fokussierung nicht ideal bei $b = 10 \text{ mm}$ sondern bei $b = 84 \text{ mm}$. Auf die Kugeloberfläche auftreffendes Licht wird somit nicht vollständig in die Kugel gebrochen. Konstruktiv wurde durch eine zweite Reihe an Kugeln eine weitere Absorption des Lichts durch die Algen und eine weitere Verdünnung des Lichtes erreicht. Für die Abschätzung der abzuformenden Kugeldurchmesser wurde die Absorption in einer Algensuspension nach einem adaptierten Ansatz nach Lambert-Beer (Gleichung 2.11) berechnet. Bei einer Konzentration von $c_X = 1; 2,5$ bzw. 5 g/l werden bei einem Plattenreaktor 90 % des auf die Oberfläche auftreffenden Lichts nach 15,3; 6,1 bzw. 3 mm Lichtweg absorbiert. Der für die Berechnung verwendete adaptierte Absorptionskoeffizient $\epsilon = 150 \text{ l/g/m}$ wurde für eine Konzentration der Algen von $0,3 \text{ g/l}$ bestimmt. Lichtleitende Einbauten wurden mit den Durchmessern von 5; 7,5; 10 bzw. 11 mm nach der Replikatechnik hergestellt (s. Abschnitt 3.3). Bei diesen Durchmessern wird bei Biomassekonzentrationen von 1 bis $2,5 \text{ g/l}$ eine Absorption von 90 % des eingestrahlt Lichts erreicht. Ein lichtleitender Einbau ist in Abbildung 6.3b gezeigt. Die Lichtstreuung an den Phasengrenzflächen der lichtleitenden Einbauten wurde zunächst in Wasser ohne Zugabe von Algen untersucht. Die durchschnittliche Transmission (gemessen an 16 Messpunkten), die Streuung sowie die hieraus berechnete Reflexion ist in Abbildung 6.3a angegeben. Die durchschnittlich gestreute Photonenflussrate steigt mit geringerem Kugeldurchmesser. So kann das gestreute Licht bei einer Verringerung des Kugeldurchmessers von 11 mm auf 5 mm von 16 % auf 23 % erhöht werden.

6.5.2. Kultivierung mit lichtleitenden Einbauten in Plattenreaktoren

In parallelen Kultivierungen in Mini-Platten-Reaktoren wurde der Einfluss der transparenten lichtleitenden Einbauten auf die spezifische Wachstumsrate μ sowie die PCE betrachtet. Dies wurde bei einer Lichtintensität von $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ untersucht. Das experimentelle Vorgehen ist in Abschnitt 3.3 beschrieben. Die Verläufe der Biomassekonzentration der Experimente bei $1000 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ sind in Abbildung 6.4 abgebildet. Die aufgetragenen Messwerte für das Experiment mit lichtleitenden Einbauten wurden aus dem Mittelwert von drei zeitlich parallelen Experimenten ermittelt. Die Balken zeigen die Standardabweichung an. Für die letzten drei Messwerte ist einer der drei Reaktoren in der Mittelwertbildung aufgrund einer starken Ab-

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat



(a)

(b)

Abbildung 6.3.: (a) Charakterisierung der (■)Transmission, (■) Streuung und (■) Reflexion lichtleitender Einbauten mit verschiedenen Porendurchmessern. (b) Lichtleitender Einbau mit einem Porendurchmesser von 11 mm.

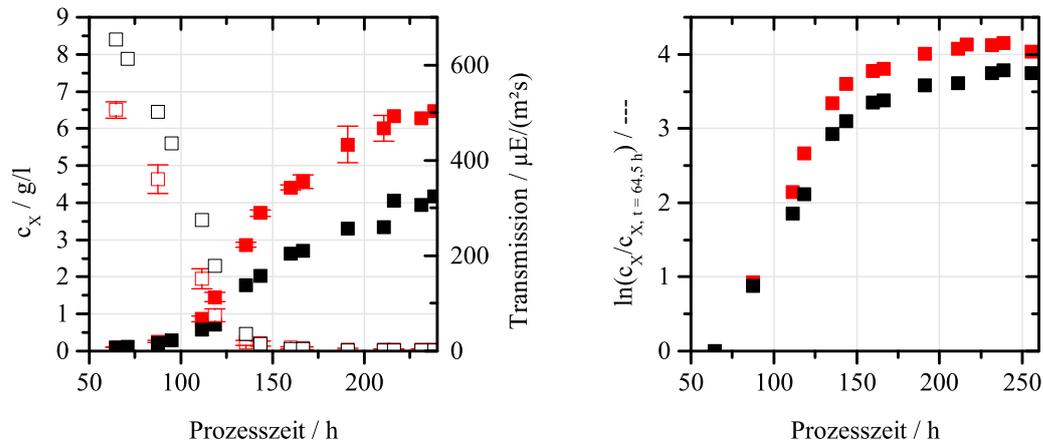
Tabelle 6.5.: Werte der Wachstumsraten und PCE für die Kultivierung mit und ohne lichtleitende Einbauten.

	mit LL 1	mit LL 2	mit LL 3	ohne LL 1	ohne LL 2
μ in 1/d	1,09	1,06	1,17	0,95	0,94
PCE in %	1,66	1,85	2,09	1,12	1,03

weichung der gemessenen Biomasse nicht berücksichtigt worden. Angegeben ist bei diesen Messwerten der Mittelwert der beiden verbleibenden Reaktoren. Die abgebildeten Werte für die Kultivierung ohne lichtleitende Einbauten sind die Mittelwerte aus zwei zeitgleich laufenden Experimenten. Die Messwerte der zwei Experimente wichen über den Kultivierungsverlauf im Mittel um 6 % voneinander ab. Die spezifische Wachstumsrate in der exponentiellen Wachstumsphase und die PCE in der linearen Wachstumsphase der einzelnen Experimente sind in Tabelle 6.5 zusammengefasst.

Der zeitliche Verlauf der Biomassekonzentration ist in Abbildung 6.4a zusammen mit der jeweiligen Transmission des Lichts durch den Reaktor aufgetragen. Die Auftragung der logarithmierten Konzentration, normiert auf die Biomassekonzentration zur Prozesszeit von 64 h ist in Abbildung 6.4b in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Die Auftragung der logarithmierten Biomassekonzentration zeigt eine exponentielle Wachstumsrate von 60 h bis zu einer Prozesszeit von ca. 135 h. Die exponentielle Wachstumsrate der Algen, bestimmt in

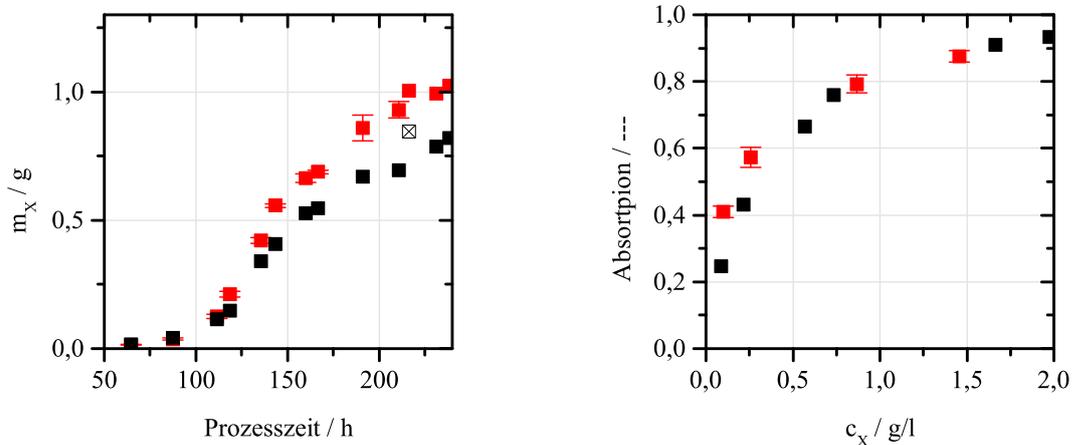
6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat



(a) Biomassekonzentration und Transmission

(b) Linearisierte Biomassekonzentration

Abbildung 6.4.: Zeitlicher Verlauf von (■) Konzentration und (□) Transmission der Kultivierung von *C. reinhardtii* WT-8b+ (■) mit und (■) ohne lichtleitende Einbauten.



(a) Biomasse

(b) Absorption des Plattenreaktors

Abbildung 6.5.: Zeitlicher Verlauf von Biomasse und vom Reaktor absorbiertes Anteil der Photonen bei Kultivierung von *C. reinhardtii* WT-8b+ (■) mit und (■) ohne lichtleitende Einbauten.

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

dem Zeitraum von 60 h bis 135 h, ist durch den Einsatz der lichtleitenden Einbauten um etwa 15 % höher als in den Vergleichsreaktoren ohne die Einbauten. Die erreichte Biomassekonzentration von 2,86 g/l zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase im Reaktor mit lichtleitenden Einbauten ist deutlich höher als die Biomassekonzentration von 1,78 g/l im Reaktor ohne die Einbauten. Die Algen wachsen im Reaktor mit diesen Einbauten bis zu höheren Biomassekonzentrationen exponentiell als im Vergleichsreaktor ohne die Einbauten. Unter Beachtung der unterschiedlichen Volumina der Reaktoren wurde mit Einbauten eine Biomasse von 0,42 g bzw. ohne Einbauten von 0,31 g gebildet. In der exponentiellen Phase konnte somit eine Produktionssteigerung von 35 % erzielt werden. In Abbildung 6.4a ist eine geringere Transmission von Photonen durch den Reaktor zu erkennen. Abbildung 6.5b zeigt den Anteil der Rate vom Reaktor absorbiert Photonen, normiert auf die Photonenflussrate, die auf die Reaktoroberfläche eintrifft, in Abhängigkeit von der Algenkonzentration. Bei geringen Konzentrationen der Algen wird durch die Streuung des Lichts an den Einbauten eine höhere Absorption der Photonen im Reaktor erreicht. Bei einer Algenkonzentration von ca. 0,1 g/l wird durch die Einbauten 66 % mehr Licht absorbiert. Erst ab einer Konzentration von ca. 0,75 g/l wird in beiden Reaktoren gleich viel Licht absorbiert. Beide Reaktoren erreichen ab einer Biomasse von 2 g/l die maximale Absorption von 93 % des auftreffenden Lichts. Der verbleibende Anteil von 7 % wird von der Reaktoroberfläche reflektiert oder transmittiert. Dabei ist die Reflexion mit ca. 50 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ der größere Anteil im Vergleich zur Transmission mit ca. 2 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$. Diese geringe Transmission wird von den Reaktoren mit und ohne die Einbauten ab einer Prozesszeit von 160 h erreicht (s. Abbildung 6.4a). Der Übergang von der exponentiellen in die lineare Wachstumsphase ist ab einer Prozesszeit von 140 h gut ersichtlich. Ab der Prozesszeit von ca. 160 h wurde die PCE der Reaktoren bestimmt. Im Mittel wurde mit den lichtleitenden Einbauten eine PCE von 1,82 % erreicht. Ohne Einbauten war die PCE mit einem Durchschnitt von 1,07 % deutlich geringer. Die erhöhte PCE lässt auf eine Lichtverteilung im Reaktor schließen, die ein geringeres unproduktives Volumen aufweist.

6.6. Konstruktion eines Reaktors zur Kultivierung eines phototrophen Biofilms

Auf Basis der Erkenntnisse der vorhergehenden Abschnitte wurde ein Reaktordesign entwickelt, das die Kultivierung von Algen in einem horizontalen Biofilm-Reaktor ermöglichte. Der Reaktor wurde nach den folgenden Kriterien konzipiert:

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

- Der Reaktor soll die sterile Kultivierung von Mikroalgen in einem Biofilm ermöglichen.
- Der Reaktor soll als horizontaler Plattenreaktor betrieben werden.
- Eine Be- und Entgasung des Reaktors soll über Membranen erfolgen.
- Der Reaktor soll die kontinuierliche Produktion von Glycolat ermöglichen.
- Der PBR soll so konstruiert werden, dass er modular an das Gesamtanlagenkonzept von Photomethan (Photomodul, Trennmodul, Bakterienmodul) angeschlossen werden kann und modular hochskalierbar ist („Numbering up“).
- Um Modifikationen an dem PBR vorzunehmen, sollen die Teile möglichst austauschbar konstruiert werden.
- Das System soll in einem Autoklaven dampfsterilisierbar sein.

Abbildung 6.6 zeigt den Aufbau des konstruierten Reaktors in der Explosionszeichnung, bestehend aus Metallrahmen (dunkelgrau), Glasscheiben (hellgrau), Flachdichtungen (blau) und Membran zur Begasung (gelb). Zur Veranschaulichung des kompartimentierten Aufbaus zeigt Abbildung 6.7 einen Schnitt in der y-z-Ebene durch die Mitte des Reaktors. Der Reaktor besteht aus drei Kompartimenten: Einem Begasungskompartiment, einem Kultivierungskompartiment sowie einem Kompartiment für die Temperierung. Durch das Begasungskompartiment (unteres Segment, Abbildung 6.7) wird über je zwei Bohrungen für Zu- und Abstrom ein Gasgemisch geleitet. Der Gasaustausch mit der Flüssigkeit des Kultivierungskompartiments (mittleres Segment, Abbildung 6.7) erfolgt über eine Membran (gelb markiert in Abbildung 6.6 und 6.7). Es wurde eine Teflon-Membran gewählt, siehe Abschnitt 6.3. Die Membran ist bis 121°C hitzebeständig und kann somit im eingebauten Zustand in dem Reaktor autoklaviert werden. Ein Durchhängen der Membran wird durch ein Stützgitter als mechanische Unterstützung verhindert. Das mittlere Segment in Abbildung 6.7 für die Kultivierung der Algen ist in seiner Höhe über die Wahl der oberen Flachdichtung in der Explosionszeichnung variabel zwischen 3 und 7 mm einstellbar, um die Kultivierung auf verschiedenen Immobilisierungsmatrizes zu ermöglichen. Das Kultivierungssegment hat eine beleuchtete Fläche von 0,048 m². Für die Versorgung mit Nährstoffen und den Abtransport der glycolathaltigen Lösung wird das Kultivierungssegment über jeweils vier Bohrungen für Zu- bzw. Ablauf des Mediums durchströmt. Über ein Temperierungssegment wird mit einem sekundären Kühlkreislauf die Temperatur im Reaktorinneren eingestellt (s. Temperaturmessung Abbildung 6.8). Der sekundäre Kreislauf ist an die zentrale Kühlwasserversorgung angeschlossen und verfügt über eine elektrische Heizung. Die Materialien des Reaktors sind Edelstahl (V8) für die Rahmenteile und

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

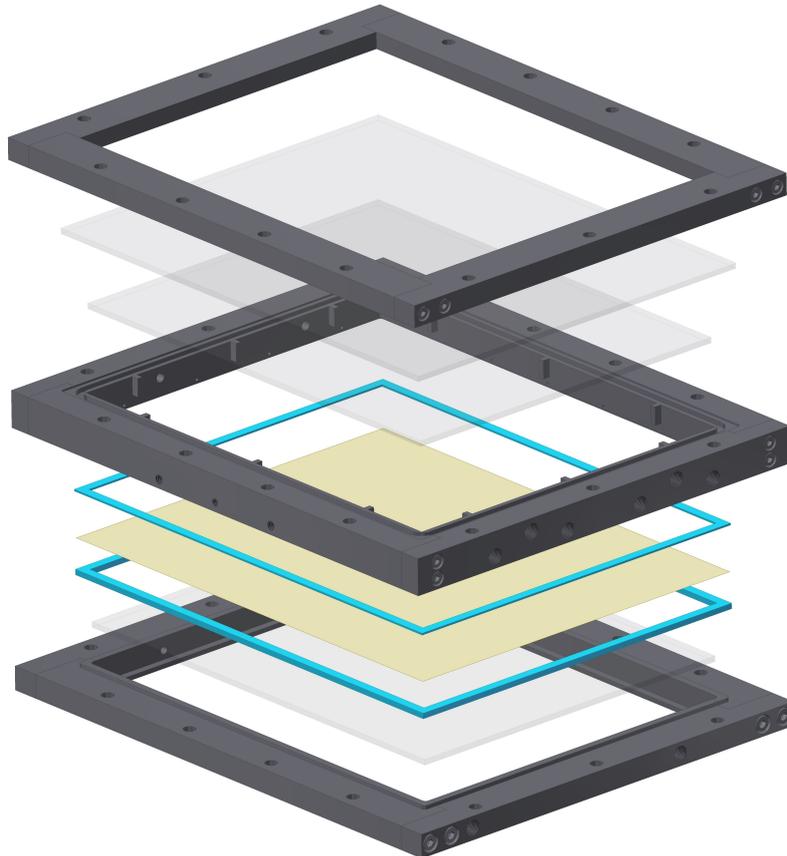


Abbildung 6.6.: Explosionszeichnung des Reaktors zur Kultivierung von immobilisierten Algen. Grau: Edelstahlrahmen mit diversen Bohrungen für Zu- und Ablauf von Kühlwasser, Heizwasser, Medium bzw. Glycolatlösung, Gasmisch. Hellgrau, transparent: Glasscheiben zur Begrenzung der Segmente. Blau: Flachdichtungen zur Variation der Höhe des Begasungssegmentes. Gelb: Membran zur Begasung des Kultivierungssegmentes.

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

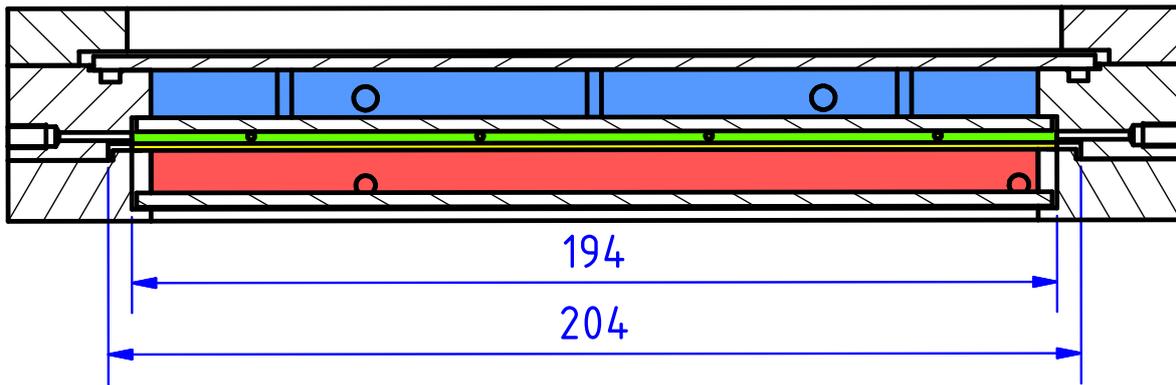


Abbildung 6.7.: Schnitt durch den Biofilm-Reaktor. Blau (Segment 1): Kühlsegment mit je zwei Bohrungen für Zu- und Ablauf des Kühlwassers, Grün (Segment 2): Kultivierungssegment mit je 4 Bohrungen für den Zu- und Ablauf des Mediums und drei Bohrungen in den Seitenteilen zur Entnahme von Proben, Gelb: Membran für die Begasung des Kultivierungssegments, Rot (Segment 3): Begasungssegment mit je zwei Bohrungen für Zu- und Abstrom des Gasgemisches. Die Maße sind in Millimetern angegeben.

Glas für die beleuchteten Teile bzw. die Abgrenzungen der Reaktorkompartimente gegenüber der Umgebung. Die Peripherie des Reaktors ist in Abbildung 6.8 dargestellt. Die Beleuchtung erfolgt über ein LED-Modul mit 320 LEDs (MS6L083AT, Nichia, Japan). Die Lichtverteilung wurde auf der Reaktoroberfläche anhand von 90 Messpunkten bestimmt. Die normierte Lichtintensität, bezogen auf den Mittelwert, ist in Abbildung 6.9a dargestellt. Die Verteilung der Lichtintensität kann um ca. 30 % zum Mittelwert abweichen. Der Gastransfer durch die Membran wurde in Abhängigkeit von der Flussrate von Medium und Gas gemessen. Abbildung 6.9b zeigt, dass der Stofftransportkoeffizient durch die Membran in dem Reaktor auch bei geringen Gasflussraten denen der Membrantestkammer entspricht (s. Abschnitt 6.3). Eine Verringerung der Medien-Flussrate führt zu einem verringerten Stofftransportkoeffizienten.

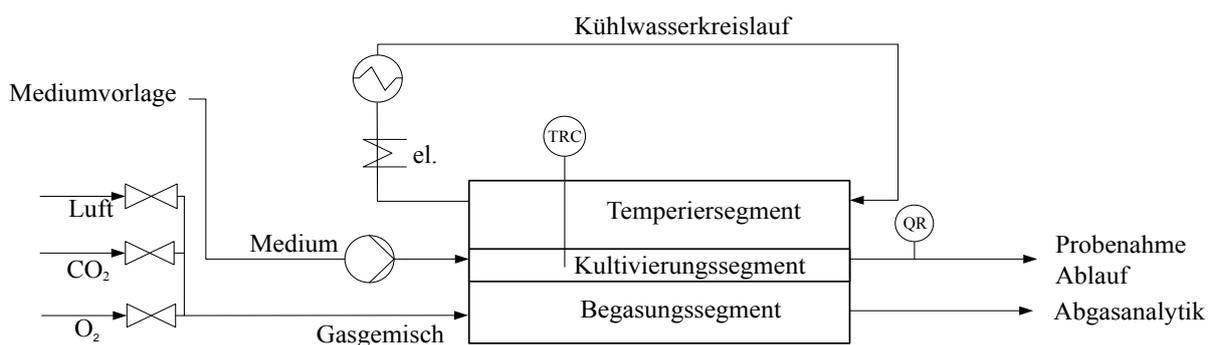


Abbildung 6.8.: Schematische Darstellung des Aufbaus des Biofilm-Reaktors mit Peripherie. Am Auslauf wird der O₂-Partialdruck in Lösung gemessen und aufgezeichnet.

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

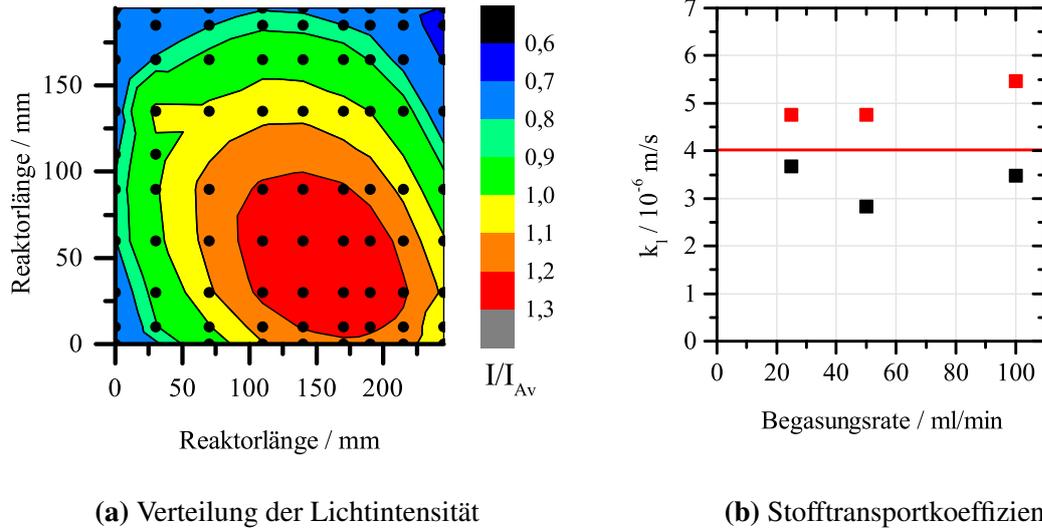


Abbildung 6.9.: Charakterisierung des Biofilm-Reaktors bezüglich Lichtverteilung und Stofftransport: (a) Auf den Mittelwert normierte Verteilung der Lichtintensität über der Oberfläche des Biofilmreaktors. Die Messstellen sind mit Punkten markiert, (b) Stofftransportkoeffizient von O_2 bei (■) 21 ml/min und (■) 42 ml/min Durchströmungsraten des Mediums und verschiedenen Gasvolumenströmen in dem Biofilm-Reaktor und in der (—) Membrantestzelle.

6.6.1. Kultivierung und Produktion von Glycolat im Biofilm-Reaktor

Die Kultivierung in dem Biofilm-Reaktor wird näher in Abschnitt 3.2.4 erklärt. Nach dieser Methodik wurde in dem Reaktor ein Biofilm etabliert (Lichtintensität $I_0 = 200 \mu E/(m^2s)$, Flussrate $\dot{V}_{\text{Medium}} = 0,2 \text{ mL/min}$, Medium 1-fach konzentriertes TP-Medium). Für eine qualitative Bewertung ist die Kultivierung in dem Biofilm-Reaktor in Abbildung 6.10 dokumentiert. Für die Induktion der Glycolatbildung wurde der CO_2 -Anteil im Gaskompartiment zu einer Prozesszeit von 0 h auf $y_{CO_2} = 0,6 \%$ (v/v, CO_2 in Luft) bzw. zu 21 h auf $y_{CO_2} = 0,8 \%$ (v/v, CO_2 in Luft) umgestellt. Der pH wurde bei der Kultivierung über Tris-Puffer eingestellt. Er bleibt trotz der Verschiebung des Carbonat-Systems durch die CO_2 Reduktion und die Glycolatproduktion in einem für die Algen vitalen Bereich. Der Anteil des Sauerstoffs in der Zuluft wurde nicht erhöht. So konnte die Induktion der Photorespiration durch die Reduktion der Photosynthese und der damit verbundenen Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks im Medium beobachtet werden. Der Abfall des Sauerstoffpartialdrucks ist in Abbildung 6.11 in der Prozesszeit von 0 ... 19 h gut zu beobachten. Ab einer Prozesszeit von ca. 30 h ist dieser bei einem Wert von ca. 35 % des Gesamtdrucks annähernd konstant. Der pO_2 -Abfall in der Prozesszeit von ca. 38 ... 45 h kann aufgrund einer Gasblase in dem Sondenbecher entstanden sein. Die Konzentration

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

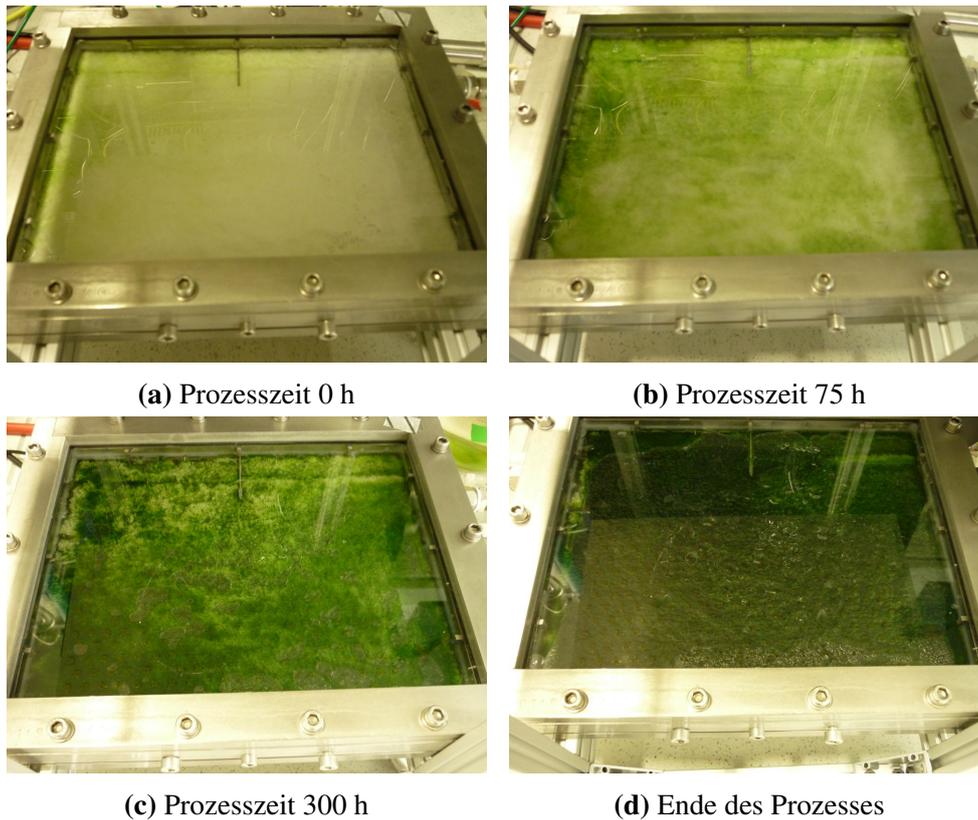


Abbildung 6.10.: Biofilmbildung über den Prozessverlauf auf Baumwolle-Frottiertier (Frottana Walkfrottiertier, flächenspezifische Masse 380 g/m²). Zum Ende des Prozesses wurde der Chlorophyll-a-Gehalt (ca. 1000 mg/m²) auf dem Vlies bestimmt.

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

von Glycolat betrug im Auslauf bei einer Mediumflussrate von 0,2 ml/min zu einer Prozesszeit von 21,7 h eine Konzentration von $c_{\text{Glyc}} = 30 \text{ mg/l}$ bzw. zu 97,8 h eine Konzentration von 50 mg/l zu den Prozesszeiten $t = 21,7$ bzw. 97,8 h. Dies entspricht einer Produktion von 12,5 mg/m²/h.

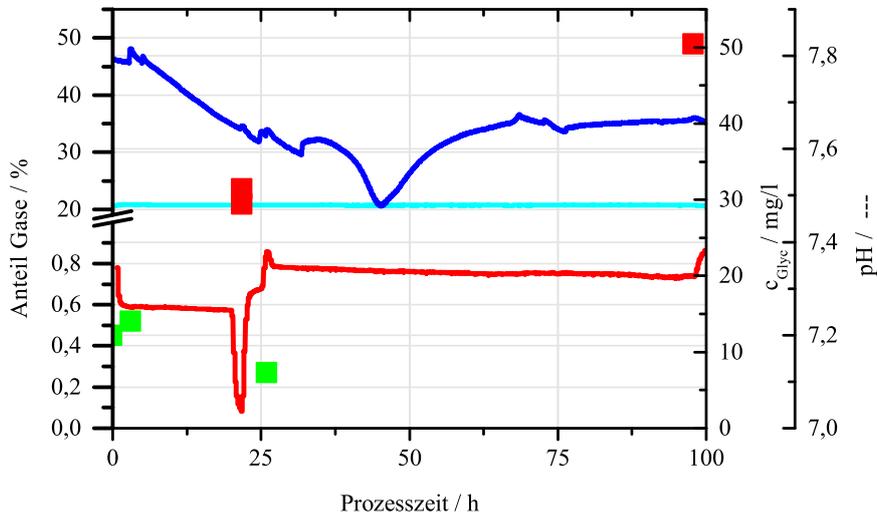


Abbildung 6.11.: Übertragung der Glycolatproduktion auf den Biofilm-Reaktor. Die Kultivierung erfolgte bei einer Lichtintensität von 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, einer Mediumflussrate von 0,2 ml/min mit 1-fachem TP-Medium. (■) Glycolatkonzentration, Partialdruck von (—) CO_2 und (—) O_2 im Gaskompartiment und von (—) O_2 in Lösung sowie der (■) pH-Wert im Medium.

6.7. Diskussion des Reaktorkonzepts für die Kultivierung im Biofilm

Photobioreaktoren, die dem Stand der Technik entsprechen, lassen sich in zylindrische Reaktoren (Rohrreaktor, Blasensäule) oder Plattenreaktoren (Flat-Plate, Open-Pond) einteilen. Eine weitere Möglichkeit ist die Einteilung in die technisch anspruchsvolleren geschlossenen Reaktoren (Rohrreaktor, Blasensäule, Flat-Plate) und das technisch einfachere offene Design (Open-Pond) [14]. Innerhalb dieser Gruppen wurden viele verschiedene Konzepte von Photobioreaktoren entwickelt [187, 182, 112]. Der Energiebedarf für Kultivierungen in diesen Reaktoren ist jedoch vielfach zu hoch, um eine wirtschaftliche Produktion von Biokraftstoffen zu gewährleisten [188]. Teil dieser Arbeit war die Entwicklung eines Photobioreaktors zur effizienten Produktion von Glycolat für dessen energetische Verwertung. Hierzu wurde ein

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

Reaktorkonzept erarbeitet, dass konsequent die Reduktion des Leistungseintrags berücksichtigt. Ansatzpunkte hierfür waren die Reduktion von Volumenströmen und eine Verringerung von Druckgradienten für den Betrieb des Reaktors. So soll ein möglichst hoher Wirkungsgrad erzielt werden. In Abschnitt 6.1 wurden die Stoffstromraten berechnet, die für die Versorgung der Algen erforderlich sind. Der Vergleich mit den Pump- und Begasungsraten von den in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen gängigen geschlossenen Photobioreaktoren zeigt eine erhebliche Diskrepanz zwischen dem Bedarf der Algen und den technisch realisierten Begasungs- und Pumpraten. Die erhöhten Stoffstromraten und die turbulente Strömung erfordern einen entsprechend höheren Leistungseintrag. Daher besteht insbesondere bei den Volumenströmen von Gas- und Flüssigphase ein hohes Potential zur Leistungsreduktion bei Photobioreaktoren. Um dies zu validieren, wurde die Betriebsleistung gängiger Photobioreaktoren für Begasung und Durchmischung separat betrachtet und verglichen. Ein zuverlässiger energetischer Vergleich der Reaktortypen anhand von Literaturdaten ist nicht möglich, da es an systematischen Untersuchungen hinsichtlich des Energiebedarfs mangelt [188]. Daher wurde der Leistungseintrag in Abschnitt 6.2 aufgrund der Druckgradienten und der geförderten Stoffströme in den Reaktoren berechnet. Ein Vergleich der berechneten Werte mit publizierten gemessenen Leistungseinträgen validiert die Rechnung. Die höchste volumetrische Leistungsaufnahme hat nach den Berechnungen in 6.2 der Rohrreaktor mit 413 W/m^3 . Hierbei überwiegt der erforderliche Leistungseintrag für die hohe Fließgeschwindigkeit des Mediums. Diese hohe Fließgeschwindigkeit ist in dem Konzept erforderlich, um eine turbulente Strömung zu erzeugen, welche die Sedimentation der Algen verhindert [110]. Weiterhin bildet sich über die Länge des Rohrreaktors ein Gradient der Gaspartialdrücke sowie des pH-Werts aus, da bei vielen Konzepten von Rohrreaktoren an nur einer Stelle ein Gasaustrag von O_2 und ein Gaseintrag von CO_2 vorgesehen ist [109, 99, 107]. Die Verweilzeit der Algen in den Rohren des Reaktors muss dementsprechend so kurz sein, dass der O_2 -Partialdruck durch die Photosynthese der Algen in dem Medium nicht in zellschädigende Bereiche von über 60 % des Gesamtdrucks steigt [107]. Der Gasaustausch erfolgt in diesen Konzepten innerhalb eines Risers, der dem Konzept einer Blasensäule entspricht. Um einen guten Gasaustausch durch eine hohe Verweilzeit zu erreichen, haben die Riser eine Höhe im Bereich von 1 bis 2 m. Für die Begasung des Risers ist ein Vordruck entsprechend des hydrostatischen Drucks der Flüssigkeitshöhe erforderlich. Der Gasaustausch in dem 2 m hohen Riser des Rechenzenarios macht im Vergleich zu dem Leistungseintrag für das Pumpen des Mediums ca. 10 % aus. Publierte Messungen geben für den volumenspezifischen Leistungseintrag in Rohrreaktoren Werte von 800 bis 3400 W/m^3 an [109]. Eine weitere Quelle gibt 170 W/m^3 [108] an. Bei diesen Angaben muss beachtet werden, dass die Flussraten von 0,2 bis 0,3 m/s nur durch den Blasenauftstieg innerhalb des Risers

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

ohne zusätzliches Pumpen von Flüssigkeit erreicht wurden [109]. In Acién [110] erfolgt eine separate Betrachtung der Begasung und der Durchmischung, ähnlich dem Rechenszenario in Abschnitt 6.2. Für den Betrieb ist ein flächenspezifischer Leistungseintrag von 10 W/m^2 für die Begasung und von 24 W/m^2 für das Pumpen der Flüssigkeit erforderlich. Die in Tabelle 6.2 berechneten flächenspezifischen Leistungseinträge in den Rohrreaktor von $2,7 \text{ W/m}^2$ für die Begasung bzw. $22,1 \text{ W/m}^2$ für die Durchmischung liegen in diesem Bereich. Für Flat-Plate-Reaktoren werden in der Literatur Leistungseinträge für den Gaseintrag von 50 W/m^3 angegeben [106]. Dieser Wert ist identisch dem berechneten volumenspezifischen Leistungseintrag und entspricht in dem Rechenszenario in Abschnitt 6.2 einem flächenspezifischen Leistungseintrag von 17 W/m^2 . Der Leistungseintrag ist zwar geringer als bei Rohrreaktoren, jedoch benötigen Flat-Plate-Reaktoren durch die kombinierte Begasung und Durchmischung höhere Leistungseinträge als für die alleinige Versorgung der Algen mit CO_2 benötigt würde [189]. Der flächen- und volumenspezifische Leistungseintrag des Open-Ponds liegt geringer als der geschlossener Reaktoren. Literaturdaten von $3,7 \text{ W/m}^3$ bestätigen dies [190]. Das Konzept der Oberflächenbegasung und einer relativ langsamen Durchmischung erfordert eine entsprechend geringe Betriebsleistung. Nachteilig an der Oberflächenbegasung des Open-Ponds ist ein geringer CO_2 -Austausch. Zusammen mit dem geringen Lichteintrag in die tiefen Bereiche des Reaktors führt dies zu einer geringen Produktivität (s. Tabelle 2.3). Die theoretisch berechneten Werte für die einzelnen Reaktoren stimmen sehr gut mit den praktisch validierten Werten überein. Der Bezug der Leistungseinträge auf die Standfläche der Reaktoren zeigt die gleiche Tendenz für den Betrieb der Reaktoren. Eine Betriebsleistung von 2 W/m^2 wurde für einen Reaktor mit positiver energetischer Netto-Bilanz der Biomassebildung nach Abzug der Betriebsleistung publiziert [112, 110]. Nur die Betriebsleistung des Open-Pond ist in diesem Bereich.

Für die Reduktion des Leistungseintrags in einen Photobioreaktor muss auf die Reduktion von Druckgradienten und die Verringerung von Volumenströmen geachtet werden. Dies erfordert den Verzicht auf eine turbulente Durchströmung des Reaktors mit hohen Flussraten. Zudem sind hohe Begasungsraten gegen einen hydrostatischen Druck zu vermeiden. Die rechnerische Betrachtung der Leistungseinträge in Reaktoren, die dem Stand der Technik entsprechen, zeigt, dass hier ein großes Verbesserungspotential besteht. Das in dieser Arbeit vorgestellte Konzept eines Reaktors basiert auf der Kultivierung von Mikroalgen in einem Biofilm. Hierdurch ist eine Verhinderung der Sedimentation durch Turbulenz nicht notwendig. Die hohen Zelldichten in dem Biofilm ermöglichen ein flaches Kultivierungskompartment. Durch eine horizontale Ausrichtung des Kultivierungskompiments kann der Druckgradient aufgrund der Hydrostatik einer Wassersäule verringert werden. Die Ausbildung von Konzentrations-

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

gradienten über die Reaktorlänge, wie es bei einem Rohrreaktor der Fall ist, kann durch eine flächige Begasung mit einer Membran verhindert werden. Im Gegensatz zu dem Rohrreaktor müssen so keine hohen Volumenströme für die Verringerung der Verweilzeit realisiert werden. Durch die Begasung über eine Membran muss zudem kein hydrostatischer Druck überwunden werden, wie es für die Blasenbegasung von Flat-Plate- oder Rohrreaktoren üblich ist. Die Stoffströme von CO₂ und Nährstoffen können dem Reaktor separat und entsprechend dem Bedarf zugeführt werden. Eine notwendige Voraussetzung dieses Konzepts war die Auswahl einer Membran mit einem entsprechend guten Stoffübergangskoeffizienten für die Versorgung der Algen mit CO₂ und dem Austrag von O₂ aus dem Reaktor. Membranen wurden in verschiedenen Reaktoren eingesetzt [191, 192, 193, 194, 195, 196]. Vier Materialien wurden ausgewählt und deren Stofftransportkoeffizienten bestimmt. Es wurde eine PTFE-Membran ausgewählt, die einen guten Transportkoeffizienten für CO₂ aufweist und autoklavierbar ist. Der Stofftransportkoeffizient der Membran für Sauerstoff ist um den Faktor 2,2 geringer als der Wert einer Oberflächenbegasung. Die Membran ist somit als Kontaktor zwischen Gas- und Flüssigphase nicht so effektiv wie die reine Phasengrenzschicht. Durch Einstellung des CO₂-Anteils in der Gasphase des Biofilm-Reaktors kann jedoch der Kohlenstoffbedarf des Reaktors nach Tabelle 6.1 gedeckt werden.

Weiterhin musste eine Kultivierung der Algen in immobilisierter Form etabliert werden. Hierfür wurden verschiedene Einschlussmethoden und Materialien getestet. Ein Einschluss der Algen in Hydrogelen erwies sich aufgrund der manuellen Herstellung in mehreren Schritten als ungeeignet. Die einzelnen Herstellschritte z.B. für den Einschluss in Alginate weist ein hohes Kontaminationspotential auf. Zudem wäre die Versorgung der Algen mit Nährstoffen bzw. der Abtransport des gebildeten Glycolats durch Diffusion erschwert [197, 198]. Außerdem war der Einschluss nicht stabil. Die Alginatekugeln quollen auf und die Algen wuchsen in Suspension. Die gute Eignung von natürlichen organischen Materialien als Haftgrund für Biofilme wird in der Literatur beschrieben [129]. Ein Baumwollvlies hat sich in dem Materialscreen als geeignet erwiesen (s. Abschnitt 6.4). Die Kultivierung der Algen zeigt, dass mit dem im Reaktor etablierten Biofilm eine annähernd vollständige Absorption des eingestrahlteten Sonnenlichts möglich ist. Der Anheftungsmechanismus der Algen wurde nicht weiter untersucht. Als denkbare Anheftmechanismen gelten Wechselwirkungen über das Zeta-Potential, hydrophobe Wechselwirkung [121, 127] oder die Bildung extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) [123]. Auch eine Sedimentation der Algen wäre denkbar. Der Rückhalt der Algen wurde hierbei durch die große Oberfläche des Frottee-Stoffes begünstigt. Durch die Kombination von Membranbegasung und Biofilmbildung können die Stoffströme gezielt auf den Bedarf der Mikroalgen ausgelegt und ohne hohe Druckunterschiede zugeführt werden. Die

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

konsequente Durchführung dieses Konzepts führt zu einem geringeren Energiebedarf des Reaktors. Der konstruierte Biofilm-Reaktor hat eine vergleichsweise sehr geringe Betriebsleistung (s. Abschnitt 6.2), die nach der theoretischen Berechnung dem Kriterium einer positiven Netto-Energie-Bilanz entspricht [14, 110].

Wie wichtig eine homogene Verteilung des Lichts in einem Photobioreaktor ist, wird in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Die Kultivierung der Algen in dem konstruierten Reaktor belegt, dass die Etablierung eines Biofilms mit dem eine annähernd vollständige Absorption des einfallenden Sonnenlichts möglich ist. Die Immobilisierung der Algen führt jedoch zu der Ausbildung eines Lichtgradienten über die Tiefe des Reaktors (s. adaptierter Ansatz von Lambert-Beer in Gleichung 2.11). Da die Algen aufgrund der geringen Durchmischung in dem Biofilm stationär vorliegen, ist eine homogene Lichtverteilung über die Reaktortiefe besonders wichtig. Verschiedene Ansätze zur Homogenisierung der Lichtintensität über die Reaktortiefe werden in der Literatur beschrieben (s. Abschnitt 2.2.1). Die Nutzung von transparenten Strukturen, die das Oberfläche- zu Volumenverhältnis des Reaktors erhöhen und das Licht über die Reaktortiefe „verdünnen“, wurden von Jacobi et al. [102] betrachtet. Die bisherige Herstellung der beschriebenen Strukturen ist aufgrund des eingesetzten Materials (Glas) und der Fertigungstechnik (Replikatechnik, Beschichtung mit Polyurethan-Schäumen von maximal 10 ppi mit einer Glassuspension [199]) in Hinsicht der Geometrie begrenzt [200]. Deshalb können sie nicht optimal ausgelegt werden. Der Einsatz von alternativen Materialien greift das geschilderte Konzept der bisherigen lichtleitenden Einbauten auf und verbessert den Lichteintrag durch eine homogenere Verteilung über die Reaktortiefe. Dazu werden die Poren der Einbauten vergrößert und ein besserer Lichtübergang von Reaktoroberfläche zur Struktur ermöglicht. Ein Materialscreen zeigt, dass Silikon für den Einsatz in Photobioreaktoren sehr gut geeignet ist. Zwar ist der Brechungsindex nicht optimal, um eine vollständige Brechung des Lichts in die Kugel zu gewährleisten, jedoch wurde durch Einbau einer zweiten Kugelreihe eine weitere Lichtverdünnung erreicht. In vergleichenden Kultivierungen im Mini-Plattenreaktor mit und ohne die konstruierten lichtleitenden Einbauten wurde das Konzept auf Effizienz getestet. Bei geringen Biomassekonzentrationen absorbiert der Reaktor mit den transparenten Einbauten mehr Licht. Diese erhöhte Streuung innerhalb des Reaktors ist konsistent zu Messungen in Wasser ohne Zellen (s. Abbildung 6.3a). Durch die erhöhte Streuung kann die Wachstumsrate in dem Reaktor um ca. 15 % gesteigert werden. Weiterhin wurde die im lichtlimitierten Bereich gemessene PCE durch den Einsatz der lichtleitenden Einbauten bei hohen Zelldichten um den Faktor 1,7 erhöht. Dies deutet auf eine bessere Verteilung des Lichts in dem Reaktor hin. Für die Kultivierung von Biofilmen mit höheren Biomassekonzentrationen muss eine weitere Verringerung des Durchmessers der abgeformten Kugeln erfolgen. Die Anfertigung von

6. Entwicklung eines Biofilmreaktors für die Produktion von Glycolat

Testkörpern zeigt die prinzipielle Machbarkeit der Herstellung von transparenten Einbauten mit der Replikatechnik. Der Anteil des gestreuten Lichts nimmt mit abnehmenden Durchmesser der abgeformten Kugeln zu, wie Messungen ergeben (s. Abbildung 6.3a).

7. Zusammenfassung und Ausblick

Mikroalgen stellen eine vielversprechende Quelle erneuerbarer Energieträger dar. Durch ein innovatives kontinuierliches Konzept zur Produktion von Biogas mittels Mikroalgen soll der Wirkungsgrad der Produktion weiter gesteigert werden. Das Konzept zielt auf die Verstoffwechslung des exkretierbaren Metaboliten Glycolat anstelle der gesamten Biomasse. Die Produktion von Glycolat wurde in bisherigen Arbeiten nur in kurzzeitigen Experimenten über wenige Stunden induziert. Die anschließend vom Organismus ausgebildeten Stoffwechselwege der Kohlenstoffakkumulation und der Glycolatwiederverwertung verhindern eine weitere Bildung bzw. Exkretion von Glycolat. Die Ergebnisse der Ermittlung der CO_2 -Abhängigkeit der Wachstums- und Glycolatproduktionsrate in dieser Arbeit zeigen, dass eine kontinuierliche Produktion mit einem Wildtypstamm nicht möglich ist. Durch die Induktion von Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismen (CCMs) verbleiben die Wachstumsraten bis zu CO_2 -Partialdrücken von 0,2 % auf einem maximalen Niveau. Dem Organismus gelingt die effektive intrazelluläre Akkumulation von CO_2 , um die Oxygenierungsreaktion des Enzyms RuBisCO zu unterdrücken. Mit der CCM-Mutante CC1860 hingegen gelingt eine kontinuierliche Exkretion von Glycolat. Aufbauend auf dieser Mutante wurde der Einfluss des O_2 - und CO_2 -Partialdrucks in Batch-Experimenten über einen Zeitraum von etwa 48 h nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen eine erhöhte Bildungsrate von Glycolat in ungefähr den ersten 20 Stunden. Nach dieser Zeit geht die spezifische Bildungsrate auf einen niedrigeren Wert zurück. Veränderungen im Organismus durch die Ausbildung von Stoffwechselwegen oder die Verstoffwechslung von Speicherstoffen innerhalb dieses Zeitraums lassen nur bedingt Aussagen über kontinuierliche Glycolatproduktionsraten zu. Für ein besseres Prozessverständnis und zur Auslegung eines kontinuierlichen Prozesses wurde ein Modell der Stoffwechselwege innerhalb des Organismus erstellt. Dieses ermöglicht die exakte Bilanzierung von Energie- und Stoffumsatz in dem Organismus. So sind die Kinetik des Photosystems und die vom CO_2 und O_2 -Partialdruck abhängige RuBisCO-Kinetik modellierbar. Neben bekannten Stöchiometrien von Stoff- und Energieumsatz verbleiben organismusspezifische Freiheitsgrade in Form von spezifischen Raten, kinetischen Konstanten und Ausbeutekoeffizienten, die experimentell er-

7. Zusammenfassung und Ausblick

mittelt werden müssen. Um eine exakte Bilanzierung im quasistationären Gleichgewicht zu ermöglichen, wurde ein kontinuierlich arbeitender Turbidostat in einem Modell-Reaktorsystem ausgelegt. Dieses ermöglichte die exakte Ermittlung der Abhängigkeit der Biomasse- und Glycolatbildungsraten vom CO_2/O_2 -Partialdruckverhältnis und von der Lichtintensität. Durch Regelung der optischen Dichte in dem Modellreaktor wurde über den Reaktorquerschnitt eine bestmögliche konstante Lichtintensität eingestellt. Somit sind Stoff- und Energieflüsse im Gegensatz zum Batch-Betrieb getrennt voneinander erfassbar. Durch genaue Einstellung des CO_2 - und O_2 -Partialdrucks gelang erstmalig die Quantifizierung der Energie- und Stoffströme von Photosynthese und Photorespiration im quasistationären Gleichgewicht bei exakt definierten Prozessparametern. Zu Beginn der Arbeit war es fraglich, über welchen Zeitraum der Prozess der Glycolatproduktion aufrecht erhalten werden kann, ohne dass der Organismus geschädigt wird. Durch die optimierte Prozessführung konnte gezeigt werden, dass eine Glycolatproduktion bei konstanten Bildungsraten über einen langen Zeitraum von mehreren hundert Stunden konstant ist. Die Produktionsbedingungen stellen für die Alge somit keine Stressbedingung dar. Es konnte zudem gezeigt werden, dass bis zu einer Konzentration von ca. 600 mg/l keine Produktinhibition durch toxisches Glycolat eintritt.

Die Exkretionsraten von Glycolat konnten durch den Zusatz von EZA weiter gesteigert werden. Dieser Inhibitor wird insbesondere zur Hemmung der CCMs - speziell hier der Carboanhydrasen - des Organismus eingesetzt. Bei der Kultivierung der CCM-Mutante unter Zusatz von EZA konnte keine Änderung des CO_2 -Partialdruckeinflusses auf die Carboxylierungsrate des Organismus festgestellt werden. Dies belegt zum einen, dass die CCMs in dem Organismus nachhaltig geschädigt sind. Die Ergebnisse lassen zudem auf die Inhibierung des Glycolatrecyclings durch EZA schließen. Durch den Einsatz einer CCM-Mutante sowie den Zusatz des Inhibitors EZA konnte eine Exkretionsrate in der Größenordnung der aus der RuBisCO-Kinetik des aufgereinigten Enzyms zu erwarteten Rate nachgewiesen werden. Der Einsatz des antibiotisch wirkenden und hochpreisigen EZAs steht im Widerspruch zu der Nachhaltigkeit des vorgestellten Konzepts. Eine Produktion über große Flächen schließt den Einsatz von EZA aus Umwelt- und Kostengründen aus. Eine Inhibierung des Recycling-Stoffwechselwegs des Glycolats kann über knock-down- oder knock-out-Mutationen des Schlüsselenzyms Glycolat-Dehydrogenase (GDH) erzielt werden. Werden in dem Organismus schon entwickelte GDH-Mutationen mit CCM-Mutationen kombiniert, kann auf den Zusatz von EZA verzichtet werden.

Durch die statistische Anpassung des erstellten Modells an die experimentellen Messdaten konnten die Freiheitsgrade über eine Parameteranpassung quantifiziert werden. Eine Varianzanalyse durch Berechnung der Fisher-Informationsmatrix validiert die Aussagekraft der ge-

7. Zusammenfassung und Ausblick

geschätzten Parameter durch die Ermittlung linearer Abhängigkeiten und Schätzfehler. Die Simulation der Bildungsrate zeigt, dass bei hohen CO_2 -Partialdrücken die Umsatzraten des Gesamtorganismus lichtlimitiert sind, wohingegen bei geringen CO_2 -Partialdrücken die RuBisCO-Kinetik limitierend wirkt. Die Modellierung des RuBisCO-limitierten Wachstums ermöglicht die Simulation der Abhängigkeit der Biomasse- und Glycolatbildungsrate von CO_2 - und O_2 -Partialdruck. Die Vermeidung von Biomassewachstum zugunsten der Glycolatproduktion wurde so erfolgreich umgesetzt. Das gemessene optimale Partialdruckverhältnis beträgt $p_{\text{CO}_2}/p_{\text{O}_2} = 0,2/42$ bar/bar. Die Produktionsrate von Glycolat liegt bei dem experimentell eingestellten O_2 -Partialdruck von 42 % des Gesamtdrucks im Bereich von 1/6 der Kohlenstofffixierung in Form von Biomasse. Dies ist enzymatisch bedingt, da eine langsamere Umsatzrate der Oxygenierungsreaktion sowie eine verringerte Carboxylierungsrate in Folge von geringeren CO_2 -Partialdrücken vorliegen. Eine Erhöhung des Sauerstoff-Partialdrucks auf über 42 % führt gemäß Gleichung 2.5 zu höheren Carboxylierungsraten. Die Aufnahme einer O_2 -Kinetik zeigt, dass bei O_2 -Partialdrücken von größer als 70 % des Gesamtdrucks eine Schädigung des Organismus eintritt. Das optimale Partialdruckverhältnis bedingt, dass bei Erhöhung des O_2 -Partialdrucks auf 70 % der CO_2 -Partialdruck um den gleichen Faktor zunimmt. Damit kann die Carboxylierungsrate gesteigert werden. Die Produktionsrate von Glycolat kann so um weitere 12 % erhöht werden, bis eine Schädigung des Organismus durch Sauerstoff eintritt. Zusätzlich zu den ermittelten, von den Gaspartialdrücken abhängigen, Stoffumsatzraten erlaubt die Messung der Fluoreszenz die gekoppelte Bilanzierung des Stoff- und Energieumsatzes des Organismus. Durch Einstellung der O_2 - und CO_2 -Partialdrücke zur Induktion der Glycolatbildung verringert sich die Carboxylierungsrate des Enzyms bei dem betrachteten O_2 -Partialdruck von 42 % auf etwa $r_C/r_{C,max} = 50$ % des maximalen Werts. Dies führt zu der Reduktion der Bildungsrate in dem Organismus und damit zu einem verringerten Energiebedarf. Der durch Simulation des lichtlimitierten Bereichs ermittelte Ausbeutekoeffizient der Biomassebildung in dem Organismus beträgt $Y_{X,PhProz} = 1,48$ g/mol. Der Vergleich von $Y_{X,PhProz}$ mit dem Energiebedarf der Kohlenstoffassimilation in dem Calvin-Benson-Zyklus zeigt, dass der Wirkungsgrad durch die Fixierung des Kohlenstoffs in Form von Biomasse um 75 % verringert wird, bezogen auf den Energiebedarf der Kohlenstofffixierung in Form von CH_2O -Äquivalenten. Diese 75 % stellen das theoretische Potential zur Wirkungsgradsteigerung des Prozesses durch die Vermeidung der Biomasseneubildung dar. Durch PAM-Analytik konnte nachgewiesen werden, dass die überschüssige Energie von dem Photosystem der Algen in Form von Fluoreszenz dissipiert wird. Die Ermittlung energetischer Ausbeutekoeffizienten ermöglicht die exakte Auslegung des Prozesses. Um zu verhindern, dass überschüssig eintreffende Photonenenergie als Fluoreszenz von dem Photosystem dissipiert

7. Zusammenfassung und Ausblick

wird, muss die flächenspezifische Biomasse erhöht werden. Dies geht einher mit einem höheren flächenspezifischen Erhaltungsstoffwechsel. Der ermittelte Wert dieses Erhaltungsstoffwechsels beträgt $Y_{ATP,D} \cdot r_D = 1,22 \cdot 10^{-3} \text{ mol}_{ATP}/\text{g}_X/\text{h}$. Werden der Erhaltungsstoffwechsel und die unterschiedliche Verbrennungsenthalpie der Produkte berücksichtigt, ergibt sich eine Wirkungsgrad-Steigerung des Prozesses um ca. 20 % durch die Produktion von Glycolat anstelle von Biomasse.

Eine weitere Erhöhung des Gesamtwirkungsgrads des Prozesses wurde durch die Verringerung der Hilfsenergie für den Reaktorbetrieb angestrebt. Der Vergleich der Betriebsleistung von Photobioreaktoren, die dem Stand der Technik entsprechen, zeigt, dass insbesondere die Begasungs- und Durchmischungskonzepte eine hohe Betriebsleistung bedingen. Turbulente Strömungen mit hohen Volumenströmen sowie hohe Druckgradienten resultieren in einer hohen flächenspezifischen Betriebsleistung. Das in dieser Arbeit entwickelte Konzept zielt durch die Verringerung der geförderten Volumenströme und die Einstellung einer laminaren Strömung innerhalb des Reaktors auf die Verminderung dissipierter Energie. Durch die Kultivierung im Biofilm können die Stoffströme exakt an den Bedarf der Organismen und den Austrag des gebildeten Produkts angepasst werden. Hilfsenergie für die Durchmischung zur Verhinderung von Sedimentation ist nicht notwendig. Die Einsparungen ergeben sich insbesondere durch die Nutzung einer Membran zum energieeffizienten Gasaustausch, wodurch die Überwindung des hydrostatischen Drucks einer Wassersäule nicht notwendig ist. Die Auswahl einer geeigneten Immobilisierungsmatrix führt zum erfolgreichen Rückhalt der Biomasse in dem Reaktor durch die Ausbildung eines monoseptischen Biofilms. Flächenspezifische Chlorophyllanteile von ca. $1 \text{ g}/\text{m}^2$ ermöglichen die Absorption von auf den Biofilm auftreffenden Photonen zu über 90 %. Die Verteilung der auf die Reaktoroberfläche treffenden Photonen über die Reaktortiefe ist speziell für die im Biofilm immobilisierten Algen von besonderem Interesse. Der Ansatz, lichtleitende Strukturen einzubauen, wurde daher im Rahmen dieser Arbeit aufgegriffen und weiter optimiert. Hierzu wurde eine Methodik entwickelt, um aus dem alternativen Material Silikon die Einbauten herzustellen. Die Effizienz der lichtleitenden Einbauten konnte in Suspensionskultivierungen nachgewiesen werden. Die optimierte Verteilung des Lichts wurde durch die gemessenen Transmissionswerte, die erhöhte Wachstumsrate und die PCE belegt. Eine weitere Verteilung der eintreffenden Photonen kann durch Erhöhung der spezifischen Oberfläche des Reaktors, bezogen auf die Grundfläche, erfolgen. Dies kann z.B. durch eine zackenförmige oder gewellte Faltung der Reaktoroberfläche erreicht werden [98]. Durch Übertragung der Glycolatbildung auf den Biofilmreaktor lässt sich das Konzept validieren. Die Umstellung der Prozessparameter erzielt eine kontinuierliche Produktion von Glycolat im Biofilmreaktor. Für den Einsatz im Freilandbetrieb muss die Regelung des Pro-

7. Zusammenfassung und Ausblick

zesses optimiert werden. Der im Laborbetrieb eingesetzte pH-Puffer muss, um einen wirtschaftlichen Betrieb zu gewährleisten, durch eine kostengünstigere pH-Regelung ersetzt werden. Zur Erhaltung der Partialdruckverhältnisse müssen die Stoffströme von CO₂ und O₂ den Tag/Nacht-Zyklen oder wetterbedingten Änderungen in der Einstrahlleistung angepasst werden. Die Partialdrücke der Gase in dem Gaskompartiment müssen den Umsatzraten der Algen entsprechend eingestellt werden. Diese Umsatzraten an CO₂ und O₂ sind abhängig von der flächenspezifischen Biomasse. Damit keine Energieverluste durch Fluoreszenz auftreten, muss die flächenspezifische Biomasse eingestellt werden. Diese Regelung kann mithilfe von Daten aus Fluoreszenz-Messungen erfolgen. Eine Online-Überwachung des Prozesses mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten PAM-Sonde wurde in Suspensionskultivierungen etabliert.

Eine Übertragung des Konzeptes auf Produkte geringerer Prozess-Komplexität ist denkbar. So könnte auf diese Weise die Produktion von exkretiertem flüchtigem Ethanol in einen Biofilm erfolgen. Die Produktion von Ethanol in Suspensionskultur wird in industriellem Maßstab von dem Unternehmen Algenol Biofuels (Bonita Springs, FL, USA) durchgeführt. Eine Übertragung des Konzeptes auf einen Biofilm würde die Effizienz des Prozesses weiter steigern.

8. Abstract

Microalgae are a promising source of renewable fuels. An innovative continuous concept has been presented to further increase the efficiency of biogas production. The concept aims at the fermentation of the excretable metabolite glycolate, instead of fermenting the whole biomass. Glycolate production has only been realized for short times in previous works. The induction of carbon concentrating mechanisms (CCM) and glycolate recycling prevent its further production and excretion. The results of this work prove that the continuous production of glycolate by the wildtype algae *C. reinhardtii* 11-32b is not feasible. The active accumulation of CO₂ within the cell prevents the oxygenation reaction of the enzyme RuBisCO and causes maximal biomass growth rates at CO₂ partial pressures below 0.2 % of the total pressure. Continuous glycolate production succeeds by using the CCM-mutant CC1860. Batch experiments verify the influence of O₂ and CO₂ partial pressures on RuBisCO by monitoring the growth and glycolate production rates within short time experiments of 48 h. In the first 20 h the glycolate production runs at a high specific rate. After this time, the specific rate decreases. The adaption of the organism and the metabolism of storage molecules within this time span allow only contingent conclusions regarding the continuous glycolate production. A systems biological model of photosynthesis and photorespiration has been elaborated for a better process understanding and an optimal process design. The model enables the exact balance of energy- and mass conversion within the organism. Both, the light depending kinetic of the photosystem and the CO₂ and O₂ depending kinetics of RuBisCO is implemented. The model consists of known stoichiometry of mass and energy conversion as well as organism specific degrees of freedom - such as specific rates, kinetic constants and yields - which have to be determined experimentally. For the exact balance in quasi-stationary equilibrium a continuous turbidostat system was designed in a model reactor. The experiments can be performed at a constant light intensity by regulating the optical density of the biomass suspension within the reactor. The exact determination of O₂ and CO₂ partial pressures allow the quantification of mass fluxes of photosynthesis and photorespiration in quasi-stationary equilibrium at defined process parameters. This enables the determination of CO₂ and O₂ depending biomass growth

8. Abstract

and glycolate production as well as its light dependency. Moreover, due to the continuous reactor system it was shown that the glycolate production can be maintained for several hundred hours without damaging the organism. Therefore, the algae do not experience any toxic stress whilst producing glycolate. Glycolate concentrations up to 600 mg/l do not have any toxic effect to the organism.

The excretion rates were increased by the addition of ethoxolamide (EZA). This inhibitor is known for its inhibiting effects on CCMs, especially carboanhydrases. However, reference experiments with and without EZA did not show any effect on the partial pressure dependency of the organism's carboxylation rate. This proves on the one hand the high degree of CCM inhibition in the organism CC1860. On the other hand, the results suggest an inhibiting effect of EZA on glycolate recycling. The use of a CCM mutant and the addition of the inhibitor EZA resulted in glycolate excretion rates in the order of magnitude as to be expected by experiments with the use of purified RuBisCO. The application of the antibiotic and expensive EZA is contrary to the sustainable concept of the process. An outdoor production over large areas excludes the application of EZA due to ecological and economical reasons. Instead, the inhibition of the recycling metabolism of glycolate can be realized with knock-down or knock-out mutations of the key enzyme glycolate dehydrogenases (GDH). The combination of existing GDH and CCM mutants will result in the same excretion rates as achieved with EZA.

Statistical adaption of the model to the experimental data sets determine these degrees of freedom. A variance analysis validate the informational value of the estimated parameter by determining linear dependencies within equations and errors of the estimated parameters. The simulation of the production rates demonstrate a light limitation of the organism at high CO₂ partial pressures. Contrary, at low CO₂ partial pressures the specific rates are limited by the turnover rates of the enzyme RuBisCO. Modeling of the *in situ* RuBisCO kinetics enables the simulation of the enzyme limited production rates of biomass and glycolate in dependency of CO₂ and O₂ partial pressure. The prevention of biomass growth in favor of glycolate production was successfully established. The measured optimum is in the range of $p_{\text{CO}_2}/p_{\text{O}_2} = 0.2/42$ bar/bar. At the experimental oxygen partial pressure of 42 % of the total pressure glycolate production rate is about 1/6 of the carbon assimilation rate in biomass. The low CO₂ partial pressures reduces the carbon assimilation rate of the RuBisCO. The CO₂ partial pressure can be increased by the same factor as O₂ partial pressure while maintaining the ratio of oxygenation to carboxylation but increasing the carboxylation rate (according to equation 2.5). Oxygen partial pressures above 70 % of the total pressure have been shown to affect the growth of the organism. This accounts for an increase in glycolate excretion of 12 %. The measurement

8. Abstract

of the fluorescence enables the coupled balance of mass- and energy fluxes. The reduction of the CO₂ partial pressure reduces the carboxylation rate of the enzyme RuBisCO. At partial pressures of 42 % the carboxylation rate achieves approximately $r_C/r_{C,max} = 50$ % of its maximum value. The resulting reduction of production rates cause a decreasing energy demand. A photon yield of $Y_{X,PhPorz} = 1.72 \text{ g}_X/\text{mol}_{PhPorz}$ was determined by simulation at light limited CO₂ partial pressures. The energy efficiency for the formation of biomass is decreased about 81 %, compared to the energy demand for the fixation of carbon to CH₂O-equivalents. This is the theoretical potential by using glycolate instead of the entire biomass. Higher fluorescence rates of the algal photosystem could be determined via PAM-analytic at glycolate producing conditions. The determination of energetic yields enable the process optimization in order to prevent energy dissipation by the organism. To prevent the dissipation of photon energy in form of fluorescence the area specific biomass needs to be increased, so causing a higher area specific rate of day respiration. The specific rate of day respiration was determined to a value of $Y_{ATP,DRD} = 1.22 \cdot 10^{-3} \text{ mol}_{ATP}/\text{g}_X/\text{h}$. Taking this maintenance into account, as well as the different combustion enthalpies of the products, the process efficiency can be increased up to approx. 20 % by fermentation of glycolate instead of biomass.

A further increase of the overall process efficiency is achieved by reducing the energy demand of the reactor. A comparison of the auxiliary energy demand of state of the art reactors shows that especially aeration and mixing require a high energy input. High volume fluxes of turbulent streams and high pressure gradients result in a high area specific energy input. The biofilm reactor design in this work aims at reducing volume fluxes to the actual demand of the organism. This was realized with laminar streams and low pressure gradients to decrease dissipation of energy. Due to the cultivation in a biofilm the volume fluxes can be reduced to the demand of nutrients or the production of glycolate by the algae. Auxiliary energy for mixing to prevent sedimentation is not necessary. The reduction of power input is further achieved by utilization of a membrane aeration for an efficient gas exchange. High power inputs for aeration due to hydrostatic pressures are thereby reduced. The biomass is refrained by an immobilization matrix to form a monoseptic biofilm. Measured area specific chlorophyll contents of approximately 1 g/m² absorb above 90 % of the irradiated light.

The distribution of light within the reactor is especially interesting in case of immobilized algae. Therefore the approach of light conducting structures is further improved by the use of alternative materials. A method was developed to produce light conducting structures made of silicon. The efficiency of these structures was proofed in suspended cultures by the measurement of transmission, growth rate and PCE. Further distribution of light can be achieved by increasing the surface area of the reactor referred to the ground area i.e. by a serrated de-

8. Abstract

sign [98]. The transfer of glycolate production to the biofilm reactor validated the concept. Changing the process parameters from high to low CO₂ partial pressures led to continuous glycolate production in the biofilm. For a scale up the regulation of the process has to be further optimized. The pH-buffer, used in laboratory scale, has to be displaced by a cost efficient pH-regulation. To maintain the gas partial pressures within the reactor the CO₂ and O₂ fluxes need to be regulated regarding to the momentary demand of the algae. This regulation has to comprise light fluctuation due to day/night cycles and weather. To decrease energy loss by fluorescence, the area specific biomass needs to be adapted. This regulation can be realized by measuring the fluorescence by a PAM-sensor.

Furthermore the transfer to processes of a lower regulation complexity is possible. A process for the production of volatile ethanol was established by Algenol Biofuels (Bonita Springs, FL, USA) in an industrial scale. Utilizing the algae in a biofilm instead of a suspension can further increase the process efficiency.

Anhang

A. Materialien

A.1. Zusammensetzung Medium

Tabelle mit normalem (TAP) ,modifiziertem (TAP ohne Acetat, Tris) und doppeltem Medium

Tabelle A.1.: Zusammensetzung der Phosphatlösung „p-Solution“ für das TAP-Medium

Komponente	Konzentration in g/l
K_2HPO_4	28,8
KH_2PO_4	14,4

Tabelle A.2.: Zusammensetzung der Stocklösung „TAP-Salze“ für das TAP-Medium

Komponente	Konzentration in g/l
NH_4Cl	15
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	4
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	2

A. Materialien

Tabelle A.3.: Zusammensetzung der Stocklösung der Spurenelemente für das TAP-Medium (Hutner's Trace)

Komponente	Konzentration in g/l
EDTA, disodium salt	5
H ₃ BO ₃	1,14
Zn SO ₄ · 7 H ₂ O	2,2
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,51
Fe SO ₄ · 7 H ₂ O	0,5
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,16
Cu SO ₄ · 5 H ₂ O	0,16
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	0,11

Tabelle A.4.: Zusammensetzung von n-fachem TAP bzw. TP-Medium aus den Stocklösungen

Stocklösung	Masse/Volumen für n-faches Medium		
	TAP 1-fach	TP 1-fach	TAP 2-fach
TRIS-Puffer in g/l	2,42	0	4,84
TAP Salze in ml/l	25	25	50
Phosphatlösung in µl/l	375	375	750
Spurenelementlösung in ml/l	10	10	10

B. Ergebnisse

B.1. Ergebnisse der pCO₂-Kinetik

Tabelle B.1.: Werte der CO₂-Kinetik der Wachstums- und Glycolatbildungsrate von *C. reinhardtii* CC1860 bei 42 % bzw. 16 % O₂. Die Raten wurden aufgenommen bei einer konstanten Lichtintensität von 347 μE/(m²s) im Turbidostatbetrieb.

pCO ₂	pO ₂	μ	r _{Glyc}	pCO ₂	pO ₂	μ	r _{Glyc}	r _{Glyc}
%	%	1/d	1/d	%	%	1/d	1/d	1/d
2,753	12,78	1,435	0	2,306	42	1,248	0	0
0,727	13,93	1,428	0	0,823	42	1,442	0	0
0,414	14,51	1,261	0	0,395	42	0,782	0	0
0,272	15,44		0	0,309	44,1	0,375	0	0
0,190	17,15	0,831	0,0033	0,202	44,6	0,164	0,0643	0,0845
0,150	16,84	0,429	0,0040	0,129	46,24	0	0,0568	0,0568
0,124	14,98	0,150	0,0179	0,066	46,24	0	0,0135	0,0135
0,007	17,62	0,070	0					

B.2. Ergebnisse der pO₂-Kinetik

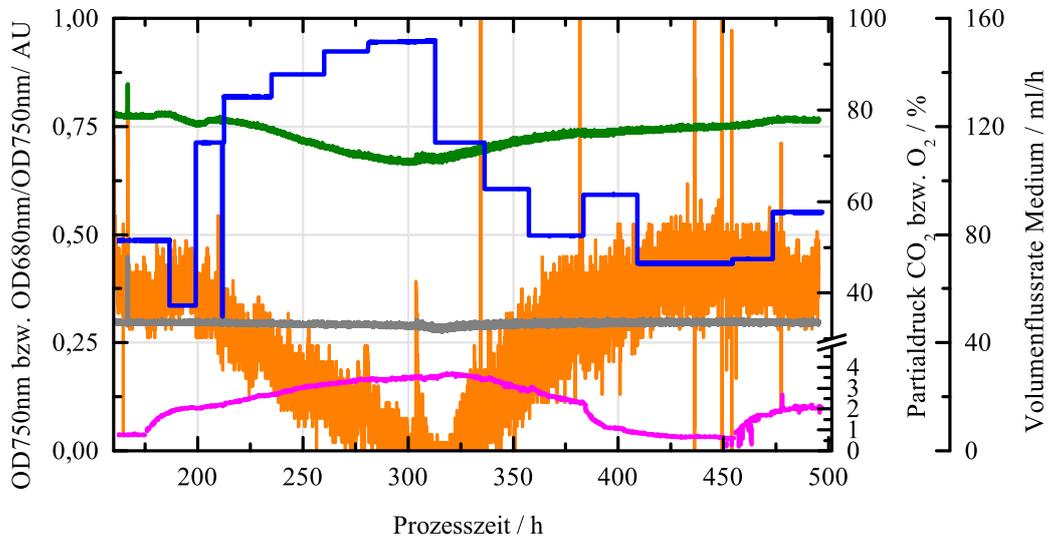


Abbildung B.1.: O₂-Abhängigkeit des Wachstums: Partialdrücke von (—) O₂ und (—) CO₂ bezogen auf den Gesamtdruck, (—) Verhältnis OD₆₈₀/OD₇₅₀ lässt auf den Abbau von Chlorophyll schließen, (—) Volumenflussrate Medium für das auf einen konstanten Wert geregelte (—) OD₇₅₀-Signal (nur P-, nicht PI-Regler)

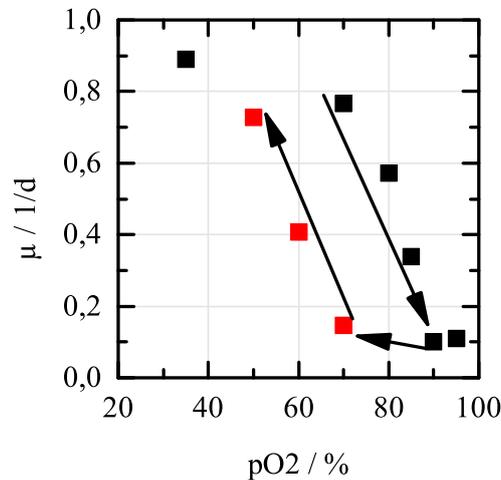


Abbildung B.2.: Wachstumsraten, bestimmt aus der Kultivierung in Abbildung B.1. Der nichtlineare Verlauf der Pumprate und die Zeitabhängigkeit der Wachstumsrate bei Erhöhung des O₂-Partialdrucks in einem Zeitraum von (■) 100 bis 300 h und (■) 300 bis 450 h lässt auf eine Messung außerhalb des quasistationären Gleichgewichts und eine langsame Schädigung des Organismus schließen.

B.3. Kurzzeitige Glycolatproduktion mit CC1860

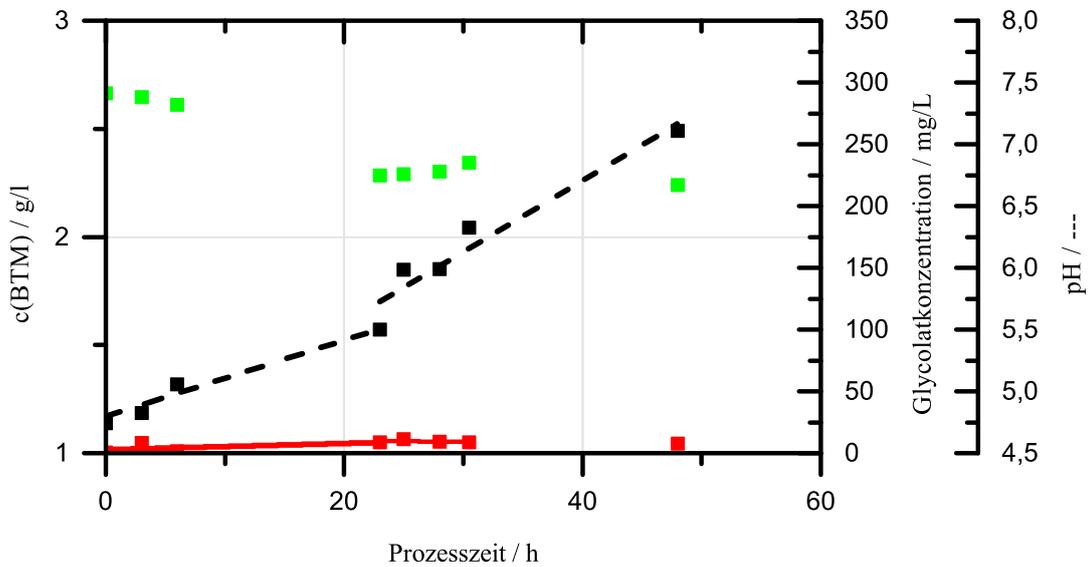


Abbildung B.3.: Kurzzeitiges Experiment in Mini-Plattenreaktor; Umstellung der Prozessbedingungen bei PZ = 0 h durch Reduktion des CO₂-Partialdrucks im Zugas auf 0,3 % und Erhöhung des O₂-Partialdrucks auf 42 % des Gesamtdrucks. Offline bestimmte (■) Glycolat-Konzentration, (■) Biomasse-Konzentration mit jeweiliger linearer Regression sowie (■) und pH-Wert.

B. Ergebnisse

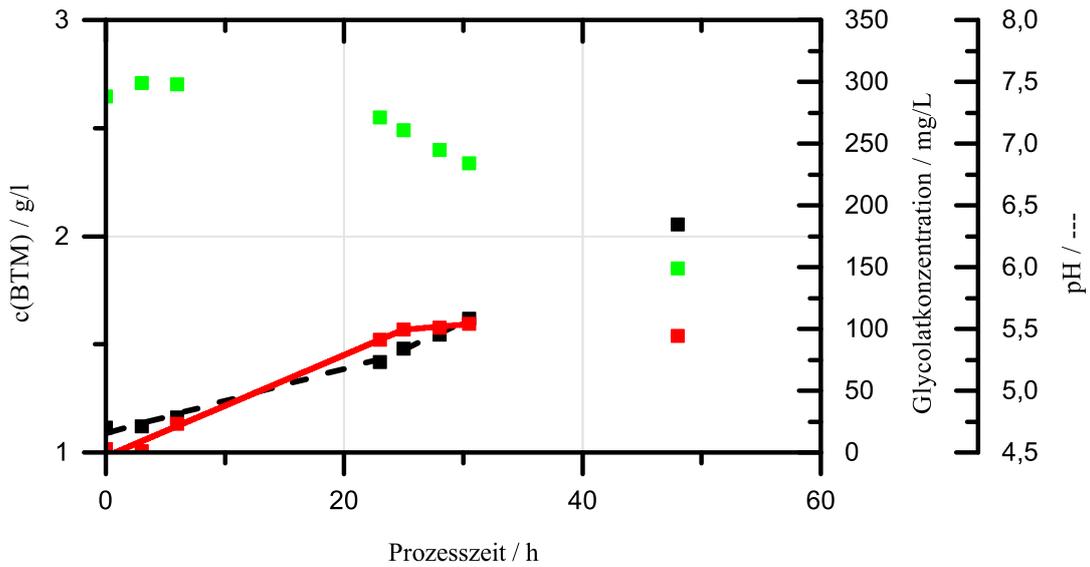


Abbildung B.4.: Kurzzeitiges Experiment in Mini-Plattenreaktor; Umstellung der Prozessbedingungen bei $PZ = 0$ h durch Reduktion des CO_2 -Partialdrucks im Zugas auf 0,2 % und Erhöhung des O_2 -Partialdrucks auf 42 % des Gesamtdrucks. Offline bestimmte (■) Glycolat-Konzentration, (■) Biomasse-Konzentration mit jeweiliger linearen Regression sowie (■) und pH-Wert.

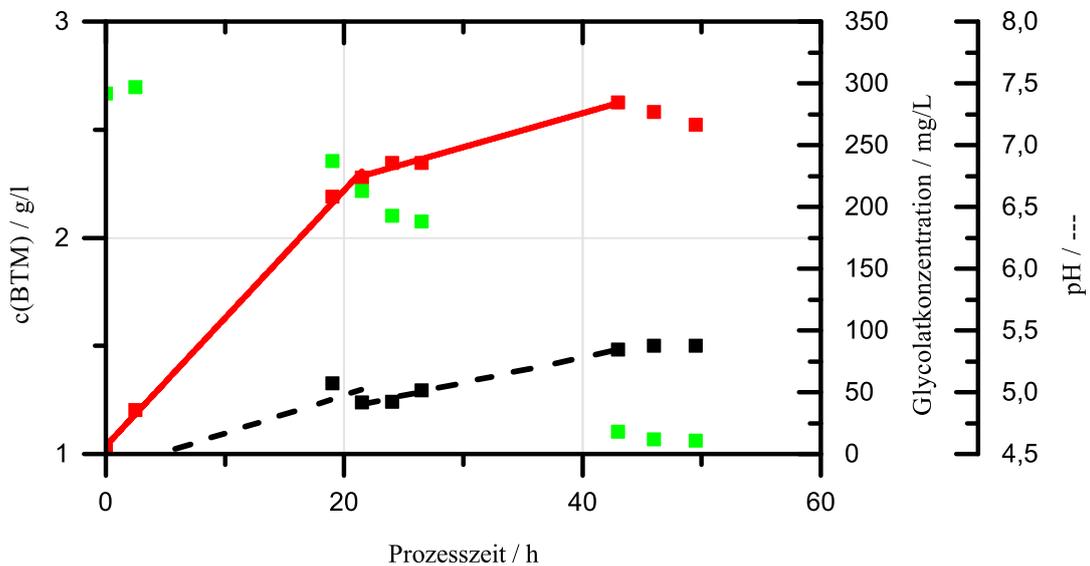


Abbildung B.5.: Kurzzeitiges Experiment in Mini-Plattenreaktor; Umstellung der Prozessbedingungen bei $PZ = 0$ h durch Reduktion des CO_2 -Partialdrucks im Zugas auf 0,1 % und Erhöhung des O_2 -Partialdrucks auf 42 % des Gesamtdrucks. Offline bestimmte (■) Glycolat-Konzentration, (■) Biomasse-Konzentration mit jeweiliger linearen Regression sowie (■) und pH-Wert.

B. Ergebnisse

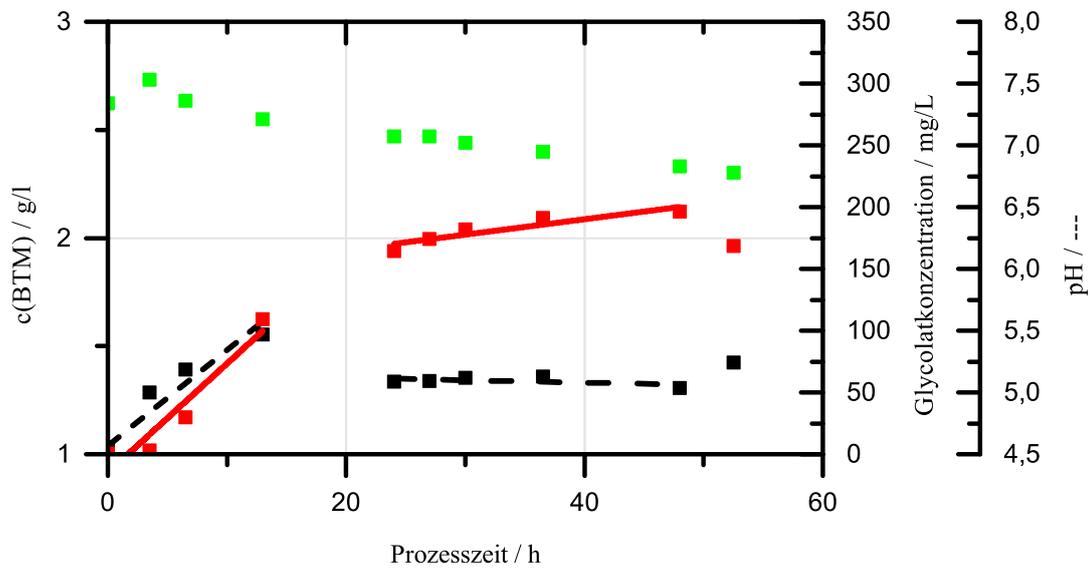
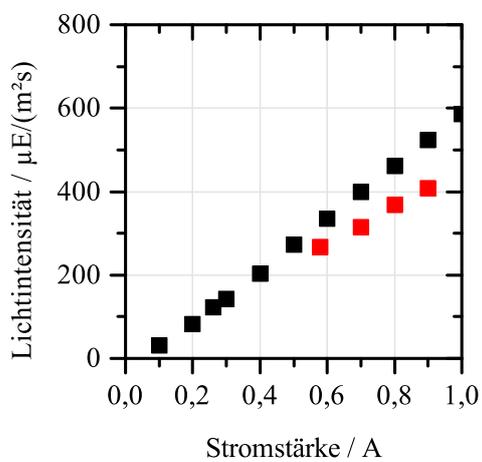


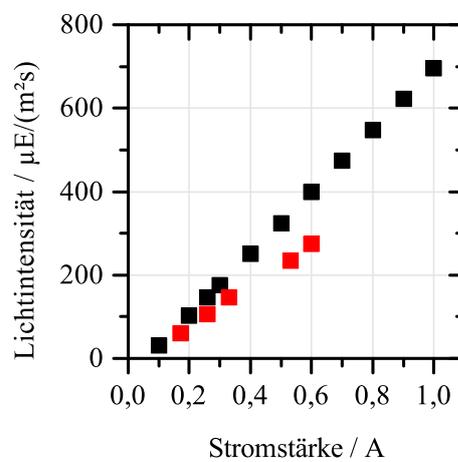
Abbildung B.6.: Kurzzeitiges Experiment in Mini-Plattenreaktor; Umstellung der Prozessbedingungen bei PZ = 0 h durch Reduktion des CO₂-Partialdrucks im Zugas auf 0,03 % und Erhöhung des O₂-Partialdrucks auf 42 % des Gesamtdrucks. Offline bestimmte (■) Glycolat-Konzentration, (■) Biomasse-Konzentration mit jeweiliger linearer Regression sowie (■) und pH-Wert.

C. Kalibrierungen

C.1. Kalibrierung der LED-Module



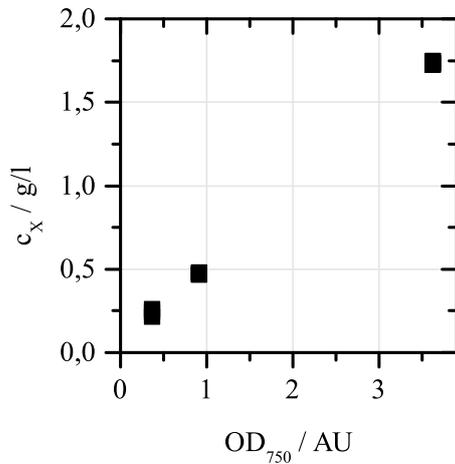
(a) BioEngineering 4



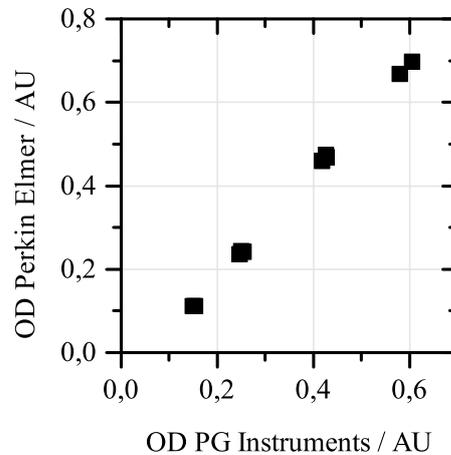
(b) BioEngineering 5

Abbildung C.1.: Kalibrierung der LED-Module mit dem (■) sphärischen Sensor (BE4: $y = 627,08x - 41,233$ mit $R^2 = 1$; BE5: $y = 741,12x - 45,495$ mit $R^2=0,9995$) und dem (■) planaren Sensor (BE4: $y = 461,11x - 5,3415$ mit $R^2 = 0,9976$; BE5: $y = 489x - 20,234$ mit $R^2 = 0,9981$)

C.2. Kalibrierung der OD-Biomassekonzentration



(a) Korrelation zwischen OD₇₅₀ und Biotrockenmasse



(b) Korrelation zwischen den Spektrometern

Abbildung C.2.: Korrelation zwischen optischer Dichte bei 750 nm (gemessen mit dem Spektrometer PG Instruments) und der gravimetrisch ermittelten Biomassekonzentration (jeweilige Dreifachbestimmung; $c_X = 0,4827 \cdot OD$ mit $R^2=0,9954$). Zudem die Korrelation zwischen zwei verschiedenen Photometern PG Instruments (T60 UV-Visible Spectrophotometer) und Perkin Elmer (Lambda 35), $OD_{PerkinElmer} = 1,2955 \cdot OD_{PGInstruments} - 0,0834$ mit $R^2=0,9998$.

D. Rechnungen

D.1. Herleitung der Reaktionskinetik der RuBisCO

Herleitung der RuBisCO-Kinetik (pers. Kommunikation Prof. C. Posten):

```
> restart;
> with(LinearAlgebra) :
> # Balance of enzyme complexes
>  $b_E := -r_{E\_ES} + r_{ES\_E} + r_{ESO\_E} + r_{ESC\_E};$ 

$$b_E := -r_{E\_ES} + r_{ES\_E} + r_{ESO\_E} + r_{ESC\_E} \quad (1)$$


```

```
>  $b_{ES} := +r_{E\_ES} - r_{ES\_E} - r_{ES\_ESO} + r_{ESO\_ES} - r_{ES\_ESC} + r_{ESC\_ES};$ 

$$b_{ES} := r_{E\_ES} - r_{ES\_E} - r_{ES\_ESO} + r_{ESO\_ES} - r_{ES\_ESC} + r_{ESC\_ES} \quad (2)$$


```

```
>  $b_{ESO} := +r_{ES\_ESO} - r_{ESO\_ES} - r_{ESO\_E};$ 

$$b_{ESO} := r_{ES\_ESO} - r_{ESO\_ES} - r_{ESO\_E} \quad (3)$$


```

```
>  $b_{ESC} := +r_{ES\_ESC} - r_{ESC\_ES} - r_{ESC\_E};$ 

$$b_{ESC} := r_{ES\_ESC} - r_{ESC\_ES} - r_{ESC\_E} \quad (4)$$


```

```
>  $erg_{E_r} := solve(\{b_E, b_{ES}, b_{ESO}, b_{ESC}\}, \{r_{E\_ES}, r_{ES\_E}, r_{ES\_ESO}, r_{ESO\_ES}, r_{ESO\_E}, r_{ES\_ESC}, r_{ESC\_ES}, r_{ESC\_E}\});$ 

$$erg_{E_r} := \{r_{ES\_E} = r_{E\_ES} - r_{ES\_ESO} + r_{ESO\_ES} - r_{ES\_ESC} + r_{ESC\_ES}, r_{E\_ES} = r_{ES\_E} + r_{ES\_ESC} - r_{ESC\_ES} - r_{ES\_ESC} + r_{ESC\_ES}, r_{ES\_ESO} = r_{ES\_E} + r_{ES\_ESC} - r_{ESC\_ES} - r_{ES\_ESC} + r_{ESC\_ES}, r_{ESO\_ES} = r_{ES\_ESO} - r_{ESO\_E} + r_{ES\_ESC} - r_{ESC\_ES} - r_{ES\_ESC} + r_{ESC\_ES}, r_{ESO\_E} = r_{ES\_ESO} - r_{ES\_ESC} + r_{ESC\_ES} - r_{ES\_ESC} + r_{ESC\_ES}\} \quad (5)$$


```

```
> #  $r_{E\_ES} \quad r_{ES\_E} \quad r_{ES\_ESO} \quad r_{ESO\_ES} \quad r_{ES\_ESC} \quad r_{ESC\_ES} \quad r_{ESO\_E} \quad r_{ESC\_E}$ 
>  $Y_E := Matrix([[ -1, +1, 0, 0, 0, 0, +1, +1], [ +1, -1, -1, +1, -1, +1, 0, 0], [0, 0, +1, -1, 0, 0, -1, 0], [0, 0, 0, 0, +1, -1, 0, -1]]);$ 

$$Y_E := \begin{bmatrix} -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & -1 \end{bmatrix} \quad (6)$$


```

```
> Rank( $Y_E$ );
3 \quad (7)
```

```
> # Kinetic equations
>  $r_{E\_ES} := k_{E\_ES} \cdot c_E \cdot c_S;$ 

$$r_{E\_ES} := k_{E\_ES} c_E c_S \quad (8)$$


```

```
>  $r_{ES\_E} := k_{ES\_E} \cdot c_{ES};$ 

$$r_{ES\_E} := k_{ES\_E} c_{ES} \quad (9)$$


```

```
>  $r_{ES\_ESO} := k_{ES\_ESO} \cdot c_{ES} \cdot c_O;$ 

$$r_{ES\_ESO} := k_{ES\_ESO} c_{ES} c_O \quad (10)$$


```

```
>  $r_{ESO\_ES} := k_{ESO\_ES} \cdot c_{ESO};$ 

$$r_{ESO\_ES} := k_{ESO\_ES} c_{ESO} \quad (11)$$


```

```
>  $r_{ES\_ESC} := k_{ES\_ESC} \cdot c_{ES} \cdot c_C;$ 

$$r_{ES\_ESC} := k_{ES\_ESC} c_{ES} c_C \quad (12)$$


```

$$r_{ES_ESC} := k_{ES_ESC} c_{ES} c_C \quad (12)$$

$$> r_{ESC_ES} := k_{ESC_ES} c_{ESC};$$

$$r_{ESC_ES} := k_{ESC_ES} c_{ESC} \quad (13)$$

$$> r_{ESO_E} := k_{ESO_E} c_{ESO};$$

$$r_{ESO_E} := k_{ESO_E} c_{ESO} \quad (14)$$

$$> r_{ESC_E} := k_{ESC_E} c_{ESC};$$

$$r_{ESC_E} := k_{ESC_E} c_{ESC} \quad (15)$$

$$> erg_{E_c} := solve(\{op(erg_{E_r}), c_E + c_{ES} + c_{ESO} + c_{ESC} = c_G\}, \{c_E, c_{ES}, c_{ESO}, c_{ESC}\});$$

>

$$> assign(erg_{E_c});$$

$$> c_E : c_{ES} : c_{ESO} : c_{ESC};$$

$$> r_S := r_{E_ES} - r_{ES_E};$$

$$> r_O := r_{ES_ESO} - r_{ESO_ES};$$

$$> r_C := r_{ES_ESC} - r_{ESC_ES};$$

$$> test := + r_S - r_O - r_C;$$

$$> simplify(test);$$

0

(16)

>

$$> r_{Smax} := limit(r_S, c_S = infinity);$$

$$r_{Smax} := (c_G (c_C k_{ESC_E} k_{ESO_E} k_{ES_ESC} + c_C k_{ESC_E} k_{ESO_ES} k_{ES_ESC} + c_O k_{ESC_E} k_{ESO_E} k_{ES_ESO} + c_O k_{ESC_ES} k_{ESO_E} k_{ES_ESO})) / (c_C k_{ESO_E} k_{ES_ESC} + c_C k_{ESO_ES} k_{ES_ESC} + c_O k_{ESC_E} k_{ES_ESO} + c_O k_{ESC_ES} k_{ES_ESO} + k_{ESC_E} k_{ESO_E} + k_{ESC_E} k_{ESO_ES} + k_{ESC_ES} k_{ESO_E} + k_{ESC_ES} k_{ESO_ES}) \quad (17)$$

$$> kz_{Smax} := coeffs(collect(numer(r_{Smax}), [c_O, c_C], 'distributed'), [c_O, c_C], z_{Smax});$$

$$kz_{Smax} := c_G (k_{ESC_E} k_{ESO_E} k_{ES_ESO} + k_{ESC_ES} k_{ESO_E} k_{ES_ESO}), c_G (k_{ESC_E} k_{ESO_E} k_{ES_ESC} + k_{ESC_E} k_{ESO_ES} k_{ES_ESC}) \quad (18)$$

$$> z_{Smax};$$

c_O, c_C

(19)

$$> kz_{Smax}[1]; kz_{Smax}[2];$$

$$c_G (k_{ESC_E} k_{ESO_E} k_{ES_ESO} + k_{ESC_ES} k_{ESO_E} k_{ES_ESO})$$

$$c_G (k_{ESC_E} k_{ESO_E} k_{ES_ESC} + k_{ESC_E} k_{ESO_ES} k_{ES_ESC})$$

(20)

$$> kn_{Smax} := coeffs(collect(denom(r_{Smax}), [c_O, c_C], 'distributed'), [c_O, c_C], n_{Smax});$$

$$kn_{Smax} := k_{ESC_E} k_{ESO_E} + k_{ESC_E} k_{ESO_ES} + k_{ESC_ES} k_{ESO_E} + k_{ESC_ES} k_{ESO_ES} k_{ESC_E} k_{ES_ESO} + k_{ESC_ES} k_{ES_ESO} k_{ESO_E} k_{ES_ESC} + k_{ESO_ES} k_{ES_ESC} \quad (21)$$

$$> n_{Smax};$$

1, c_O, c_C

(22)

$$\begin{aligned}
&> kn_{Smax}[1] : kn_{Smax}[2] : kn_{Smax}[3] : \\
&> r_{S_max} := simplify \left(r_{Smax} \left\{ \frac{kz_{Smax}[1]}{kn_{Smax}[1]} = kz_O, \frac{kz_{Smax}[2]}{kn_{Smax}[1]} = kz_C, \frac{kn_{Smax}[2]}{kn_{Smax}[1]} = kn_O, \frac{kn_{Smax}[3]}{kn_{Smax}[1]} \right. \right. \\
&\quad \left. \left. = kn_C \right\} \right); \\
&> simplify(r_{S_max}); \\
&\quad \frac{c_C kz_C + c_O kz_O}{c_C kn_C + c_O kn_O + 1} \tag{23}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&> s_{OC} := simplify \left(\frac{r_O}{r_C} \right); \\
&\quad s_{OC} := \frac{c_O k_{ES_ESO} (k_{ESC_E} + k_{ESC_ES}) k_{ESO_E}}{(k_{ESO_E} + k_{ESO_ES}) c_C k_{ES_ESC} k_{ESC_E}} \tag{24}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&> s_{OC} := simplify(s_{OC} \{k_{ES_ESO} \cdot k_{ESO_E} \cdot (k_{ESC_E} + k_{ESC_ES}) = k_O, k_{ES_ESC} \cdot k_{ESC_E} \cdot (k_{ESO_E} \\
&\quad + k_{ESO_ES}) = k_S\}); \\
&\quad s_{OC} := \frac{c_O k_O}{c_C k_S} \tag{25}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&> s_{OC} := simplify \left(s_{OC} \left\{ \frac{k_O}{k_S} = ss_{OC} \right\} \right); \\
&\quad s_{OC} := \frac{c_O ss_{OC}}{c_C} \tag{26}
\end{aligned}$$

D.2. Anpassung der kinetischen Konstanten der RuBisCO

```

% Diese Funktion ruft in einer Schleife die Funktion
% RuBisCO_parameterschaetzung und speichert die Ergebnisse

% _____Parameterschätzung der RuBisCO Kinetik_____

% Diese Funktion Ermittelt simultan die Parameter der RuBisCO Kinetik aufgrund
% der berechneten spezifischen Bildungsrate. Sie enthält die Hauptfunktion
% "RuBisCO_parameterschaetzung" und zwei Hilfsfunktionen "RuBisCO" und
% "residuals". Die Schätzung beruht auf experimentellen Raten, die aus einer
% Excel-Datei importiert werden.
% Die Funktion "RuBisCO" simuliert die Wachstums - und
% Glycolatproduktionsraten für einen bestimmten Satz an Parametern
% Das Gütefunktional "residuals" gibt den Fehler zwischen
% experimentellen und simulierten Raten wieder.
% In der Funktion "RuBisCO_parameterschaetzung" wird das Gütefunktional
% minimiert. Dieser Satz an optimierten Parametern wird als "para_opt"
% ausgegeben

function Ergebnisse = Parameterschaetzung
clear all
close all
clc
%%===== Excel-Daten einlesen =====%%
global data n_row n_col p_CO2 p_O2 exp_wachstum exp_glycolat
data = xlsread(datafilename,sheetname);
[n_row,n_col] = size(data);
p_CO2 = data(:,1); % Einlesen des Anteils an Kohlenstoffdioxid in
atm/atm
p_O2 = data(:,2); % Einlesen des Anteils an Kohlenstoffdioxid in
atm/atm
exp_wachstum = data(:,3); % Einlesen der experimentellen Wachstumsraten in
(mol/(g.h))
exp_glycolat = data(:,4); % Einlesen der experimentellen
Glycolatproduktionsraten in mol/(g.h)
% Craboxilierungsrate
exp_r_Carb = exp_wachstum + 2*exp_glycolat;
exp_r_Oxyg(i,1) = exp_glycolat(i,1);
for i=1:10
%%===== Konstanten und Startparameter ===%%
% Konstanten
global kH_O2 kH_CO2 r_Carbmax Km_Carb Km_Oxyg r_Oxygmax C_min Rd
% Henry-Koeffizienten
kH_O2 = 1.3*10^-3 ; % mol/(1 atm)
kH_CO2 = 3.4*10^-2 ; % mol/(1 atm)
% RubisCO Parameter
Km_Carb = 29*10^-6/(i^2*0.25); % mol/l - Literaturwert Km_C=29 µM aus:
Jordan and Ogren 1981
r_Carbmax = 20.9*10^-4*(i^2*0.25); % molC/(gBTM h) Daten des C-Umsatz aus
der Lichtkinetik bei 5 % CO2
Km_Oxyg = 480*10^-6/(i^2*0.25); % mol/l - Literaturwert Km_O=480 µM aus:
Jordan and Ogren 1981
r_Oxygmax = r_Carbmax/(3.7+(i^2*0.25); % VC/VO=3.7 aus: Jordan and Ogren
1981
% Organismusspezifische Konstanten
C_min = 0.09;
Rd = 0.1865*r_Carbmax;
%%===== Anzupassende Startparameter =====%%
global para0

```

```

para0 = [r_Carbmax,Km_Carb, r_Oxygmax,Km_Oxyg];
options = optimset('Display','Iter','MaxFunEvals',1e20,'TolX',1e-8,'TolFun',1e-8);
[para count exit] = fminsearch(@residuals,para0,options);
para_opt = para;

%%===== Ausgabe =====%%

if exit == 1 % Nach Ende der Minimierung ist exit == 1
    para_opt; % Satz an angepasste Parametern
    % Berechnung der Selektivität
    S = para_opt(1)/para_opt(2)*para_opt(3)/para_opt(4);
    fehler = 0; % Iteration erfolgreich
else % Im Falle eines Fehlers
    para_opt = para0;
    fehler = 1;
end
Ergebnisse (i,:) = [para_opt, S, fehler];
end

function [r_Carb,r_Oxyg] = RuBisCO (para)
% Hier werden die Wachstumsraten und Glycolatproduktionsraten nach einer
adaptierten RuBisCO-Kinetik mit dem Parametersatz „Para“ simuliert.
global n_row p_CO2 p_O2 r_Carbmax Km_Carb Km_Oxyg r_Oxygmax C_min kH_O2
kH_CO2 r_Carb r_Oxyg Rd
for i = 1:n_row
%Berechnug der RuBisCO Raten mit nur Zwei unabhängige Parametern
r_Carb(i,1) = r_Carbmax * ((p_CO2(i,1)-C_min)/100)* kH_CO2 / (((p_CO2(i,1)-C_min)/100)*kH_CO2 + Km_Carb * (1+ (p_O2(i,1)/100) * kH_O2 /Km_Oxyg)); % mol_C/(g_BTM h)
r_Oxyg(i,1) = r_Oxygmax * (p_O2(i,1)/100) * kH_O2 / ((p_O2(i,1)/100) *kH_O2 + Km_Oxyg * (1+ ((p_CO2(i,1)-C_min)/100)* kH_CO2/Km_Carb)); % mol_O/(g_BTM h)
end

function functional = residuals(para)
%%====Rechnung der Varianz sigma=====%%
r = 0.1; % Annahme eines relativen Fehlers von 10 %
% Sigma für das Wachstum
r_Carb_min = exp_r_Carb(5,1);
sigma_r_Carb = r*sim_r_Carb + r*r_Carb_min;
% Sigma für die Glycolat Produktion
r_Oxyg_min = 1e-4;
%sigma_r_Oxyg = r*max(exp_r_Oxyg,r_Oxyg_min);
sigma_r_Oxyg = r*exp_r_Oxyg + r*r_Oxyg_min;
%%====Berechnung des Gütefunktional=====%%
res_r_Carb = (exp_r_Carb - sim_r_Carb)./sigma_r_Carb;
res_r_Oxyg = (exp_r_Oxyg - sim_r_Oxyg)./sigma_r_Oxyg;
functional = sum(sum(res_r_Carb.^2))+ sum(sum(res_r_Oxyg.^2));

```

**D.3. Parameteranpassung der
Photosynthese/Photorespiration (gekoppelte
Licht- und RuBisCO-Kinetik)**

```

% Beschreibung der Funktion:
% Allgemeine Beschreibung: Die Funktion 'Stoechiometrie_simulink' beinhaltet
% die Matrix zur Beschreibung der Organismus-Stöchiometrie sowie deren
% Lösungsalgorithmus.
% Eingangsgrößen (u): Phy und r_s bzw. r_Photonabs aus kinetik_RuBP_RuBisCO

function [sys,x0,str,ts] = Metabolismus(t,x,u,flag,Rd,W, y_ATPX, y_ATPrd,
                                     y_ATPPhNZ, y_ATPPhZ);
switch flag,
    case 0,
        [sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(Rd,W, y_ATPX, y_ATPrd, y_ATPPhNZ,
        y_ATPPhZ);
    case 3,
        sys=mdlOutputs(t,x,u,Rd,W, y_ATPX, y_ATPrd, y_ATPPhNZ, y_ATPPhZ);
    case { 1, 2, 4, 9}; %unused flags
    otherwise
        error(['Unhandled flag = ',num2str(flag)]);
end

function [sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(rD ,rR, y_ATPX, y_ATPrd,
y_ATPPhNZ, y_ATPPhZ);
sizes = simsizes;
sizes.NumContStates = 0;
sizes.NumDiscStates = 0;
sizes.NumOutputs = 25;
sizes.NumInputs = 6;
sizes.DirFeedthrough = 1;
sizes.NumSampleTimes = 1
sys = simsizes(sizes);
x0 = [];
str = [];
ts = [0 0];

function sys=mdlOutputs(t,x,u, rD ,rR, y_ATPX, y_ATPrd, y_ATPPhNZ, y_ATPPhZ);
% Einlesen der relevanten Größen aus Kinetik_RuBP_RuBisCO und Reaktorblock
i_spez = u(5);
r_Photonabs = u(6);
Phy = u(3);
r_RuBP_regen = u(2);
p_CO2 = u(1);

%% (1)=====Stöchiometrisches Modell der Zelle=====
% In der Folgenden Matrix A wird die Stöchiometrie des Organismus
% beschrieben. Die Gleichungen hierzu können dem entsprechenden Kapitel
% entnommen werden. Die Nummerierung des Vektors mit den jeweiligen
% spezifischen Bildungsraten ist nachfolgend aufgeführt.

% Bestimmung von rR:
r_O= r_RuBP_regen/(1+1/Phy);
if W > r_O
    W = r_O;
end

```

```

% Stöchiometrische Matrix Aeq; Aufbau des entsprechenden Vektors mit den
% spezifischen Raten:
% (1) r_RuBP_regen, (2) r_RuBP_carb , (3) r_RuBP_oxyg, (4) r_CO2, (5) r_O2,
% (6) r_glycerat_carb, (7) r_glycerat_oxyg, (8) r_glycolat_oxyg,
% (9) r_glycerat, (10) r_fixierung, (11) r_X, (12) r_Glyc, (13) r_Ph,
% (14) r_Phdis, (15) r_Phabs, (16) r_ATP, (17) r_PhZ, (18) r_PhNZ,
% (19) r_NADPH, 20 (r_R), (21) r_D

```

```

Aeq = [
0   Phy*5   -5   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0
0   0
5   -5   -5   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0
0
0   1   0   -1   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0
0
0   5   0   1   0   -3   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0
0
0   0   0   0   -1   0   0   1   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0
0
0   0   1   0   0   0   -1   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0
0
0   0   1   0   0   0   0   -1   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0
0
-5   0   0   0   0   0   0   0   0   3   -1   0   0   0   0   0   0   0   0
0
0   0   0   0   0   0   -3   -3   0   3   0   0   0   0   0   0   0   0   0   -
3/2   0
0   0   0   0   0   0   0   0   -2   0   0   0   2   0   0   0   0   0   0   2
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   0   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   0   0   1   -1   -1   0   0
0
0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   1   0   -1   -1
0
0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   1   -y_ATPPhZ/4 -
y_ATPPhNZ/4   0   0   0
0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   -1/4   1
0   0
1   0   0   0   0   0   0   0   0   1   0   1/y_ATPX   0   0   0   0   -1   0   0
0   1.166666667   y_ATPrd
0   0   0   0   0   0   0   0   0   1   -(1)   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   0   0   -1   1
0
0   0   0   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   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0   0
1];

```

```

beq      = zeros(21, 1);
beq(11,1)= i_spez;
beq(12,1)= r_Photonabs;
beq(20,1)= r_R;
beq(21,1)= r_D;

```

```

% Lösen des Gleichungssystems
tol = 1e-10;
maxit = 100;
[Xopt, flag, residuals]=lsqnonneg(Aeq, beq);

% Ausgabe der Raten an den Reaktor-Block
r_N      = 0;
r_X      = Xopt(11,1);
r_Glyc   = Xopt(12,1);
r_PhDiss = Xopt(14,1);
r_PhAbs  = Xopt(15,1);

sys(1)   = r_N;      %Weitergeben von r_N in mol/(g.h)
sys(2)   = r_X;      %Weitergeben von r_X in mol/(g.h)
sys(3)   = r_Glyc;  %Weitergeben von r_Glyc in mol/(g.h)

%Beschreibung der Funktion:
%   In der Funktion Reaktor_simulink werden die Bildungsrate von Glycolat und
%   Biomasse sowie die Aufnahme rate des Stickstoffs integriert.
%   ZUSTANDSGRÖßEN:
%       y(1): Stickstoffkonzentration
%       y(2): Biomassekonzentration
%       y(3): Glycolatkonzentration
%   Die spezifischen Raten werden durch die Weiterleitung der Konzentrationen
%   (BTM, Glycolat, N) und Gas-Partialdrücke (O2 und CO2) an die Funktion
%   Stöchiometrie berechnet.
function [sys,x0,str,ts] = Reaktor_simulink(t,x,u,flag,c_N0,c_X0,c_Glyc0);
switch flag,
    case 0,
        [sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(c_N0,c_X0,c_Glyc0, a);
    case 1,
        sys=mdlDerivatives(t,x,u,c_N0,c_X0,c_Glyc0, a);
    case 2,
        sys = mdlUpdate(t,x,u,c_N0,c_X0,c_Glyc0, a);
    case 3,
        sys=mdlOutputs(t,x,u,c_N0,c_X0,c_Glyc0, a);
    case {2, 4, 9}; %unused flags
    otherwise
        error(['Unhandled flag = ',num2str(flag)]);
end

function [sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(c_N0,c_X0,c_Glyc0);
sizes = simsizes;
sizes.NumContStates = 3;
sizes.NumDiscStates = 0;
sizes.NumOutputs = 5;
sizes.NumInputs = 6;
sizes.DirFeedthrough = 1;
sizes.NumSampleTimes = 1;
sys = simsizes(sizes);
x0 = [c_N0;c_X0;c_Glyc0];
str = [];
ts = [0 0];

```

```

function sys=mdlDerivatives(t,x,u,c_N0,c_X0,c_Glyc0);
% Reaktorbeschreibung
V_Reaktor = 1.7; % L
e_XC = 0.5; % g/g
M_Glycolat = 76.05; % g/mol
M_C = 12; % g/mol
% Einlesen der Bildungsraten (mol/gX.h) aus dem Metabolismus-Block und
% Umrechnung der Raten in g.L/(gBTM.h)
r_N = u(1)*M_C/e_XN;
r_X = u(2)/e_XC*M_C;
r_Glyc = u(3)*M_Glycolat;
%Berechnung der experimentellen Verdünnungsrate aus Medium-Fluss (ml/h)
D = u(4)/(1000*V_Reaktor); % h-1 %
% Konzentrationen und Änderungen im Reaktor
c_N = x(1); % gN/L
c_X = x(2); % gBTM/L
c_Glyc = x(3); % gGlyc/L

% Differentialgleichungen der Konzentrationsänderung dc/dt
c_Ndot = - r_N*c_X + (c_N0 -c_N)*D ; % g/(L.h)
c_Xdot = + c_X*(r_X-D) ; % gBTM/(L.h)
c_Glycdot = + r_Glyc*c_X - c_Glyc*D ; % gGlyc/(L.h)

sys(1) = c_Ndot;
sys(2) = c_Xdot;
sys(3) = c_Glycdot;

function sys=mdlUpdate(t,x,u,c_N0,c_X0,c_Glyc0);
sys = [];

function sys=mdlOutputs(t,x,u,c_N0,c_X0,c_Glyc0);
% Ausgabe zum Block Kinetik /Metabolismus
I_0 = u(5);
V_R =1.77;
A_R =0.0575*2*pi*0.3;
i_spez = I_0*A_R*60^2*10^-6/x(2)/V_R;
r_PhotonAbs = u(6)*i_spez;

sys(1) = x(1); % gN/L
sys(2) = x(2); % gBTM/L
sys(3) = x(3); % gGlyc/L
sys(4) = i_spez;
sys(5) = r_PhotonAbs;

```

```

% Beschreibung der Funktion:
% Berechnung der Carboxylierungs und Oxygenierungsrate der RubisCO
% aufgrund der Partialdrücke im Reaktor.
function [sys,x0,str,ts] =
Kinetik_RuBP_RuBisCO(t,x,u,flag,r_Carbmax,Km_Carb,Km_Oxyg,r_Oxygmax,y_ATPPhoto
n,y_NADPHPhoton)
switch flag,
    case 0,
        [sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(r_Carbmax,Km_Carb,Km_Oxyg,r_Oxygmax,
y_ATPPhoton,y_NADPHPhoton,C_min);
    case 3,
        sys=mdlOutputs(t,x,u,r_Carbmax,Km_Carb,Km_Oxyg,r_Oxygmax,y_ATPPhoton,
y_NADPHPhoton,C_min);
    case { 1, 2, 4, 9}; %unused flags
    otherwise
        error(['Unhandled flag = ',num2str(flag)]);
end

function
[sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(r_Carbmax,Km_Carb,Km_Oxyg,r_Oxygmax,y_ATPPh
oton,y_NADPHPhoton);
sizes = simsizes;
sizes.NumContStates = 0;
sizes.NumDiscStates = 0;
sizes.NumOutputs = 3;
sizes.NumInputs = 2;
sizes.DirFeedthrough = 1;
sizes.NumSampleTimes = 1;
sys = simsizes(sizes);
x0 = [];
str = [];
ts = [0 0];

function
sys=mdlOutputs(t,x,u,r_Carbmax,Km_Carb,Km_Oxyg,r_Oxygmax,y_ATPPhoton,y_NADPHPh
oton);
%% =====RubisCO Kinetik=====
% Definition der Henry-Konstanten
kH_O2 = 1.3E-3;
kH_CO2 = 3.4E-2;
% Einlesen der Gasanteile
% Rechnung im mol.L-1
p_CO2 = u(2)/100 * kH_CO2; % gelöst CO2 in der Zelle (mol.L-1)
p_O2 = u(1)/100 * kH_O2; % gelöst O2 in der Zelle (mol.L-1)
% RuBisCO Raten
r_Carb = r_Carbmax * p_CO2 / (p_CO2 + Km_Carb * ( 1+ p_O2 / Km_Oxyg));
% mol_C/(g_BTM h)
r_Oxygmax = r_Carbmax/3.7; % mol_C/(g_BTM h)
r_Oxyg = r_Oxygmax * p_O2 / (p_O2 + Km_Oxyg * ( 1+ p_CO2 /Km_Carb));
% mol_O/(g_BTM h)
Phy = r_Oxygmax/r_Carbmax*Km_Carb/Km_Oxyg*p_O2/p_CO2;
% Verbrauch an RuBP durch RuBisCO
r_RuBP_RuBisCO= r_Carb + r_Oxyg;

%=====Weitergabe zum Metabolismus=====
sys(1) = p_CO2;
sys(2) = r_RuBP_RuBisCO;
sys(3) = Phy;

```

**D.4. Parameteranpassung der
Photosynthese/Photorespiration (nur
RuBisCO-Kinetik)**

```

% Beschreibung der Funktion:
% Allgemeine Beschreibung: Die Funktion 'Stoichiometrie_simulink'
% beinhaltet die Matrix zur Beschreibung der Organismus-Stöchiometrie sowie
% deren Lösungsalgorithmus.
% Eingangsgrößen (u): Phy und r_s aus kinetik_RuBP_RuBisCO

```

```

function [sys,x0,str,ts] = Metabolismus(t,x,u,flag,rD,rR);
switch flag,
    case 0,
        [sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(rD,rR);
    case 3,
        sys=mdlOutputs(t,x,u,rD,rR);
        case { 1, 2, 4, 9}; %unused flags
    otherwise
        error(['Unhandled flag = ',num2str(flag)]);
end

```

```

function [sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(rD,rR);
global n
sizes.NumContStates = 0;
sizes.NumDiscStates = 0;
sizes.NumOutputs = 19;
sizes.NumInputs = 3;
sizes.DirFeedthrough = 1;
sizes.NumSampleTimes = 1;
sys = simsizes(sizes);
x0 = [];
str = [];
ts = [0 0];

```

```

function sys=mdlOutputs(t,x,u,rD,rR);
% Einlesen der Ergebnisse aus Kinetik-Funktion:
Phy = u(3);
r_RuBP_regen = u(2);
% Kinetik der Wiederverwertung von Glycolat: Maximale Umsatzrate ist rW
r_O = r_RuBP_regen/(1+1/Phy);
if rR > r_O
    rR = r_O;
end

```

```

%% =====Stöchiometrisches Modell der Zelle=====
% In der Folgenden Matrix A wird die Stöchiometrie des Organismus
% beschrieben. Die Gleichungen hierzu können dem entsprechenden Kapitel
% entnommen werden. Die Nummerierung des Vektors mit den jeweiligen
% spezifischen Bildungsrate ist nachfolgend aufgeführt.

```

```

Aeq = [
    1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
    0 5*Phy -5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
    5 -5 -5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
    0 1 0 -1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
    0 5 0 1 0 -3 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
    0 0 0 0 -1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
    0 0 1 0 0 0 -1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
    0 0 1 0 0 0 0 -1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
    -5 0 0 0 0 0 0 0 3 -1 0 0 0 0 0 0 0 0 0
    0 0 0 0 0 -3 -3 0 3 0 0 0 -3/2 0 0 0 0 0
    0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 -1 0 0 -1 0 0 0 0
    0 0 0 0 0 0 0 -2 0 0 0 2 2 0 0 0 0 0
    1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0.875 0 -1 0 0
    0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 -1
    0 0 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

```

```

] ;
% Vektor mit spezifischen Bildungsraten:
% (1) rRuBP,regen, (2) rRuBP, Carb, (3) rRuBP, Oxyg, (4) rCO2, (5) rO2, (6)
% rCarb, Glycerat, (7) roxyg,Glycerat, (8) roxyg,Glycolat, (9) rGlycerat,
% (10) rFixierung, (11) rX, (12) rGlycolat, (13) rR, (14) rD, (15) rATP,
% (16) rNADPH

beq      = zeros(16, 1);
beq(1,1) = u(2);
beq(15,1) = r_R;
beq(16,1) = r_D;

% Lösen des Gleichungssystems
tol      = 1e-10;
maxit    = 100;
[Xopt, flag, residuals] = lsqr(Aeq, beq, tol, maxit);

% Ausgabe der Raten an den Reaktorblock
r_N      = 0;
r_X      = Xopt(11,1);
r_Glyc   = Xopt(12,1);

sys(1) = r_N;      % Weitergabe von r_N in mol/(g.h)
sys(2) = r_X;      % Weitergabe von r_X in mol/(g.h)
sys(3) = r_Glyc;  % Weitergabe von r_Glyc in mol/(g.h)

%Beschreibung der Funktion:
% In der Funktion Reaktor_simulink werden die Bildungsraten von Glycolat
und
% Biomasse sowie die Aufnahme rate des Stickstoffs integriert.
% Zustandsgrößen:
% y(1): Stickstoffkonzentration
% y(2): Biomassekonzentration
% y(3): Glycolatkonzentration
% Die spezifischen Raten werden durch die Weiterleitung der Konzentrationen
% (BTM, Glycolat, N) und Gas-Partialdrücke (O2 und CO2) an die Funktion
% Stöchiometrie berechnet.
function [sys,x0,str,ts] = Reaktor_simulink(t,x,u,flag,c_N0,c_X0,c_Glyc0);
switch flag,
    case 0,
        [sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(c_N0,c_X0,c_Glyc0);
    case 1,
        sys=mdlDerivatives(t,x,u,c_N0,c_X0,c_Glyc0);
    case 2,
        sys = mdlUpdate(t,x,u,c_N0,c_X0,c_Glyc0);
    case 3,
        sys=mdlOutputs(t,x,u,c_N0,c_X0,c_Glyc0);
    case {2, 4, 9}; %unused flags
    otherwise
        error(['Unhandled flag = ',num2str(flag)]);
end

function [sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(c_N0,c_X0,c_Glyc0);
sizes = simsizes;
sizes.NumContStates = 3;
sizes.NumDiscStates = 0;
sizes.NumOutputs = 3;
sizes.NumInputs = 4;
sizes.DirFeedthrough = 1;
sizes.NumSampleTimes = 1; % at least one sample time is needed

```

```

sys = simsizes(sizes);
x0 = [c_N0;c_X0;c_Glyc0];
str = [];
ts = [0 0];

function sys=mdlDerivatives(t,x,u,c_N0,c_X0,c_Glyc0);
% Reaktorbeschreibung
V_Reaktor = 1.7; % L
e_XC = 0.5; % g/g
M_Glycolat = 76.05; % g/mol
M_C = 12; % g/mol
% Einlesen der Bildungsraten (mol/gX.h) aus dem Metabolismus-Block und
% Umrechnung der Raten in g.L/(gBTM.h)
r_N = u(1)*M_C/e_XN;
r_X = u(2)/e_XC*M_C;
r_Glyc = u(3)*M_Glycolat;
%Berechnung der experimentellen Verdünnungsrate aus Medium-Fluss (ml/h)
D = u(4)/(1000*V_Reaktor); % h-1 %
% Konzentrationen und Änderungen im Reaktor
c_N = x(1); % gN/L
c_X = x(2); % gBTM/L
c_Glyc = x(3); % gGlyc/L

% Differentialgleichungen der Konzentrationsänderung dc/dt
c_Ndot = - r_N*c_X + (c_N0 - c_N)*D ; % g/(L.h)
c_Xdot = + c_X*(r_X-D) ; % gBTM/(L.h)
c_Glycdot = + r_Glyc*c_X - c_Glyc*D ; % gGlyc/(L.h)

sys(1) = c_Ndot;
sys(2) = c_Xdot;
sys(3) = c_Glycdot;

function sys=mdlUpdate(t,x,u,c_N0,c_X0,c_Glyc0);
sys = [];

function sys=mdlOutputs(t,x,u,c_N0,c_X0,c_Glyc0);
% Ausgabe zum Block Kinetik /Metabolismus
sys(1) = x(1); % gN/L
sys(2) = x(2); % gBTM/L
sys(3) = x(3); % gGlyc/L

% Beschreibung der Funktion:
% Berechnung der Carboxylierungs und Oxygenierungsrate der RubisCO
% aufgrund der Partialdrücke im Reaktor.

function [sys,x0,str,ts] =
Kinetik_RuBP_RuBisCO(t,x,u,flag,r_Carbmax,Km_Carb,Km_Oxyg,r_Oxygmax,y_ATPPh
oton,y_NADPHPhoton);
switch flag,
case 0,
[sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(r_Carbmax,Km_Carb,Km_Oxyg,r_Oxygma
x,y_ATPPhoton,y_NADPHPhoton);
case 3,
sys=mdlOutputs(t,x,u,r_Carbmax,Km_Carb,Km_Oxyg,r_Oxygmax,y_ATPPhoton,
y_NADPHPhoton);
case { 1, 2, 4, 9}; %unused flags
otherwise
error(['Unhandled flag = ',num2str(flag)]);
end

```

```

function
[sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(r_Carbmax,Km_Carb,Km_Oxyg,r_Oxygmax,y_AT
PPhoton,y_NADPHPhoton);
sizes = simsizes;
sizes.NumContStates = 0;
sizes.NumDiscStates = 0;
sizes.NumOutputs = 3;
sizes.NumInputs = 2;
sizes.DirFeedthrough = 1;
sizes.NumSampleTimes = 1;
sys = simsizes(sizes);
x0 = [];
str = [];
ts = [0 0];

```

```

function
sys=mdlOutputs(t,x,u,r_Carbmax,Km_Carb,Km_Oxyg,r_Oxygmax,y_ATPPhoton,y_NADP
HPhoton);
%% =====RubisCO Kinetiken=====
% Definition der Henry-Konstanten
kH_O2=1.3E-3;
kH_CO2=3.4E-2;
% Einlesen der Gasanteile
% Rechnung im mol.L-1
p_CO2 = u(2)/100 * kH_CO2; % gelöst Kohlenstoffdioxid (mol.L-1)
p_O2 = u(1)/100 * kH_O2; % gelöst Sauerstoff (mol.L-1)
%Zusammenhang zwischen Carboxylierungs und Oxygenierungsrate:
r_Oxygmax = r_Carbmax/3.7;
% RuBisCO Raten
r_Carb = r_Carbmax * p_CO2 / (p_CO2 + Km_Carb * ( 1+ p_O2 /
Km_Oxyg)); % mol_C/(g_BTM h)
r_Oxyg = r_Oxygmax * p_O2 / (p_O2 + Km_Oxyg * ( 1+ p_CO2
/Km_Carb)); % mol_O/(g_BTM h)
Phy = r_Oxygmax/r_Carbmax*Km_Carb/Km_Oxyg*p_O2/p_CO2;
% spezifische Rate an RuBP
r_RuBP, regen= r_Carb + r_Oxyg;
%=====Weitergeben zum Metabolismus=====
sys(1)= r_Carb;
sys(2)= r_RuBP, regen;
sys(3)= Phy;

```

Literaturverzeichnis

- [1] R. Rosello Sastre and C. Posten. Die vielfältige Anwendung von Mikroalgen als nachwachsende Rohstoffe. *Chemie Ingenieur Technik*, 82(11):1925–1939, 2010.
- [2] Umweltbundesamt. Anteil erneuerbarer Energien am Energieverbrauch. <http://www.umweltbundesamt.de/daten/energiebereitstellung-verbrauch/anteil-erneuerbarer-energien-am-energieverbrauch>, 04.12.2015.
- [3] Umweltbundesamt. UBA-Emissionsdaten 2014 zeigen Trendwende beim Klimaschutz. http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/381/dokumente/pi_2015_31_03_uba-emissionsdaten_2014_zeigen_trendwende_beim_klimaschutz.pdf, 31.03.2015.
- [4] European Commission. Energy: Targets by 2020 - european commission. http://ec.europa.eu/energy/renewables/targets_en.htm, 01.09.2013.
- [5] D. Graham-Rowe. Energie: Tank gegen teller. *Spektrum der Wissenschaft*, März 2012.
- [6] M. R. Tredici. Photobiology of microalgae mass cultures: Understanding the tools for the next green revolution. *Biofuels*, 1(1):143–162, 2010.
- [7] E. Stephens, I. L. Ross, J. H. Mussgnug, L. D. Wagner, M. A. Borowitzka, C. Posten, O. Kruse, and B. Hankamer. Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends in Plant Science*, 15(10):554–564, 2010.
- [8] G. Schaub and A. Vetter. Biofuels for automobiles an overview. *Chemical Engineering & Technology*, 31(5):721–729, 2008.
- [9] E. Waltz. Biotech’s green gold? *Nature Biotechnology*, 27(1):15–18, 2009.
- [10] H. C. Greenwell, L. M. L. Laurens, R. J. Shields, R. W. Lovitt, and K. J. Flynn. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of The Royal Society Interface*, pages 1742–5662, 2009.

- [11] E. Stephens, I. L. Ross, Z. King, J. H. Mussnug, O. Kruse, C. Posten, M. A. Borowitzka, and B. Hankamer. Biotech's green gold? Correspondence: An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. *Nature Biotechnology*, 28(2):126–128, 2010.
- [12] R. E. Blankenship, D. M. Tiede, J. Barber, . W. Brudvig, G. Fleming, M. Ghirardi, M. R. Gunner, W. Junge, D. M. Kramer, A. Melis, T. A. Moore, C. C. Moser, D. G. Nocera, A. J. Nozik, D. R. Ort, W. W. Parson, R. C. Prince, and R. T. Sayre. Comparing photosynthetic and photovoltaic efficiencies and recognizing the potential for improvement. *Science*, 332(6031):805–809, 2011.
- [13] J. Spruijt, R. Schipperus, and M. Kootstra. Algaeconomics: bio-economic production models of micro-algae and downstream processing to produce bio energy carriers: Public output report of the enalgae project. page C.
- [14] C. Posten. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences, Engineering in Life Sciences*, 9(3):165–177, 2009.
- [15] R. H. Wijffels, M. J. Barbosa, and M. H. M. Eppink. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4(3):287–295, 2010.
- [16] D. E. Robertson, S. A. Jacobson, F. Morgan, D. Berry, G. M. Church, and N. B. Afeyan. A new dawn for industrial photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 107(3):269–277, 2011.
- [17] E. A. Ehimen, Z. F. Sun, and C. G. Carrington. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel*, 89(3):677–684, 2010.
- [18] M. Fresewinkel, R. Rosello, C. Wilhelm, O. Kruse, B. Hankamer, and C. Posten. Integration in microalgal bioprocess development: Design of efficient, sustainable, and economic processes. *Engineering in Life Sciences*, pages 560–573, 2014.
- [19] C. Wilhelm. The biological perspective ideas from new green chemistry concepts for improving the performance of microalgae. *Technikfolgenabschätzung Theorie und Praxis*, 21(1):46–53, 2012.
- [20] E. Molina Grima, E.-H Belarbi, F.G Acién Fernández, A. Robles Medina, and Yusuf Chisti. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20(7–8):491–515, 2003.

- [21] W. A. Laing, W. L. Ogren, and R. H. Hageman. Regulation of soybean net photosynthetic CO₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂, and ribulose 1,5-diphosphate carboxylase. *Plant Physiology*, 54(5):678–685, 1974.
- [22] G. D. Farquhar, S. von Caemmerer, and J. A. Berry. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta*, 149(1):78–90, 1980.
- [23] W. L. Ogren. Affixing the O to Rubisco: discovering the source of photorespiratory glycolate and its regulation: Photosynthesis Research. *Photosynthesis Research*, 76(1-3):53–63, 2003.
- [24] S. v. Caemmerer and J. R. Evans. Enhancing C₃ Photosynthesis. *Plant Physiology*, 154(2):589–592, 2010.
- [25] C. Peterhansel, K. Krause, H.-P. Braun, G. S. Espie, A. R. Fernie, D. T. Hanson, O. Keech, V. G. Maurino, M. Mielewczik, and R. F. Sage. Engineering photorespiration: current state and future possibilities. *Plant Biology*, 15(4):754–758, 2013.
- [26] C. Vílchez, I. Garbayo, M. V. Lobato, and J. Vega.
- [27] A. Jacobi, E. C. Bucharsky, and K. G. Schell. The application of transparent glass sponge for improvement of light distribution in photobioreactors. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 2(1), 2012.
- [28] F. R. Tabita, S. Satagopan, T. E. Hanson, N. E. Kreel, and S. S. Scott. Distinct form i, ii, iii, and iv rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about rubisco evolution and structure/function relationships. *Journal of experimental botany*, 59(7):1515–1524, 2008.
- [29] I. Andersson and A. Backlund. Structure and function of rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3):275–291, 2008.
- [30] R. J. Spreitzer and M. E. Salvucci. Rubisco: Structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1):449–475, 2002.
- [31] K. H. Suss, I. Prokhorenko, and K. Adler. *In situ* association of calvin cycle enzymes, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, ferredoxin-NADP⁺ reductase, and nitrite reductase with thylakoid and pyrenoid membranes of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as revealed by immunoelectron microscopy. *Plant Physiology*, 107(4):1387–1397, 1995.

- [32] E. Morita, H. Kuroiwa, T. Kuroiwa, and H. Nozaki. High localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the pyrenoids of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) as revealed by cryofixation and immunogold electron microscopy. *Journal of Phycology*, 33(1):68–72, 1997.
- [33] O. N. Borkhsenius, C. B. Mason, and J. V. Moroney. The intracellular localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 116(4):1585–1591, 1998.
- [34] M. E. Salvucci and W. L. Ogren. The mechanism of rubisco activase: Insights from studies of the properties and structure of the enzyme. *Photosynthesis Research*, 47(1):1–11, 1996.
- [35] W. Wallace Cleland, T. John Andrews, Steven Gutteridge, Fred C. Hartman, and George H. Lorimer. Mechanism of rubisco: The carbamate as general base. *Chemical Reviews*, 98(2):549–562, 1998.
- [36] N. Zhang and A. R. Portis. Mechanism of light regulation of rubisco: A specific role for the larger rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16):9438–9443, 1999.
- [37] N. Zhang, R. P. Kallis, R. G. Ewy, and A. R. Portis. Light modulation of rubisco in arabidopsis requires a capacity for redox regulation of the larger rubisco activase isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5):3330–3334, 2002.
- [38] W. Yamori, C. Masumoto, H. Fukayama, and A. Makino. Rubisco activase is a key regulator of non-steady-state photosynthesis at any leaf temperature and, to a lesser extent, of steady-state photosynthesis at high temperature. *The Plant Journal*, 71(6):871–880, 2012.
- [39] G. Tcherkez. Modelling the reaction mechanism of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and consequences for kinetic parameters. *Plant, Cell & Environment*, 36(9):1586–1596, 2013.
- [40] S. von Caemmerer. *Biochemical Models of Leaf Photosynthesis*. CSIRO publishing, Collingwood, 2000.
- [41] D. B. Jordan and W. L. Ogren. Species variation in the specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Nature*, 291(5815):513–515, 1981.

- [42] E. H. Harris, D. B. Stern, and G. Witman. *The Chlamydomonas sourcebook*. Academic Press, Amsterdam, Boston, 2nd ed. edition, 2009.
- [43] G. G. B. Tcherkez, G. D. Farquhar, and T. J. Andrews. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose biphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(19):7246–7251, 2006.
- [44] D. B. Jordan and W. L. Ogren. Species variation in kinetic properties of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 227(2):425–433, 1983.
- [45] G. L. Zubay. *Biochemistry*. William C Brown Pub, Dubuque, IA, 4th edition, 1998.
- [46] J. Raven and J. Beardall. Carbohydrate metabolism and respiration in algae. In Anthony W. D. Larkum, Susan E. Douglas, and John A. Raven, editors, *Photosynthesis in Algae*, volume 14 of *Advances in Photosynthesis and Respiration, 1572-0233*, pages 205–224. Springer Netherlands and Imprint and Springer, Dordrecht, 2003.
- [47] X. Johnson and J. Alric. Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: Metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryotic Cell*, 12(6):776–793, 2013.
- [48] N. R. Boyle and J. A. Morgan. Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Systems Biology*, 3(1):4, 2009.
- [49] R. E. Blankenship. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. Wiley Blackwell, Chichester, 2. ed. edition, 2014.
- [50] A. M. J. Kliphuis, A. J. Klok, D. E. Martens, P. P. Lamers, M. Janssen, and R. H. Wijffels. Metabolic modeling of *Chlamydomonas reinhardtii*: energy requirements for photoautotrophic growth and maintenance. *Journal of Applied Phycology*, 24(2):253–266, 2012.
- [51] J. V. Moroney, N. E. Tolbert, and B. B. Sears. Complementation analysis of the inorganic carbon concentrating mechanism of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and General Genetics MGG*, 204(2):199–203, 1986.
- [52] J. Raven. Putting the C in phycology. *European Journal of Phycology*, 32(4):319–333, 1997.

- [53] M. H. Aboelmy and C. Peterhansel. Enzymatic characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* glycolate dehydrogenase and its nearest proteobacterial homologue. *Plant Physiology and Biochemistry*, 79:25–30, 2014.
- [54] A. Wingler, P. J. Lea, W. P. Quick, and R. C. Leegood. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402):1517–1529, 2000.
- [55] B. Tural and J. V. Moroney. Regulation of the expression of photorespiratory genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Canadian Journal of Botany*, 83(7):810–819, 2005.
- [56] R. C. Leegood, P. J. Lea, M. D. Adcock, and R. E. Häusler. The regulation and control of photorespiration. *Journal of experimental botany*, 46(special issue):1397–1414, 1995.
- [57] K. G. Spencer and R. K. Togasaki. Limitations on the utilization of glycolate by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 68(1):28–32, 1981.
- [58] B. J. Wilson and N. E. Tolbert. The transport of glycolic acid by *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*, 279(2):313–315, 1991.
- [59] P. C. Harley, J. A. Weber, and D. M. Gates. Interactive effects of light, leaf temperature, CO₂ and O₂ on photosynthesis in soybean. *Planta*, 165(2):249–263, 1985.
- [60] A. R. Grossman, M. Lohr, and C. S. Im. *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. *Annual Review of Genetics*, 38(1):119–173, 2004.
- [61] G. Renger and T. Renger. Photosystem ii: The machinery of photosynthetic water splitting. *Photosynthesis Research*, 98(1-3):53–80, 2008.
- [62] Govindjee. Photosystem ii. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2010.
- [63] Y. Kobayashi, W. Kaiser, and U. Heber. Bioenergetics of carbon assimilation in intact chloroplasts: Coupling of proton to electron transport at the ratio H⁺/e⁻=3 is incompatible with H⁺/ATP=3 in ATP synthesis. *Plant and Cell Physiology*, 36(8):1629–1637, 1995.
- [64] F. Haraux and Y. d. Kouchkovsky. Energy coupling and ATP synthase. *Photosynthesis Research*, 57(3):231–251, 1998.
- [65] M. R. Badger, S. von Caemmerer, S. Ruuska, and H. Nakano. Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (mehler reaction)

- and rubisco oxygenase. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402):1433–1446, 2000.
- [66] G. Forti, A. Furia, P. Bombelli, and G. Finazzi. *In vivo* changes of the oxidation-reduction state of NADP and of the ATP/ADP cellular ratio linked to the photosynthetic activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 132(3):1464–1474, 2003.
- [67] G. Finazzi and G. Forti. Metabolic flexibility of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as revealed by the link between state transitions and cyclic electron flow. *Photosynthesis Research*, 82(3):327–338, 2004.
- [68] P. Cardol, G. Forti, and G. Finazzi. Regulation of electron transport in microalgae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(8):912–918, 2011.
- [69] A. J. Golding and G. N. Johnson. Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. *Planta*, 218(1):107–114, 2003.
- [70] P. Horton and . Ruban. Molecular design of the photosystem ii light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *Journal of experimental botany*, 56(411):365–373, 2005.
- [71] K. Maxwell and G. N. Johnson. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51(345):659–668, 2000.
- [72] U. Schreiber. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: An overview. In George Christos Papageorgiou and Govindjee, editors, *Chlorophyll a Fluorescence*, Advances in Photosynthesis and Respiration, pages 279–319. Springer Netherlands, 2004.
- [73] M. Gilbert, C. Wilhelm, and M. Richter. Bio-optical modelling of oxygen evolution using *in vivo* fluorescence: Comparison of measured and calculated photosynthesis/irradiance (P-I) curves in four representative phytoplankton species. *Journal of Plant Physiology*, 157(3):307–314, 2000.
- [74] U. Schreiber, U. Schliwa, and W. Bilger. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*, 10(1-2):51–62, 1986.
- [75] G. Finazzi, G. N. Johnson, L. Dall’Osto, F. Zito, G. Bonente, R. Bassi, and F.-A. Wollman. Nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry*, 45(5):1490–1498, 2006.

- [76] J. V. Moroney and A. Somanchi. How do algae concentrate CO₂ to increase the efficiency of photosynthetic carbon fixation? *Plant Physiology*, 119(1):9–16, 1999.
- [77] J. V. Moroney and R. A. Ynalvez. Proposed carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic cell*, 6(8):1251–1259, 2007.
- [78] M. H. Spalding, K. Van, Y. Wang, and Y. Nakamura. Acclimation of *Chlamydomonas* to changing carbon availability. *Functional Plant Biology*, 29(3):221–230, 2002.
- [79] G. G. Bozzo and B. Colman. The induction of inorganic carbon transport and external carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii* is regulated by external CO₂ concentration. *Plant, Cell & Environment*, 23(10):1137–1144, 2000.
- [80] J. A. Raven, J. Beardall, and M. Giordano. Energy costs of carbon dioxide concentrating mechanisms in aquatic organisms: Photosynthesis research. *Photosynth Res*, 121(2-3):111–124, 2014.
- [81] M. R. Badger and G. D. Price. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45:369–392, 1994.
- [82] J. V. Moroney, Y. Ma, W. D. Frey, K. A. Fusilier, T. T. Pham, T. A. Simms, R. J. DiMarrío, J. Yang, and B. Mukherjee. The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles. *Photosynthesis Research*, 109(1-3):133–149, 2011.
- [83] M. Giordano, J. Beardall, and J. A. Raven. CO₂ concentrating mechanisms in algae: Mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1):99–131, 2005.
- [84] H. Fukuzawa, K. Miura, K. Ishizaki, K. Kucho, T. Saito, T. Kohinata, and K. Ohyama. Ccm1, a regulatory gene controlling the induction of a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii* by sensing CO₂ availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(9):5347–5352, 2001.
- [85] C. S. Im and A. R. Grossman. Identification and regulation of high light-induced genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 30(3):301–313, 2002.
- [86] J. V. Moroney, H. D. Husic, N. E. Tolbert, M. Kitayama, L. J. Manuel, and R. K. Togasaki. Isolation and characterization of a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in the CO₂ concentrating mechanism. *Plant Physiology*, 89(3):897–903, 1989.

- [87] M. H. Spalding, R. J. Spreitzer, and W. L. Ogren. Carbonic anhydrase-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* requires elevated carbon dioxide concentration for photoautotrophic growth. *Plant Physiology*, 73(2):268–272, 1983.
- [88] K. Van and M. H. Spalding. Periplasmic carbonic anhydrase structural gene (Cah1) mutant in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 120(3):757–764, 1999.
- [89] J. H. Clark, R. Luque, and A. S. Matharu. Green chemistry, biofuels, and biorefinery. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 3(1):183–207, 2012.
- [90] D. Ryan Georgianna and Stephen P. Mayfield. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature*, 488(7411):329–335, 2012.
- [91] J. Weinberg, M. Kaltschmitt, and C. Wilhelm. Analysis of greenhouse gas emissions from microalgae-based biofuels. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2(2):179–194, 2012.
- [92] C. Wilhelm, J. Weinberg, and M. Kaltschmitt. Conversion steps in bioenergy production - analysis of the energy flow from photon to biofuel. *Biofuels*, 5(4):385–404, 2014.
- [93] X. Zhu, S. P. Long, and D. R. Ort. Improving photosynthetic efficiency for greater yield. *Annual Review of Plant Biology*, 61:235–261, 2010.
- [94] H. Chmiel. *Bioprozesstechnik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2011.
- [95] I. Perner-Nochta and C. Posten. Simulations of light intensity variation in photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, 131(3):276–285, 2007.
- [96] J. Pruvost, J.-F. Cornet, and J. Legrand. Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: An energetically consistent analysis. *Chemical Engineering Science*, 63(14):3679–3694, 2008.
- [97] O. Bernard. Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO₂ mitigation and biofuel production. *Journal of Process Control*, 21(10):1378–1389, 2011.
- [98] C. Posten, A. Jacobi, C. Steinweg, F. Lehr, and R. Rosello. Photobioreaktor, Patent Nummer DE 102010021154A12011.11.24, 2011.
- [99] F. Cotta, J. Großmann M. Matschke, C. Griehl, and S. Matthes. Verfahrenstechnische Aspekte eines flexiblen, tubulären Systems zur Algenproduktion. Dechema Tagung 2012, 5. Bundesalgenstammtisch, Pullach, 26.-27.05.2012.

- [100] C. Posten. Concepts of photobioreactor design. Alg'n'Chem 2014, Montpellier, 31.03.-03.04.2014.
- [101] M. Heining and R. Buchholz. Photobioreactors with internal illumination – a survey and comparison. *Biotechnology Journal*, 10(8):1131–1137, 2015.
- [102] A. Jacobi. *Optimierung der Lichtverteilung in Photobioreaktoren - Potentiale „Antennen-reduzierter“ Mikroalgen-Mutanten als biologischer Ansatz und transparenter Schwammstrukturen als technisches Konzept*. Dissertation, Karlsruhe Institut für Technologie, Karlsruhe, 2012.
- [103] U. Langner, T. Jakob, K. Stehfest, and C. Wilhelm. An energy balance from absorbed photons to new biomass for *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlamydomonas acidophila* under neutral and extremely acidic growth conditions. *Plant, Cell & Environment*, 32(3):250–258, 2009.
- [104] C. Wilhelm and T. Jakob. 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, 2011.
- [105] P. Schlagermann, G. Göttlicher, R. Dillschneider, R. Rosello-Sastre, and C. Posten. Composition of algal oil and its potential as biofuel. *Journal of Combustion*, 2012, 2012.
- [106] E. Sierra, F. G. Acién, J. M. Fernández, J. L. García, C. González, and E. Molina. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 138(1-3):136–147, 2008.
- [107] R. Bosma, J. H. de Vree, P. M. Slegers, M. Janssen, R. H. Wijffels, and M. J. Barbosa. Design and construction of the microalgal pilot facility algaeparc. *Algal Research*, 6, Part B:160–169, 2014.
- [108] F. G. Acién Fernández, J. M. Fernández Sevilla, J. A. Sánchez Pérez, E. Molina Grima, and Y. Chisti. Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. *Chemical Engineering Science*, 56(8):2721–2732, 2001.
- [109] D. O. Hall, F. G. Acién Fernández, E. C. Guerrero, K. K. Rao, and E. M. Grima. Outdoor helical tubular photobioreactors for microalgal production: Modeling of fluid-dynamics and mass transfer and assessment of biomass productivity. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(1):62–73, 2003.

- [110] F. G. Acién, J. M. Fernández, J. J. Magán, and E. Molina. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it: Special issue on acb 2011. *Biotechnology Advances*, 30(6):1344–1353, 2012.
- [111] C. Posten, editor. *Microalgal biotechnology*. deGruyter, Berlin, 2012.
- [112] M. Morweiser, O. Kruse, B. Hankamer, and C. Posten. Developments and perspectives of photobioreactors for biofuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(4):1291–1301, 2010.
- [113] S. R. Steinbusch. *Einfluss von Licht und Temperatur auf die Kultivierung von Mikroalgen - Auslegung und Betrieb von Freiland-Pilotanlagen zur Bestimmung prozessrelevanter Kinetiken*. KIT-Bibliothek, Karlsruhe, 2015.
- [114] T. Liu, J. Wang, Q. Hu, P. Cheng, B. Ji, J. Liu, Y. Chen, W. Zhang, X. Chen, L. Chen, L. Gao, C. Ji, and H. Wang. Attached cultivation technology of microalgae for efficient biomass feedstock production. *Bioresource Technology*, 127:216–222, 2013.
- [115] J. Pruvost. Photobioreactor engineering for solar microalgae cultivation: methodology and applications. Alg'n'Chem 2014, Montpellier, 2014.
- [116] W. Blanken, M. Janssen, M. Cuaresma, Z. Libor, T. Bhajji, and R. H. Wijffels. Biofilm growth of *Chlorella sorokiniana* in a rotating biological contactor based photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(12):2436–45, 2014.
- [117] F. Berner, K. Heimann, and M. Sheehan. Microalgal biofilms for biomass production. *Journal of Applied Phycology*, pages 1–12, 2014.
- [118] M. Vert, Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, and F. Schué. Terminology for biorelated polymers and applications (iupac recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2):377–410, 2012.
- [119] Y. Shen, X. Xu, Y. Zhao, and X. Lin. Influence of algae species, substrata and culture conditions on attached microalgal culture. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(3):441–450, 2013.
- [120] Logan Christenson and Ronald Sims. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29(6):686–702, 2011.

- [121] S. Hadjoudja, V. Deluchat, and M. Baudu. Cell surface characterisation of *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 342(2):293–299, 2010.
- [122] A. Ozkan and H. Berberoglu. Physico-chemical surface properties of microalgae. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 112:287–293, 2013.
- [123] D. S. Domozych. Exopolymer production by the green alga *Penium margaritaceum*: Implications for biofilm residency. *International Journal of Plant Sciences*, 168(6):763–774, 2007.
- [124] A. Günther, T. Jakob, R. Goss, S. König, D. Spindler, N. Rübiger, S. John, S. Heithoff, M. Fresewinkel, C. Posten, and C. Wilhelm. Methane production from glycolate excreting algae as a new concept in the production of biofuels. *Bioresource Technology*, 121:454–457, 2012.
- [125] S. Klimmek, H.-J. Stan, A. Wilke, G. Bunke, and R. Buchholz. Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae. *Environmental Science & Technology*, 35(21):4283–4288, 2001.
- [126] J. B. K. Park, R. J. Craggs, and A. N. Shilton. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1):35–42, 2011.
- [127] A. Ozkan, K. Kinney, L. Katz, and H. Berberoglu. Reduction of water and energy requirement of algae cultivation using an algae biofilm photobioreactor. *Bioresource Technology*, 114(0):542–548, 2012.
- [128] W. Mulbry, S. Kondrad, C. Pizarro, and E. Kebede-Westhead. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresource Technology*, 99(17):8137–8142, 2008.
- [129] L. B. Christenson and R. C. Sims. Rotating algal biofilm reactor and spool harvester for wastewater treatment with biofuels by-products. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(7):1674–1684, 2012.
- [130] B. Ji, W. Zhang, N. Zhang, J. Wang, G. Lutz, and T. Liu. Biofilm cultivation of the oleaginous microalgae *Pseudochlorococcum* sp. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 37(7):1369–1375, 2014.

- [131] A. Sukenik and G. Shelef. Algal autoflocculation - verification and proposed mechanism. *Biotechnology and Bioengineering, Biotechnology and Bioengineering*, 26(2):142–147, 1984.
- [132] A. K. Lee, D. M. Lewis, and P. J. Ashman. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *Journal of Applied Phycology*, 21(5):559–567, 2009.
- [133] D. Vandamme, I. Foubert, I. Fraeye, B. Meesschaert, and K. Muylaert. Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresource Technology*, 105(0):114–119, 2012.
- [134] G. Bonente, C. Formighieri, M. Mantelli, C. Catalanotti, G. Giuliano, T. Morosinotto, and R. Bassi. Mutagenesis and phenotypic selection as a strategy toward domestication of *Chlamydomonas reinhardtii* strains for improved performance in photobioreactors. *Photosynthesis Research*, 108(2-3):107–120, 2011.
- [135] A. Jacobi, C. Steinweg, R. Rosello-Sastre, and C. Posten. Advanced photobioreactor led illumination system: Scale-down approach to study microalgal growth kinetics. *Engineering in Life Sciences*, 12(6):621–630, 2012.
- [136] P. Talbot, M. P. Gortares, R. W. Lencki, and J. de La Noüe. Absorption of CO₂ in algal mass culture systems: A different characterization approach. *Biotechnology and Bioengineering*, 37(9):834–842, 1991.
- [137] H. K. Lichtenthaler, A. Gitelson, and M. Lang. Non-destructive determination of chlorophyll content of leaves of a green and an aurea mutant of tobacco by reflectance measurements. *Journal of Plant Physiology*, 148(3–4):483–493, 1996.
- [138] J. D. Hiscox and G. F. Israelstam. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57(12):1332–1334, 1979.
- [139] Whistler, R.L. and Be Miller, J.N., editors. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Academic Press, New York, 1962.
- [140] D. Leibold. *Blasenfreie Begasung von Photobioreaktoren durch Membranen Aufbau einer Membrantestzelle und Test einiger Membranen sowie konstruktive Integration der Membran in einen Photobioreaktor*. Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2011.

- [141] C. Posten and A. Munack. On-line application of parameter estimation accuracy to biotechnical processes. In *American Control Conference, 1990*, pages 2181–2186, 1990.
- [142] C. P. Majer. *Parameterschätzung, Versuchsplanung und Trajektorienoptimierung für verfahrenstechnische Prozesse*. VDI-Verlag, Düsseldorf, 1998.
- [143] F. X. Malcata. Microalgae and biofuels: A promising partnership? *Trends in Biotechnology*, 29(11):542–549, 2011.
- [144] S. Raso, B. van Genugten, M. Vermuë, and R. H. Wijffels. Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis sp.* at low light intensity. *Journal of Applied Phycology*, 24(4):863–871, 2012.
- [145] M. W. Pirt and S. J. Pirt. The influence of carbon dioxide and oxygen partial pressures on *Chlorella* growth in photosynthetic steady-state cultures. *Microbiology*, 119(2):321–326, 1980.
- [146] L. S. Jahnke. Indirect effects of α -hydroxypyridinemethanesulfonate and cyanide on photosynthesis and glycolate excretion in *Chlorella*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 104(4):373–383, 1981.
- [147] B. Bergman, G. A. Codd, and L. Hällbom. Glycollate excretion by N₂-fixing cyanobacteria treated with photorespiratory inhibitors. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 113(5):451–460, 1984.
- [148] Y. Shiraiwa and G. H. Schmid. Stimulation of photorespiration by the carbonic anhydrase inhibitor ethoxzolamide in *Chlorella vulgaris*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 41(5-6):564–570, 1986.
- [149] P. N. Tyrrell, R. A. Kandasamy, C. M. Crotty, and G. S. Espie. Ethoxzolamide differentially inhibits CO₂ uptake and Na⁺-independent and Na⁺-dependent HCO₃⁻ uptake in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* UTEX 625. *Plant Physiology*, 112(1):79–88, 1996.
- [150] N. E. Tolbert and L. P. Zill. Excretion of glycolic acid by algae during photosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 222(2):895–906, 1956.
- [151] A. Kaplan and J. A. Berry. Glycolate excretion and the oxygen to carbon dioxide net exchange ratio during photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 67(2):229–232, 1981.

- [152] J. L. Hess and N. E. Tolbert. Glycolate pathway in algae. *Plant Physiology*, 42(3):371–379, 1967.
- [153] H. Stabenau and U. Winkler. Glycolate metabolism in green algae. *Physiologia Plantarum*, 123(3):235–245, 2005.
- [154] Y. Nakamura, S. Kanakagiri, K. Van, W. He, and M. H. Spalding. Disruption of the glycolate dehydrogenase gene in the high-CO₂-requiring mutant HCR89 of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Canadian Journal of Botany*, 83(7):820–833, 2005.
- [155] C. Vílchez, F. Galván, and J. M. Vega. Glycolate photoproduction by free and alginate-entrapped cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 1991.
- [156] J. Girard, N. Chua, P. Bennoun, G. Schmidt, and M. Delosme. Studies on mutants deficient in the photosystem I reaction centers in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics*, 2(3):215–221, 1980.
- [157] S. Thoms, M. Pahlow, and D. A. Wolf-Gladrow. Model of the carbon concentrating mechanism in chloroplasts of eukaryotic algae. *Journal of Theoretical Biology*, 208(3):295–313, 2001.
- [158] G. J. Ethier and N. J. Livingston. On the need to incorporate sensitivity to CO₂ transfer conductance into the Farquhar–von Caemmerer–Berry leaf photosynthesis model. *Plant, Cell & Environment*, 27(2):137–153, 2004.
- [159] C. Sousa, A. Compadre, M. H. Vermuë, and R. H. Wijffels. Effect of oxygen at low and high light intensities on the growth of *Neochloris oleoabundans*. *Algal Research*, 2(2):122–126, 2013.
- [160] Z. Ramazanov, M. Rawat, M. C. Henk, C. B. Mason, S. W. Matthews, and J. V. Moroney. The induction of the CO₂-concentrating mechanism is correlated with the formation of the starch sheath around the pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 195(2):210–216, 1994.
- [161] G. D. Farquhar. Models describing the kinetics of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 193(2):456–468, 1979.
- [162] L. F. Marek and M. H. Spalding. Changes in photorespiratory enzyme activity in response to limiting CO₂ in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 97(1):420–425, 1991.

- [163] N. E. Tolbert, M. Harrison, and N. Selph. Aminooxyacetate stimulation of glycolate formation and excretion by *Chlamydomonas*. *Plant Physiology*, 72(4):1075–1083, 1983.
- [164] D. W. Husic and N. E. Tolbert. Inhibition of glycolate and D-lactate metabolism in a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant deficient in mitochondrial respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(6):1555–1559, 1987.
- [165] K. Palmqvist, J.-W. Yu, and M. R. Badger. Carbonic anhydrase activity and inorganic carbon fluxes in low- and high-C1 cells of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus*. *Physiologia Plantarum*, 90(3):537–547, 1994.
- [166] J. V. Moroney, H. D. Husic, and N. E. Tolbert. Effect of carbonic anhydrase inhibitors on inorganic carbon accumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 79(1):177–183, 1985.
- [167] K. Uemura, Y. Suzuki, T. Shikanai, A. Wadano, R. G. Jensen, W. Chmara, and A. Yokota. A rapid and sensitive method for determination of relative specificity of rubisco from various species by anion-exchange chromatography. *Plant and Cell Physiology*, 37(3):325–331, 1996.
- [168] G. Zhu, R. G. Jensen, R. B. Hallick, and G. F. Wildner. Simple determination of the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by the specific radioactivity of [14C]-Glycerate 3-Phosphate. *Plant Physiology*, 98(2):764–768, 1992.
- [169] H. Takache, G. Christophe, J. Cornet, and J. Pruvost. Experimental and theoretical assessment of maximum productivities for the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in two different geometries of photobioreactors. *Biotechnology Progress*, 26(2):431–440, 2010.
- [170] S. A. Ruuska, M. R. Badger, T. J. Andrews, and S. von Caemmerer. Photosynthetic electron sinks in transgenic tobacco with reduced amounts of rubisco: little evidence for significant meyer reaction. *Journal of Experimental Botany*, 51(suppl 1):357–368, 2000.
- [171] P. van Hoek, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk. Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11):4226–4233, 1998.

- [172] P. C. Keymer, P. A. Lant, and S. Pratt. Modelling microalgal activity as a function of inorganic carbon concentration: accounting for the impact of pH on the bicarbonate system. *Journal of Applied Phycology*, 26(3):1343–1350, 2014.
- [173] H. Farazdaghi and G. E. Edwards. A mechanistic model for photosynthesis based on the multisubstrate ordered reaction of ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase. *Plant, Cell & Environment*, 11(9):789–798, 1988.
- [174] G. J. Collatz, J. A. Berry, G. D. Farquhar, and J. Pierce. The relationship between the rubisco reaction mechanism and models of photosynthesis. *Plant, Cell & Environment*, 13(3):219–225, 1990.
- [175] S. von Caemmerer, J. R. Evans, G. S. Hudson, and T. J. Andrews. The kinetics of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in vivo inferred from measurements of photosynthesis in leaves of transgenic tobacco. *Planta*, 195(1):88–97, 1994.
- [176] G. S. Hudson, J. R. Evans, S. von Caemmerer, Y. B. C. Arvidsson, and T. J. Andrews. Reduction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content by antisense RNA reduces photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology*, 98(1):294–302, 1992.
- [177] M. J. Parry, P. J. Andralojc, R. C. Mitchell, P. J. Madgwick, and A. J. Keys. Manipulation of rubisco: the amount, activity, function and regulation. *Journal of experimental botany*, 54(386):1321–1333, 2003.
- [178] M. Stitt and A. Krapp. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: The physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment*, 22(6):583–621, 1999.
- [179] O. L. Lange, editor. *Physiological plant ecology*, volume 12 B. Springer, Berlin, 1982.
- [180] V. N. Emelyanenko, S. P. Verevkin, E. N. Stepurko, G. N. Roganov, and M. K. Georgieva. Thermodynamic properties of glycolic acid and glycolide. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 84(8):1301–1308, 2010.
- [181] P. C. Harley and T. D. Sharkey. An improved model of C3 photosynthesis at high CO₂: Reversed O₂ sensitivity explained by lack of glycerate reentry into the chloroplast. *Photosynthesis Research*, 27(3):169–178, 1991.
- [182] F. Lehr and C. Posten. Closed photo-bioreactors as tools for biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3):280–285, 2009.

- [183] P. M. Slegers, P.J.M. van Beveren, R. H. Wijffels, G. van Straten, and A.J.B. van Boxtel. Scenario analysis of large scale algae production in tubular photobioreactors. *Applied Energy*, 105:395–406, 2013.
- [184] J. H. Ferziger and M. Peric. *Numerische Strömungsmechanik*. Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- [185] R. H. Wijffels, editor. *Immobilized cells: With 8 tables*. Springer lab manuals. Springer-Verl., Berlin, 2001.
- [186] D. Meschede. *Gerthsen Physik*. Springer-Lehrbuch. Springer Spektrum, Berlin, 25. Aufl. edition, 2015.
- [187] C. Ugwu and H. Aoyagi. Influence of shading inclined tubular photobioreactor surfaces on biomass productivity of *C. sorokiniana*. *Photosynthetica*, 46(2):283–285, 2008.
- [188] C. Posten. Design and performance parameters of photobioreactors. *TATup*, 21(1):38–45, 2012.
- [189] N.-H. Norsker, M. J. Barbosa, M. H. Vermuë, and R. H. Wijffels. On energy balance and production costs in tubular and flat panel photobioreactors. *TATuP*, 21(1), 2012.
- [190] O. Jorquera, A. Kiperstok, E. A. Sales, M. Embirucu, and M. L. Ghirardi. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, 101(4):1406–1413, 2010.
- [191] B. S. Ferreira, H. L. Fernandes, A. Reis, and M. Mateus. Microporous hollow fibres for carbon dioxide absorption: Mass transfer model fitting and the supplying of carbon dioxide to microalgal cultures. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 71(1):61–70, 1998.
- [192] A. P. Carvalho and F. X. Malcata. Transfer of carbon dioxide within cultures of microalgae: Plain bubbling versus hollow-fiber modules. *Biotechnology Progress*, 17(2):265–272, 2001.
- [193] L. Cheng, L. Zhang, H. Chen, and C. Gao. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and Purification Technology*, 50(3):324–329, 2006.
- [194] L. H. Fan, Y. T. Zhang, L. H. Cheng, L. Zhang, D. S. Tang, and H. L. Chen. Optimization of carbon dioxide fixation by *Chlorella vulgaris* cultivated in a membrane-photobioreactor. *Chemical Engineering & Technology*, 30(8):1094–1099, 2007.

- [195] T. Li, J. Liu, R. Bai, and F. S. Wong. Membrane-aerated biofilm reactor for the treatment of acetonitrile wastewater. *Environmental Science & Technology*, 42(6):2099–2104, 2008.
- [196] A. Kumar, X. Yuan, A. K. Sahu, J. Dewulf, S. J. Ergas, and H. van Langenhove. A hollow fiber membrane photo-bioreactor for CO₂ sequestration from combustion gas coupled with wastewater treatment: a process engineering approach. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(3):387–394, 2010.
- [197] B. A. Westrin. Measurement of the diffusion coefficient of ethanol in agarose gel beads: A reproducibility study. *Biotechnology Techniques*, 4(6):409–414, 1990.
- [198] D. B. Seifert and J. A. Phillips. Production of small, monodispersed alginate beads for cell immobilization. *Biotechnology Progress*, 13(5):562–568, 1997.
- [199] E. C. Bucharsky, K. G. Schell, R. Oberacker, and M. J. Hoffmann. Preparation of transparent glass sponges via replica method using high-purity silica. *Journal of the American Ceramic Society*, 93(1):111–114, 2010.
- [200] M. Fresewinkel. *Möglichkeiten zur Verbesserung des Lichteintrags in Photobioreaktoren*. Studienarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2010.

Betreute studentische Arbeiten:

Aghahassani, Babak - Ermittlung der *in vivo* Carboxylierungs- und Oxygenierungsrate des Enzyms RuBisCo in Abhängigkeit vom Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck (Bachelorarbeit, 2015)

Grenier, Jérôme - Process optimization: Modelling of glycolate production from *Chlamydomonas reinhardtii* for methane production as part of the Photomethan project (Research Internship, 2015)

Gutierrez Carmona, Noemi – Investigation of membrane-aerated reactor concept for the cultivation of microalgae (Master Thesis, 2013)

Jester, Denis - Entwicklung und Validierung lichtleitender Strukturen zur Erhöhung des Lichteintrages in Photobioreaktoren (Bachelorarbeit, 2013)

Pereira, Ana Luísa - Matrix optimization of immobilized algae and their application in a continuous process (Master Thesis, 2012)

Schönfelder, Tatjana - Entwicklung eines Prozesses zur kontinuierlichen Produktion von Glycolat durch immobilisierte Algen (Diplomarbeit, 2014)

Sood, Johannes - Prozessoptimierung der kontinuierlichen Glycolat-Exkretion der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* zur Gewinnung von Biogas (Bachelorarbeit, 2014)

Wagner, Adriana - Investigation of the glycolate excretion of *Chlamydomonas reinhardtii* for the application in an optimized continuous process (Master Thesis, 2013)

Walde, Anna-Lena - Development and characterisation of transparent structures for increasing the light input into photobioreactors (Studienarbeit, 2013)

Wanka, Eva-Maria - Untersuchung transparenter Strukturen zur Erhöhung des Lichteintrages in Photobioreaktoren (Bachelorarbeit, 2013)