

**Prozessstrategien zur Beeinflussung der makromolekularen
Zellzusammensetzung photoautotropher Mikroorganismen
bei Kultivierungen im Labor- und Pilotmaßstab**

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

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

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Ing. Andreas Martin Trautmann
aus Emmendingen

Erstgutachter: Prof. Dr.- Ing. Clemens Posten
Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Annegret Wilde
Mündliche Prüfung: 27. Juli 2018

“Growth is the expression *par excellence* of the dynamic nature of living organisms. Among the general methods available for the scientific investigation of dynamic phenomena, the most useful ones are those which deal with the kinetic aspects.”

Cornelis Bernardus van Niel, 1949

DANKSAGUNG

Meinen herzlichen und aufrichtigen Dank möchte ich aussprechen an...

...Herrn Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten für die wissenschaftlichen Diskussionen sowie die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Gruppe anzufertigen. Sein Vertrauen gab mir den Freiraum, eigene Ideen zu verfolgen und in die Tat umzusetzen. Die geleistete Unterstützung hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

...Frau Prof. Dr. Annegret Wilde für das freundliche Einverständnis zur Beurteilung meiner Dissertation als zweite Gutachterin sowie für die produktive Zusammenarbeit im Rahmen des Forschungsprojektes.

...das Graduiertenprogramm BBW ForWerts und den Projektpartnern der Universitäten Freiburg, Tübingen und Hohenheim sowie des Fraunhofer Instituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik aus Stuttgart und des Max Rubner-Instituts aus Karlsruhe. Insbesondere danke ich den Gruppenleitern Dr. Ulrike Schmid-Staiger und PD Dr. med. Karlis Briviba, dem Institutsleiter Prof. Dr. Markus Rohdetscord als auch den Doktoranden Luca Lippi, Björn Watzer, Katharina Wild, Lutz Großmann, Felix Derwenskus und Andrea Gille. Ohne die Unterstützung ihrer analytischen Methoden wäre meine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Die positive Atmosphäre und wissenschaftliche, produktive Zusammenarbeit war ein bedeutsamer Bestandteil meiner Dissertation.

...das Ministerium für Wissenschaft Forschung und Kunst Baden-Württemberg für die Förderung des Forschungsprojekts.

...meine Studenten Lucas Jakob, Maximilian Wyrwoll, Lara Stelmaszyk, Christian Sickinger, Eva Heymann, Orsolya Hamusics, Kirsten Ullmann, Caren Heyer, Jonathan Petersen, Ingrida Melková und Sören Barthel, welche bei der Realisierung dieser Arbeit tatkräftigt beiseite standen.

...die Kollegen Christian Steinweg, Sven Steinbusch, Mark Fresewinkel, Mirco Katzenmeyer, Christoph Howe sowie Dr. Meike Dössel. Ihr unermüdlicher Einsatz und ihre Unterstützung bei technischen Herausforderungen, bei wissenschaftlichen Fragestellungen sowie bei allgemeinen Angelegenheiten war mir eine sehr große Hilfe. Ich hoffe die gewonnenen Freundschaften bleiben über den Zeitraum der Dissertation hinaus bestehen.

...meine Familie und Freunde, welche mir in allen Lebenslagen beiseite stehen. Ohne sie wäre mein Werdegang bis hin zur Dissertation nicht möglich gewesen.

ABSTRACT

In the frame of this study it was possible to successfully modify the macromolecular cell composition of photoautotrophic microorganisms by using different process strategies from lab to pilot scale. The influences of single cultivation parameters such as photon flux density and the availability of substrates were in the focus of investigations. The microalgae *Chlorella vulgaris* was used as a benchmark strain. The effects of light, carbon dioxide and nitrogen availability on cell growth and cell composition of this strain were examined using a stirring tank reactor under idealized conditions. The specific growth rate of *Chlorella vulgaris* in dependence on limiting substrates was determined as well as their impact on the basic stoichiometric cell composition. For cell dry mass concentrations of $c_X = 0.3 \text{ g L}^{-1}$ the following conditions are required to ensure a specific growth rate of $\mu \geq 2 \text{ d}^{-1}$: a minimum photon flux density of $\text{PFD}_0 = 200 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a partial pressure of CO_2 of 0.5 kPa - corresponding to a CO_2 amount of 0.5 % (v/v) in the supply air - and an ammonium concentration of minimum $c(\text{NH}_4^+)_{\text{feed}} = 20 \text{ mg L}^{-1}$. Under these conditions, a cell composition with a total protein content between $q_P = 0.4$ and 0.5 g g^{-1} , a carbohydrate content between $q_{\text{Kh}} = 0.2$ and 0.3 g g^{-1} and a lipid content between $q_L = 0.1$ and 0.2 g g^{-1} were achieved. To produce higher protein quantities, a cultivation under substrate-saturated and light-limited growth conditions should be conducted. To generate higher carbohydrate or lipid quantities, nitrogen-limited cultivation conditions are required. The specifically established luminostat process to investigate nitrogen-saturated and nitrogen-limited growth of *Chlorella vulgaris* was successfully translated to the microalgae *Nannochloropsis limnetica*, the diatom *Phaeodactylum tricorutum* as well as the cyanobacterium *Synechocystis* sp.. Nitrogen deprivation led to an accumulation of storage compounds and a sufficient nitrogen supply to an accumulation of proteins for all tested strains. This confirms that the developed procedure is transferable.

For *Chlorella vulgaris* growth kinetics depending on photon flux density and nitrogen availability as well as a metabolic network of a photoautotrophic cell were used to generate a structured cell model to simulate photoautotrophic growth. By use of biomass specific formation and consumption rates, this model is able to describe intracellular changes of the macromolecular cell composition during a batch process when nitrogen deprivation is entered. Altogether, 16 biomass specific formation and consumption rates were simulated to describe anabolic and catabolic pathways of cell metabolism. The obtained simulated graphs are in good agreement with curves based on experimental data. Furthermore, the relative deviation of the estimated parameter values lie - on average - below the lower limit of 15 %. The simulation results and the determined growth kinetics, as well as the results of the Luminostat experiments, confirm the postulated cell model. Photon flux density, the carbon dioxide availability and the nitrogen availability affect substantially the macromolecular cell composition.

The above-mentioned increase of the protein content in light-limited growth conditions can be attributed to an increased formation of the photosystem protein complexes. Of 18 analyzed amino acids, the increase in quantity of 12 amino acids coincides over 80 % with their respective fraction in the protein complex of photosystem I and photosystem II, including light harvesting complexes. These experiments were performed in an 8 L plate reactor in continuous mode as Luminostat. Additionally, with the help of “design of experiments”, a correlation between protein and chlorophyll cell quotas was demonstrated. This is comprehensible, since the pigments of light harvesting complexes are expressed intensively at light-limited conditions as well. The media components ammonium chloride, magnesium sulfate and iron sulfate significantly influenced the protein and pigment formation. Under the applied experimental conditions a maximum protein content of $q_p = 0.65 \text{ g g}^{-1}$ was achieved with *Chlorella vulgaris*.

In a stirring tank reactor under idealized conditions the specific growth rate in dependence on the light and phosphate availability of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. was investigated. These experiments revealed, that a minimum photon flux density of $\text{PFD}_0 = 46 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and a minimum phosphate concentration of $c(\text{PO}_4^{3-})_{\text{feed}} = 4.16 \text{ mg L}^{-1}$ are necessary to guarantee a high specific growth rate of $\mu \geq 1.3 \text{ d}^{-1}$. In several batch processes was quantified how much phosphate is required to achieve a Cyanophycin content up to $q_{\text{CP}} = 0.4 \text{ g g}^{-1}$. Until now, it was only known that *Synechocystis* sp. concentrates the biopolymer Cyanophycin under phosphate deprived growth conditions but these conditions have not been evaluated precisely. In this work the specific amount of phosphorous that induces an intensified Cyanophycin synthesis, namely $q_{\text{Phosphor,X}} < 4 \text{ mg g}^{-1}$, was determined and as well the essential minimum of phosphorous where the stoichiometric growth limit is reached and the cells are forced to stop growth, namely $q_{\text{Phosphor,X}} < 1 \text{ mg g}^{-1}$. At phosphorous quotas exceeding $q_{\text{Phosphor,X}} > 1 \text{ mg g}^{-1}$ the cells continue to grow with a simultaneously stable photo conversion efficiency - despite prevailing phosphate limitation in the medium - due to intracellular polyphosphate sources. Therefore, *Synechocystis* sp. cells do not experience stress under these conditions. To translate insights from lab scale experiments to pilot scale, an outdoor cultivation was performed using a 230 L plate reactor. For economic and technical reasons, instead of a continuous process a repeated batch cultivation was performed. The changing conditions due to the day and night cycles and the related photosynthetic and respiratory activities of the cells pose a particular challenge for outdoor cultivations. Due to varying pH values, the carbon dioxide supply has to be adjusted constantly. This was realized by the implementation of a PI controller. Additionally, for pH regulation, an alkaline ammonia solution was feeded and thus a limitation of nitrogen avoided. This course of action led with *Chlorella vulgaris* to a total protein content up to $q_p = 0.63 \text{ g g}^{-1}$ in lab scale and up to $q_p = 0.65 \text{ g g}^{-1}$ in pilot scale. Due to preset and natural light and dark periods, the cell composition underwent cyclical changes. During the dark phase, cell dry mass concentration decreased up to 10 % in consequence of respiratory processes for energy supply.

Taken together, this work presents, develops and verifies different strategies how to manipulate the production of biological macromolecules in photoautotrophic microorganisms. It is shown, that the product yield can be influenced actively by changing process parameters. The quantities of essential amino acids or saturated fatty acids can be shifted within the range of stoichiometric minima and maxima. Hence, the objective of a targeted production of physiologic valuable group of substances by the feed and food industry is getting closer. Outdoor cultivations present a cost-effective cultivation option. A precise determination of growth kinetics in dependence on limiting substrates can contribute substantially to process development as long as product-related intracellular regulatory circuits are considered accordingly. Furthermore, measurement and regulation technologies can facilitate the automatization of cultivation processes. The available quantities of substrates and energy suppliers rule all metabolic processes in the cell and directly affect growth rate. An adequate design of cultivation processes requires therefore a full and proper quantitative consideration of all processes inside and outside of a cell.

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG.....	I
ABSTRACT.....	II
INHALTSVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Ausgangssituation	1
1.2 Zielsetzung der Arbeit.....	2
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1 Photoautotrophe Mikroorganismen	3
2.1.1 Photosynthese.....	3
2.1.2 Stoffwechselwege und biologische Makromoleküle.....	4
2.2 Prozessführungsstrategien	7
2.2.1 Diskontinuierliche und kontinuierliche Prozesse.....	7
2.2.2 Photobioreaktoren	9
2.3 Strukturierte kinetische Modelle	11
2.3.1 Modellgleichungen zur Beschreibung der Wachstumsgeschwindigkeit.....	12
2.4 Statistische Verfahren zur Versuchsplanung.....	14
3 MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 Mikroorganismenkultur.....	16
3.1.1 Mikroorganismen	16
3.1.2 Medien	16
3.1.3 Stammhaltung und Vorkultur.....	16
3.1.4 Rührkesselreaktor.....	17
3.1.5 Mini-Plattenreaktor	19
3.1.6 Midi-Plattenreaktor	19
3.1.7 Maxi-Plattenreaktor	20
3.1.8 Freiland-Plattenreaktor.....	21
3.2 Analytik.....	22
3.2.1 Biotrockenmasse	22
3.2.2 Extinktionskoeffizient	22
3.2.3 Zellzahl.....	22
3.2.4 Pigmente.....	23
3.2.5 Kohlenhydrate.....	23

3.2.6	Fettsäuren	23
3.2.7	Proteine	23
3.2.8	Cyanophycin	24
3.2.9	Aminosäuren	24
3.2.10	Mineralstoffe	24
3.2.11	Anorganische Ionen	25
3.3	Berechnungen	25
3.3.1	Biomassespezifische Wachstumsrate	25
3.3.2	Biomassezusammensetzung	26
3.3.3	Photonenkonversionseffizienz	26
3.3.4	Auslegung PI-Regler	27
3.3.5	Parameterschätzung	27
3.3.6	Sensitivitätsanalyse und Parameterschätzfehler	28
3.4	Statistische Versuchsplanung	29
4	ERGEBNISSE	30
4.1	Wachstumskinetiken	30
4.1.1	<i>Chlorella vulgaris</i>	30
4.1.2	<i>Synechocystis</i> sp.	35
4.2	Modellierung von photoautotrophem Wachstum	36
4.2.1	Lichtfeld	37
4.2.2	Metabolismus	39
4.2.3	Reaktor	45
4.2.4	Parameterschätzung und Parameterschätzfehler	46
4.2.5	Parametersensitivitäten	47
4.3	Untersuchung von Prozessstrategien zur Beeinflussung einzelner Zellbestandteile	49
4.3.1	Schüttelkolben I	49
4.3.2	Schüttelkolben II - Design of Experiments	50
4.3.3	Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit	54
4.3.4	Einfluss der Phosphorquelle	59
4.3.5	Einfluss der Photonenflussdichte	62
4.4	Maßstabsvergrößerung in den Pilotmaßstab	67
4.4.1	Regelgüte des CO ₂ -Reglers im Tag-Nacht-Betrieb	67
4.4.2	Repetitiver Tag-Nacht-Chargenprozess im Labormaßstab	69
4.4.3	Repetitiver Tag-Nacht-Chargenprozess im Pilotmaßstab	71
5	DISKUSSION	74

5.1 Wachstum photoautotropher Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte und der Substratverfügbarkeit	74
5.1.1 Abhängigkeit von der Photonenflussdichte.....	74
5.1.2 Abhängigkeit von der Kohlenstoffdioxid-Verfügbarkeit.....	77
5.1.3 Abhängigkeit von der Stickstoff-Verfügbarkeit.....	79
5.1.4 Abhängigkeit von der Phosphor-Verfügbarkeit	81
5.2 Modellerstellung auf Zell- und Reaktorebene.....	82
5.2.1 Startwertvariation, Parameterschätzung und Parameterschätzfehler	83
5.3 Prozessbedingte Veränderung der Zellzusammensetzung	86
5.3.1 Schüttelkolbenversuche.....	87
5.3.2 Versuche im Midi- und Maxi-Plattenreaktor	89
5.4 Übertragbarkeit von Prozessstrategien in den Pilotmaßstab	94
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	98
7 AUSBLICK.....	101
LITERATURVERZEICHNIS	103
ANHANG	120
A1 Studentische Abschlussarbeiten	120
A2 Material und Methoden	121
A2.1 Medien	121
A2.2 Korrelation von optischer Dichte und der Biomassekonzentration.....	122
A2.3 Kalibrierung der LED-Module des Rührkesselreaktors.....	123
A2.4 RI-Fließbilder Plattenreaktoren.....	123
A2.5 Sprungantworten PI-Regler.....	124
A2.6 Cyanophycin-Extraktion und -Quantifizierung.....	125
A2.7 Design of Experiments.....	127
A3 Ergebnisse	128
A3.1 Manipulation makromolekularer Zellbestandteile	128
A3.2 Maßstabsvergrößerung.....	130
A3.3 Photoautotrophes Wachstumsmodell	131

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Beschreibung	Einheit
μ	Spezifische Wachstumsrate	$\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$
μ_{max}	Maximale spezifische Wachstumsrate	$\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$
ε	Extinktionskoeffizient	$\text{L g}^{-1} \text{m}^{-1}$
ε_{sca}	Korrigierter Extinktionskoeffizient	$\text{L g}^{-1} \text{m}^{-1}$
φ_i	Volumenanteil φ einer Komponente i an einem Stoffgemisch	% (v/v)
$c(i)$	Konzentration des Substrats i	g L^{-1}
$c_{i,0}$	Startkonzentration der Komponente i	g L^{-1}
c_X	Biotrockenmassekonzentration	g L^{-1}
d, D	Schichtdicke Plattenreaktor innen	m
$e_{i,j}$	Massenanteil der Komponente i bezogen auf die Komponente j	g g^{-1}
\dot{F}_i	Volumenstrom von Komponente i	mL min^{-1}
h, H	Höhe	m
$I(l)$	Lichtintensität in Abhängigkeit von der Weglänge l	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$
I_0	Lichtintensität, analog PFD_0	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$
K_c	Korrekturkoeffizient der Biomassestreuung	g L^{-1}
k_M	Monod-Konstante für PFD_0	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$
k_M	Monod-Konstante für eine Substratkonzentration	g L^{-1}
K_P	PI-Regler: Proportionalbeiwert	mL min^{-1}
K_S	PI-Regler: Statische Verstärkung	min mL^{-1}
K_z	Korrekturkoeffizient der Weglängenstreuung	m
OD_{750}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 750 nm	-
PCE	Photonenkonversionseffizienz	%
PFD	Photonenflussdichte	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
PFD_0	Photonenfluss welcher auf die Reaktoroberfläche trifft	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
PFD_{spez}	Biomassespezifische Photonенflussdichte	$\mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$
$\text{PFD}_{\text{trans}}$	Transmittierter Photonенfluss von PFD_0	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
P_X	Volumetrische Biotrockenmasseproduktivität	$\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$
q_i	Zellquota; Massenanteil der Komponente i an der Biotrockenmasse	g g^{-1}
r, R	Radius bzw. Koordinate für das Lichtprofil	m
r_0	Radius Rührwelle des Rührkesselreaktors	m
$r_{\text{ATP,m}}$	Biomassespezifische Maintenance-Rate	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
r_i	Biomassespezifische Bildungs- oder Verbrauchsrate der Komponente i	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

$r_{i,max}$	Maximale biomassespez. Bildungs- oder Verbrauchsrate der Komponente i	$g\ g^{-1}\ h^{-1}$
T	PI-Regler: Zeitkonstante	s
T_I	PI-Regler: Nachstellzeit	min
T_t	PI-Regler: Totzeit	s
V_i	Volumen von Größe i	L
Y_{ij}	Ausbeutekoeffizient der Komponente i bezogen auf die Komponente j	$g\ g^{-1}$
z	Weglänge	m
<hr/>		
ATP	Adenosintriphosphat	
Car.	Carotinoide	
Chl.a/b	Chlorophyll a/b	
CP	Symbol für Cyanophycin	
DNA	Symbol für (Desoxyribo-)nukleinsäure	
FIM	Fischer-Informationen-Matrix	
FS	Symbol für Fettsäuren	
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat	
I_c, I_k, I_h	Kompensierende, sättigende, inhibierende Lichtintensität	
Kh	Symbol für Kohlenhydrate	
L	Symbol für Lipide	
LA	Symbol für Membranlipide	
LS	Symbol für Lipidspeicher	
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat	
NPQ	Nicht-photochemisches Quenching	
P	Symbol für Proteine	
PAR	Photosynthetisch aktive Strahlung	
PGA	3-Phosphoglycerat	
PSI/II	Photosystem I und II	
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase	
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphat	
S	Symbol für Substrat (Wachstumskinetik) und Glukose (Modellierung)	
SS	Symbol für Kohlenhydrat- bzw. Stärkespeicher	
XA	Symbol für aktive Biomasse	
XS	Symbol für inaktive Biomasse	

1 EINLEITUNG

1.1 Ausgangssituation

Photoautotrophe Mikroorganismen sind dank ihrer vielfältigen Einsatzmöglichkeiten in der Futter- und Nahrungsmittelindustrie, in der Wassertechnologie zur Abwasserreinigung oder in der Herstellung von pharmazeutischen Produkten und Biokraftstoffen in den Fokus der Forschung gerückt. Die metabolische Flexibilität von Mikroalgen und Cyanobakterien begründet diese zahlreichen Verwendungsmöglichkeiten. Außerdem erlaubt der Einsatz von Photobioreaktorsystemen eine Kultivierung auf agrarwirtschaftlich nicht nutzbaren Flächen. Durch die Nutzung dieser Mikroorganismen als Vertreter einer umweltfreundlichen und nachhaltigen Rohstoffressource können fossile Rohstoffquellen ersetzt und der Wandel zu einer biobasierten Wirtschaft unterstützt werden. Das steigende Bevölkerungswachstum im letzten Jahrhundert stellt Wirtschaft und Umwelt vor neue Herausforderungen. Die Suche alternativer Versorgungsmöglichkeiten, insbesondere zur Sicherung der Welternährung, sind zentrale Ziele der Bioökonomie. Beispielsweise gehören die Länder der Europäischen Union mit 32 Millionen Tonnen im Jahr 2013 und 2014 zu den weltweit zweitgrößten Importeuren von Sojabohnen, vornehmlich für Futtermittelzwecke. Zukünftig könnte industrielle und nachhaltig erzeugte Algenbiomasse die Sojabohne als Proteinquelle stellenweise ersetzen. Die ernährungsphysiologisch vorteilhafte Zusammensetzung der Mikroalgen hinsichtlich der essentiellen Aminosäuren, der ungesättigten Fettsäuren und der Carotinoide führt bei Einsatz in der Futter- und Lebensmittelsparte zu einer höheren Wertschöpfung verglichen mit der Nutzung der gewonnenen Biomasse als Ausgangsstoff für die Biokraftstoffproduktion [1–6].

Bereits heute werden 30 % der produzierten Algenbiomasse als Futtermittel verwendet und so konventionelle Proteinquellen wie Sojamehl für Geflügel oder Fischmehl für Aquakulturen ersetzt. Im Vergleich zu Sojamehl mit einem Proteingehalt von 37 % kann die Mikroalge *Chlorella vulgaris* Anteile von über 50 % pro Biotrockenmasse erreichen. Zusätzlich sei der mindestens genauso hohe Anteil an essentiellen Aminosäuren hervorgehoben [7–9]. Trotz dieser hohen Proteinqualität und der Fortschritte in der Photobiotechnologie sind (Lebensmittel-)Produkte aus Mikroalgen auf dem Markt nur geringfügig vertreten, weil die Betriebs- und Produktionskosten noch immer sehr hoch sind. Das wirtschaftliche Potential der Produktion photoautotropher Mikroorganismen ist in der Diskussion [10–13]. Um eine ökonomische Produktion von Mikroalgenbiomasse zu realisieren, sind maßgeschneiderte Prozessstrategien notwendig. Eine Untersuchung der Zellzusammensetzung in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen ist daher unabdingbar, um gezielt eine höhere Produktausbeute erreichen zu können. Effizientere Photobioreaktoren, z.B. durch den Einbau von Spezialmaterialien [14], und stammspezifisch angepasste Kultivierungsverfahren oder der Einsatz von gentechnisch veränderten Organismen könnten zu verbesserten Ausbeuten bei der Produktion von Algenbiomasse führen [15–18].

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung von Prozessführungsstrategien zur gezielten Beeinflussung der makromolekularen Zellzusammensetzung photoautotropher Mikroorganismen - genauer einer Verschiebung der stöchiometrischen Grundzusammensetzung bezüglich des Protein-, Kohlenhydrat- und Lipidgehalts. Nach den Regeln der Prozessentwicklung - „the biocatalysis cycle“ [19] - erfolgt dabei zunächst die Bestimmung von Wachstumskinetiken ausgewählter Modellstämme abhängig von der Licht-, Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorverfügbarkeit. Hierfür stehen Rührkesselreaktoren oder diverse Plattenreaktoren zur Verfügung. Als Betriebsweise kann dabei zwischen einem klassischen Chargenprozess, einem repetitiven Chargenprozess sowie einem kontinuierlichen Prozess gewählt werden. Die Daten aus den Wachstumskinetiken werden verwendet, um belastbare Prozessdaten in Modell- und Pilotreaktoren zu generieren. Außerdem dienen sie der Erstellung eines strukturierten Modells in der Modellumgebung MATLAB/Simulink, welches das Zellwachstum und die Zellzusammensetzung bei eintretender Stickstofflimitierung über den Prozessverlauf wiedergibt. Die Mikroalge *Chlorella vulgaris* soll als exemplarischer Stamm dienen, um Prozessführungsstrategien zu entwickeln und diese auf andere Stämme zu übertragen. Weitere Untersuchungen werden an der Mikroalge *Nannochloropsis limnetica*, der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* und dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 vorgenommen.

Neben den Zellkomponenten Proteine, Kohlenhydrate und Lipide, soll außerdem die Bildung von Cyanophycin, ein Biopolymer bestehend aus den Aminosäuren Arginin und Asparaginsäure, in *Synechocystis* sp. betrachtet werden. Einflussfaktoren, welche eine erhöhte Synthese von Cyanophycin induzieren sind zwar bereits bekannt [20], allerdings fehlen bis heute quantitative Daten. Weiterhin wird die Expression von Proteinkomplexen der Photosysteme untersucht mit dem Ziel, die Möglichkeit einer gezielten prozessgesteuerten Bildung einzelner Proteingruppen bzw. Aminosäuren zu demonstrieren. Neben den oben erwähnten Substraten wird mit Hilfe von statistischer Versuchsplanung der Einfluss weiterer relevanter Medienkomponenten, u.a. die Cofaktoren Eisen und Magnesium, auf die Protein- und Pigmentbildung simuliert. Dazu wird der Modellorganismus *Chlorella vulgaris* herangezogen. Um eine ökonomisch rentable Herstellung von Mikroalgenbiomasse in Freiland-Photobioreaktoren, unter Ausnutzung des Sonnenlichts zu untersuchen, soll zusätzlich eine geeignete Prozessführungsstrategie für große Maßstäbe und unter Freilandbedingungen vorgeschlagen werden. Dabei stellen wechselnde Lichtverhältnisse und Außentemperaturen eine besondere Herausforderung für die Prozesssteuerung dar. Die gewonnenen Erkenntnisse dienen im Rahmen des Forschungsprogramms „Bioökonomie Baden-Württemberg“ zur Bewertung der ressourcenschonenden Erzeugung von hochwertigen Produkten für den Lebensmittel- und Futtermittelsektor auf Basis von Algenbiomasse.

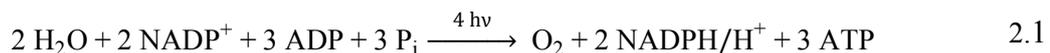
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Photoautotrophe Mikroorganismen

Mikroalgen und Cyanobakterien sind als photoautotrophe Mikroorganismen befähigt, organische Moleküle aus anorganischen Substanzen zu synthetisieren. Dabei erfolgt die Energiegewinnung über die Photosynthese, bei der elektromagnetische Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichts in chemische Energie umgewandelt wird. Heterotrophes oder mixotrophes Wachstum ist bei diesen Organismen ebenfalls möglich; dies wurde aufgrund des ökologischen Nachteils einer Zugabe von organischen Kohlenstoffquellen hier jedoch nicht untersucht. Im Folgenden werden die Licht- und Dunkelreaktion der Photosynthese sowie zelluläre Stoffwechselwege und Strukturen erläutert.

2.1.1 Photosynthese

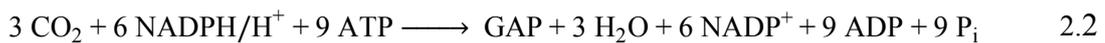
In der Lichtreaktion der Photosynthese werden auftreffende Photonen durch in den Thylakoidmembranen lokalisierte Lichtsammelkomplexe mit Hilfe assoziierter Chlorophyll- und Carotinoidmoleküle absorbiert. Die absorbierte Energie wird an die Reaktionszentren der Photosysteme weitergeleitet. Im Photosystem II (PSII) wird die Energie genutzt, um eine Spaltung von Wasser zu ermöglichen, wobei ein Mangankomplex als Katalysator dient [21]. Als Produkte der Wasserspaltung entstehen Protonen und Sauerstoff. Die frei werdenden Elektronen werden über eine Elektronentransportkette auf das Photosystem I (PSI) übertragen und dienen dort zur Reduktion von NADP^+ zu NADPH . Neben diesem sogenannten nicht-zyklischen Elektronentransport zur Herstellung von NADPH/H^+ , ist der Photosyntheseapparat auch befähigt, einen zyklischen Elektronentransport durchzuführen. Hierbei zirkulieren die Elektronen zwischen PSI und PSII, was zum Aufbau eines Protonengradienten führt [22]. Das aufgebaute elektrochemische Potential aus zyklischem und nicht-zyklischem Elektronentransport wird von der ATP-Synthase genutzt, um ATP aus ADP zu regenerieren. Gleichung 2.1 gibt die Gesamtbilanz der Lichtreaktion wieder. Aus zwei H_2O Molekülen werden insgesamt ein Molekül Sauerstoff gebildet, zwei Moleküle NADP^+ zu NADPH/H^+ reduziert und drei Moleküle ADP zu ATP phosphoryliert [22,23].



Die Bildung von NADPH und ATP , welche als Reduktions- und Energieäquivalente für die Dunkelreaktion der Photosynthese verwendet werden, kann aktiv von der Zelle angepasst werden [24,25]. Werden mehr Photonen absorbiert als die Zelle verarbeiten kann, besteht außerdem die Möglichkeit die überschüssige Energie in Form von Wärme oder Fluoreszenz zu emittieren („non-photochemical quenching“, NPQ) [26]. In der Lichtreaktion gebildetes ATP und NADPH stehen der Zelle außerhalb der Chloroplasten nicht zur Verfügung. Grund hierfür sind die schnellen Umsatz- und Verbrauchsdaten der

Dunkelreaktion [22,27,28]. Eine Energiebereitstellung für die übrigen Zellkompartimente ist daher nur indirekt über gebildete Zuckervorstufen der Dunkelreaktion möglich.

Zentrales Enzym der Dunkelreaktion, auch Calvin-Benson-Zyklus genannt, ist die Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO), welche für die Fixierung von Kohlenstoffdioxid verantwortlich ist. Die Fixierung erfolgt durch eine Anlagerung von Kohlenstoffdioxid an Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP). Das entstehende Produkt zerfällt aufgrund hoher Instabilität in zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat (PGA), welche unter Verbrauch von ATP und NADPH zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) umgewandelt werden. Von insgesamt sechs gebildeten GAP Molekülen verlässt nur eines den Calvin-Benson-Zyklus, die restlichen fünf GAP Moleküle werden unter Verbrauch von ATP in RuBP umgewandelt und stehen für eine erneute Reaktion mit RuBisCO zur Verfügung [29]. Für die Herstellung eines GAP Moleküls müssen drei CO₂ Moleküle fixiert werden. Weiterhin werden neun Moleküle ATP und sechs Moleküle NADPH/H⁺ aus der Lichtreaktion der Photosynthese benötigt, siehe Gleichung 2.2 [27].



Das gebildete GAP dient photoautotrophen Organismen als Grundbaustein zum Aufbau von Biomasse. Während die Energie- und Reduktionsäquivalente im Gesamtprozess erzeugt und wieder verbraucht werden, steht GAP innerhalb und außerhalb der Chloroplasten als organische Kohlenstoffquelle zur Verfügung und ist somit das wichtigste Produkt der Photosynthese. Eine vereinfachte Darstellung von Licht- und Dunkelreaktion der Photosynthese ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

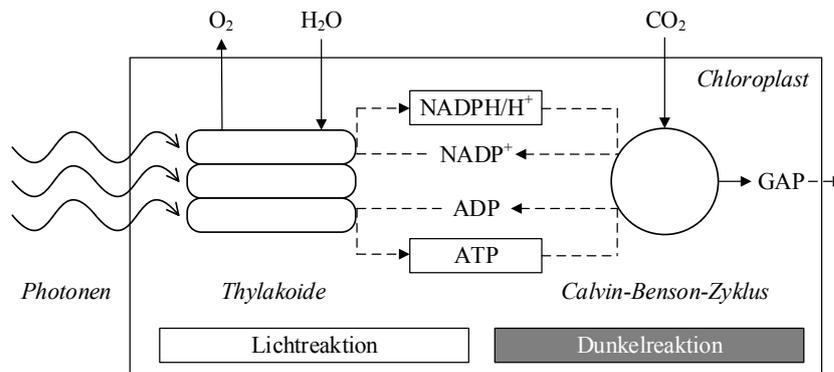


Abbildung 2.1: Vereinfachtes Schema der Photosynthese mit Licht- und Dunkelreaktion; nach Buschmann und Grumbach [30].

2.1.2 Stoffwechselwege und biologische Makromoleküle

Die in der Zelle auftretenden Makromoleküle lassen sich in charakteristische Stoffklassen unterteilen. Dazu zählen Aminosäuren - zum Protein-, Enzym- oder Cyanophycinaufbau -, Kohlenhydrate - zum Aufbau von Polysacchariden als Struktur- oder Speicherpolymere -, Fettsäuren - zum Aufbau von Membran- oder Speicherlipiden - sowie Nukleinsäuren. Aminosäuren, Kohlenhydrate und Fettsäuren machen bis zu 90 % der Zellzusammensetzung aus, wobei die genaue Zusammensetzung von den Kultivierungsbedingungen wie Licht- und Substratverfügbarkeit abhängt [31–33]. Neben den makromolekularen

Strukturen sind funktionelle Moleküle wie akzessorische Pigmente von essentieller Bedeutung [34]. Ein vereinfachtes Schema der Stoffwechselwege für die Synthese der biologischen Makromoleküle ist in Abbildung 2.2 abgebildet. Das in der Dunkelreaktion der Photosynthese gebildete GAP dient als Ausgangssubstanz für die Synthese sämtlicher organischer Zellbestandteile. Über den reduktiven Pentose-Phosphat-Zyklus werden beispielsweise Glucosemoleküle gebildet, die wiederum zur Kohlenhydrat-Synthese in Form von Stärke innerhalb der Chloroplasten dienen. Diese Kohlenhydrate können bei Bedarf über die Glykolyse abgebaut werden. In der Glykolyse wird außerdem Acetyl-Coenzym gebildet, welches eine essentielle Rolle in vielen Stoffwechselreaktionen besitzt. So wird Acetyl-Coenzym A für die Fettsäuresynthese oder der Aminosäuresynthese im Citratzyklus eingesetzt. Im Citratzyklus entstehen bei der Oxidation von Acetyl-Coenzym A Reduktionsäquivalente, welche zur Generierung von ATP in den Mitochondrien dienen. Diese sogenannte oxidative Phosphorylierung ist ein aerober Prozess, welcher die notwendigen Energieäquivalente für den katabolen und den anabolen Stoffwechsel der Zelle bereitstellt. Ausgehend von dem Citratzyklus können weitere Verbindungen wie z.B. Nucleinsäuren über den oxidativen Pentose-Phosphat-Zyklus synthetisiert werden [27,30,35,36].

Die Bildung biologischer Makromoleküle kann nur bei ausreichender Versorgung von Photonen erfolgen. Wechselnde Lichtverhältnisse, wie sie in den Tag- und Nachtphasen einer Kultivierung im Freiland vorkommen, üben daher einen großen Einfluss auf die zellinternen Stoffwechselwege aus. Während den Tagphasen erfolgt die Kohlenstofffixierung in den Chloroplasten, wobei ungefähr ein Drittel des Kohlenstoffs zur Bildung funktioneller Biomasse wie Proteine und Nucleinsäuren und zwei Drittel zur Bildung von Kohlenhydraten und Lipiden verwendet werden [37]. Zusätzlich werden andere Substrate aufgenommen, um die für die Protein-, Nucleinsäure-, oder Chlorophyllsynthese notwendigen Elemente, wie Stickstoff, Phosphor, Schwefel, Magnesium und Eisen, bereitzustellen. Unter limitierenden Lichtverhältnissen, wie sie in den Nachtphasen vorherrschen, können respiratorische Stoffwechselwege nicht länger durch die Kohlenstofffixierung der Chloroplasten aufrechterhalten werden. Daher werden während den Nachtphasen die in den Tagesphasen angelegten Speicherkohlenhydrate und -lipide veratmet, um den für die oxidative Phosphorylierung notwendigen Kohlenstoff bereit zu stellen. Somit wird sichergestellt, dass die Zelle die Bildung von Energie- und Reduktionsäquivalenten in Form von ATP und NADPH zur Aufrechterhaltung des Metabolismus weiterführen kann (siehe Abbildung 2.2). Lichtunabhängige Reaktionen wie der Pentose-Phosphat-Zyklus, der Citratzyklus und die Atmungskette sind aktiv [27,37,38]. Die Zellatmung in den Nachtphasen führt bei photoautotrophen Mikroorganismen zu Biomasseverlusten zwischen 2 - 10 %. Bei ungünstigen Wachstumsbedingungen, wie zu hohe oder niedrige Temperaturen bzw. Photonenflussdichten, können die Biomasseverluste in den Nachtphasen noch höher ausfallen [37–39]. Die respiratorische Aktivität während der Nachtphase führt zu einem Anstieg des spezifischen Proteingehalts auf bis zu 70 % [40].

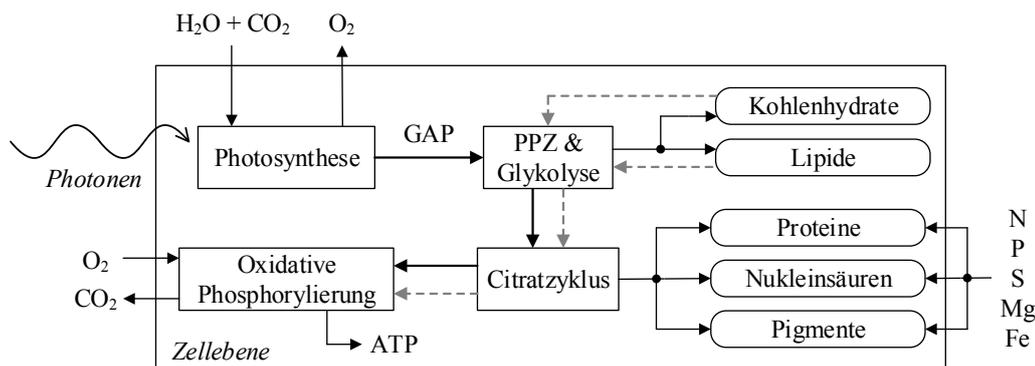


Abbildung 2.2: Vereinfachtes Schema der Stoffwechselwege für die Synthese biologischer Makromoleküle während der Hellphase (schwarze Pfeile) und während der Dunkelpphase (graue Pfeile), PPZ = Pentose-Phosphat-Zyklus [37,41,42].

Für den Mikroalgenstamm *Chlorella* kann der Protein-, Kohlenhydrat- und Lipidgehalt pro Biotrockenmasse je nach Kultivierungsbedingungen zwischen 18 - 58 %, 12 - 51 % und 14 - 40 % schwanken [33,43]. Da sowohl Proteine als auch Nucleinsäuren und Pigmente neben Kohlenstoff weitere Elemente enthalten - wie Stickstoff, Phosphor und Schwefel, aber auch Magnesium und Eisen als Zentralionen oder Cofaktoren - ist eine Versorgung der Zellen mit Makro- und Spurenelementen notwendig. Wirkt eines dieser Elemente limitierend, können einige Makromoleküle nicht mehr synthetisiert werden. Eine Stickstofflimitierung induziert beispielsweise eine Akkumulation von Kohlenhydraten und Lipiden [33]. Da die Abwesenheit von Stickstoff eine Anreicherung von stickstoffhaltigen Verbindungen wie Proteine, Pigmente und Nucleinsäuren verhindert, nutzt die Zelle die Energie einfallender Photonen zur Herstellung von Speicherstoffen. Dabei werden stamm- und speziesspezifisch bevorzugt entweder Kohlenhydrate oder Lipide akkumuliert. Unter substratreichen also günstigen Wachstumsbedingungen werden überwiegend funktionelle Lipide wie Membranlipide gebildet. In den Zellen überwiegen mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie, beim Beispiel von *Chlorella vulgaris*, die Linolsäure (C18:2) oder alpha-Linolensäure (C18:3). Ungünstige Bedingungen wie das Wachstum unter Stickstofflimitierung begünstigen die Anreicherung von gesättigten oder einfach ungesättigten Fettsäuren als Energiespeicher. Eine Anreicherung von Kohlenhydraten in Form von Stärke wird ebenfalls durch stickstofflimitiertes Wachstum begünstigt. Eine Limitierung der Substrate Phosphat und Eisen oder ungünstige Temperaturen rufen ähnliche Effekte hervor [43–45].

Ein für Cyanobakterien charakteristisches Makromolekül ist das stickstoffhaltige Speicherpolymer Cyanophycin. Cyanophycin wird mit Hilfe des Enzyms Cyanophycin-Synthetase (cphA) gebildet, ist zusammengesetzt aus äquimolaren Mengen L-Arginin und L-Asparaginsäure und besitzt eine Masse zwischen 25 - 100 kDa [46,47]. Das bei einem neutralen pH-Wert zwischen 7 - 8 unlösliche Biopolymer weist in einer stark sauren und basischen Umgebung ($\text{pH} \leq 2$ und $\text{pH} \geq 9$) eine gute Löslichkeit auf [46,48]. Der Cyanophycingehalt einer Zelle hängt von den Kultivierungsbedingungen ab. Unter für die Zelle günstigen Wachstumsbedingungen liegt der Cyanophycingehalt meist unterhalb 1 % pro Biotro-

ckenmasse. Eine Akkumulation tritt vor allem unter Stressbedingungen wie beispielsweise einer vorherrschenden Substratlimitierung auf. Limitierungen der Nährstoffe Phosphat oder Sulfat führen zu einer Erhöhung des Cyanophycingehalts auf bis zu 18 % der Biotrockenmasse. Da langfristige Substratlimitierungen eine Reduzierung der Wachstumsrate zur Folge haben, ist eine Cyanophycin-Anreicherung häufig bei einem Übergang in die stationäre Wachstumsphase zu beobachten [49–51]. Mit einem genetisch modifizierten Stamm des Wildtyps *Synechocystis* sp. PCC6803 wurden unter Phosphatlimitierung sogar Anteile von über 50 % pro Biotrockenmasse erreicht, siehe Abbildung 2.3 [20]. Zusätzlich können die Temperatur sowie die Lichtverfügbarkeit die Akkumulation von Cyanophycin beeinflussen [52].

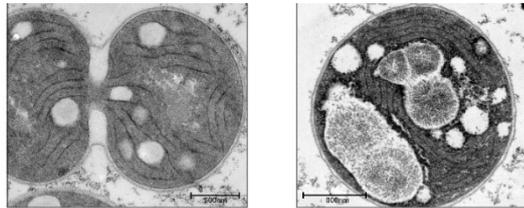


Abbildung 2.3: Ausbildung von Cyanophycin-Granula bei phosphatlimitiertem Wachstum in *Synechocystis* sp. PCC6803, links, und dem genetisch modifizierten Stamm *Synechocystis* sp. BW86, rechts; Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahmen entnommen aus Watzler et al. [20].

2.2 Prozessführungsstrategien

Verwendete Prozessbedingungen wie die Photonenflussdichte und die Substratkonzentration, aber auch die eingestellte Temperatur und Begasungsrate, haben einen erheblichen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die makromolekulare Zusammensetzung photoautotroph kultivierter Zellen, siehe Kapitel 2.1. Aus diesem Grund müssen die Prozessbedingungen und die Prozessführungsstrategie an den jeweiligen Stamm und das Produkt adaptiert werden. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Prozessführungsstrategien wie Chargenprozess, repetitiver Chargenprozess und kontinuierlicher Betrieb sowie konventionelle Photobioreaktorsysteme behandelt.

2.2.1 Diskontinuierliche und kontinuierliche Prozesse

Der Chargenprozess als diskontinuierliches Produktionsverfahren ist technisch am einfachsten zu realisieren. Nach Vorlage der notwendigen Substrate bzw. des Mediums und Einbringung des Inokulums werden dem Reaktor, abgesehen von Titrationsmittel sowie dem Ein- und Austrag von Gasen, keine weiteren Stoffströme zugeführt. Das Reaktorvolumen wird als konstant angenommen, vgl. Abbildung 2.4. Am Ende des Prozesses wird zur Vorbereitung der nächsten Charge der Reaktor entleert und das Reaktorsystem gereinigt. Um die Rüstzeit für Reaktoraufbau und -abbau zu reduzieren besteht die Möglichkeit, den Chargenprozess repetitiv zu fahren. Dabei wird am Ende der Fermentation ein kleiner Teil der Kulturbrühe als Inokulum im Reaktor belassen, bevor das System mit frischem Medium befüllt wird,

siehe Abbildung 2.4. Auch hier wird das Reaktorvolumen während der Kultivierung als konstant angenommen [34,53]. Basierend auf der allgemeinen Formel zur Beschreibung der Konzentrationsgradienten von Fermentationsprozessen, siehe Gleichung 3.2 aus Kapitel 3.3.1, lässt sich für die Konzentration der Biotrockenmasse c_X während eines Chargenprozesses als Gleichung 2.3 formulieren mit der spezifischen Wachstumsrate μ . Analog zu Gleichung 2.3 lässt sich die zeitabhängige Konzentration des Produkts beschreiben sowie - mit negativem Vorzeichen - die Abnahme der Substratkonzentration [34,54].

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \quad 2.3$$

Eine weitere Prozessführungsstrategie ist die kontinuierliche Fermentation von Mikroorganismen. Die kontinuierliche Zufuhr von frischem Medium und Abfuhr von Kulturbrühe sorgt für eine gleichbleibende Nährstoff- und Biotrockenmassekonzentration. Makroskopische Zustandsänderungen werden dadurch eliminiert. Dieser wesentliche Vorteil ermöglicht es, Fermentationen im Fließgleichgewicht durchzuführen bei gleichzeitig konstantem Reaktorvolumen während der gesamten Prozesszeit (siehe Abbildung 2.4). Der quasistationäre Zustand erlaubt die Bestimmung sämtlicher Stoffflüsse [34,54]. In Kapitel 3.3.1 ist beispielhaft die Bilanzierung eines kontinuierlichen Prozesses zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate aufgeführt. In der Bioverfahrenstechnik wurden verschiedene Varianten kontinuierlicher Prozesse etabliert, von denen drei Betriebsmodi im Folgenden genauer erläutert werden.

(i) Chemostat:

Manuelle Steuerung der Verdünnungsrate mit einer kontinuierlichen Fluss- bzw. Pumprate des Nährmediums. Es stellt sich eine konstante Ionen- bzw. Stoffkonzentration ein. Der Mess- und Regelungsaufwand ist aufgrund des Nichtvorhandenseins einer Messgröße gering [55].

(ii) Turbidostat:

Automatische Regelung der Stellgröße „Verdünnungsrate“ mit einer in Abhängigkeit von der Messgröße „Trübung“ variierenden Fluss- bzw. Pumprate des Nährmediums. Es stellt sich eine konstante Biomassekonzentration ein. Der Mess- und Regelungsaufwand ist aufgrund der automatisierten Regelung hoch [55].

(iii) Luminostat:

Spezialfall des Turbidostaten, bei dem die automatische Regelung der Stellgröße „Verdünnungsrate“ in Abhängigkeit von der Messgröße „(transmittierte) Lichtintensität“ erfolgt [56]. Abbildung A3 und Abbildung A4 zeigen schematisch den Versuchsaufbau eines Luminostaten.

Aufgrund des höheren Mess- und Regelungsaufwands für Turbidostat und Luminostat werden diese Betriebsmodi in der Industrie bisher kaum verwendet [55]. Für die Fermentation photoautotropher Mik-

roorganismen sind diese Prozesse jedoch vielversprechend. Die Gewährleistung einer konstanten Biomassekonzentration und somit einer konstanten Lichtverteilung über den Reaktorquerschnitt ermöglicht hohe Wachstumsraten während des gesamten Prozessverlaufs [56].

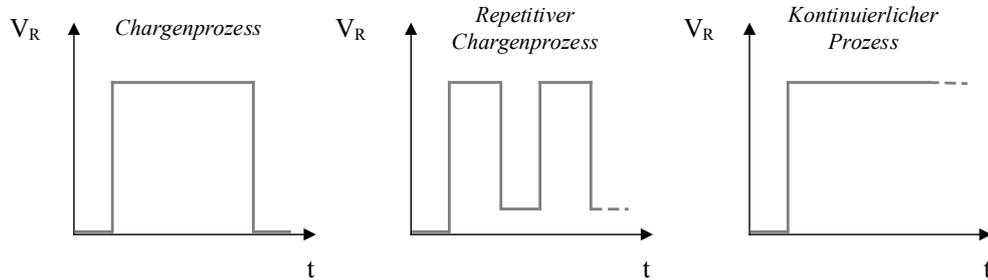


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Reaktorvolumens V_R über der Prozesszeit t in einem Chargenprozess, repetitiven Chargenprozess und kontinuierlichen Prozess [34,53].

2.2.2 Photobioreaktoren

Bioreaktoren lassen sich allgemein als abgegrenzte Reaktionsräume definieren, in denen mit Hilfe von Biokatalysatoren Stoffumwandlungen erfolgen. Dabei fungiert die einzelne Zelle als Biokatalysator und bildet das kleinste Kompartiment des Reaktionsraumes. Die Zellen stellen außerdem die Festphase dar und bilden zusammen mit dem Medium als Flüssigphase und der Zuluft als Gasphase die drei Phasen eines Bioreaktors. Im Medium gelöste Nährstoffe werden über die Flüssigphase zu den Zellen transportiert. Der Stoffübergang zwischen Gas- und Flüssigphase ermöglicht den Ein- bzw. Austrag von O_2 und CO_2 . Um diesen Massentransfer auch bei hohen Zelldichten zu ermöglichen, ist eine gute Durchmischung erforderlich. Zur Temperierung des Reaktorsystems ist ein ausreichender Wärmeübergang notwendig. Neben diesen technischen Herausforderungen für klassische Bioreaktoren unterscheidet sich der Photobioreaktor dadurch, dass für die Energieversorgung der Zellen zusätzlich der Lichteintrag berücksichtigt werden muss. Außerdem ist üblicherweise ein erhöhter CO_2 -Anteil in der Gaszufuhr nötig, um eine ausreichende Kohlenstoffverfügbarkeit zu garantieren [16,34,57]. Eine ausreichende Versorgung mit Licht ist aufgrund zellbedingter Absorptions- und Streueffekte - und der damit zusammenhängenden Ausbildung eines inhomogenen Lichtfelds - eine besondere Herausforderung bei der Konstruktion von Photobioreaktoren [16,58]. Aus diesem Grund werden bei der Konstruktion von Photobioreaktoren bevorzugt Reaktorgeometrien angestrebt, die eine homogene Lichtverteilung ermöglichen [14,16,59–61]. Die Lichtverteilung in einem Photobioreaktor unter Berücksichtigung der Biomasse und der Lichteindringtiefe wird durch das Gesetz von Lambert-Beer beschrieben (Gleichung 4.2). Eine Adaption dieser Modellgleichung ist allerdings notwendig, um Streu- und Absorptionseffekte zu berücksichtigen, vgl. Kapitel 4.2.1 [4,62,63]. Abbildung 3.1 zeigt die Lichtprofile verschiedener Reaktortypen über die Reaktorlänge für verschiedene Biotrockenmassekonzentrationen.

Zu den am häufigsten eingesetzten Photobioreaktoren zählen Platten- und Rohrreaktoren [16]. Außerdem werden für Forschungszwecke des Öfteren Rührkesselreaktoren verwendet [64]. Alle drei Reaktortypen zählen zu den geschlossenen Kultivierungssystemen. Auch offene Systeme, wie das offene Becken in Form von sogenannten „open raceway ponds“, sind weit verbreitet, weil sie vergleichsweise günstige Herstellungs- und Produktionskosten aufweisen [4,65]. Neben der Geometrie zählen die Art der Begasung und der Durchmischung zu den Hauptkriterien in denen sich die Reaktorkonzepte unterscheiden. Plattenförmige Photobioreaktoren besitzen eine Blasenbegasung, welche gleichzeitig den Gaseintrag und -austrag sowie die Durchmischung der Kultursuspension gewährleistet [66]. Rohrreaktoren hingegen nutzen meist eine Umwälzpumpe für die Durchmischung, wobei auch hier Systeme mit Blasenbegasung in einer separaten Aufstromsäule, engl. „Riser“, zu finden sind [67]. In offenen Systemen erfolgt die Begasung über die Flüssigkeitsoberfläche, während die Durchmischung mit Hilfe eines Schaufelradantriebs realisiert wird [4]. Typische Kennzahlen verschiedener Photobioreaktorkonzepte sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Neben der Fermentation photoautotropher Mikroorganismen in Flüssigkultur besteht die Möglichkeit der immobilisierten Kultivierung in sogenannten Biofilmreaktoren [68,69]. In dieser Arbeit kamen Platten- und Rührkesselreaktoren zum Einsatz (siehe Kapitel 3.1).

Eine Beurteilung der Effizienz unterschiedlicher Reaktorkonzepte ist mit Hilfe der Photokonversions-effizienz (PCE) möglich. Die PCE berechnet sich aus dem Quotienten der chemisch gebundenen Energie der produzierten Biomasse E_X und der eingestrahnten Lichtenergie E_{Ph} (Gleichung 2.4). Eine präzisere Berechnungsformel der PCE ist in Kapitel 3.3.4 aufgeführt. Je nach Stamm und Reaktordesign ergeben sich dabei abweichende biologische und technische Verluste bzw. PCE-Werte, vgl. Tabelle 2.1.

$$PCE = \frac{E_X}{E_{Ph}} \quad 2.4$$

Die theoretisch maximal zu erreichende PCE bei der Kultivierung unter Sonnenlicht liegt bei 12,4 % und kann beim Auftreten respiratorischer Effekte auf bis zu 5,4 % sinken [4]. Berechnet man die PCE auf Basis der photosynthetisch aktiven Strahlung, also in einem Wellenlängenbereich zwischen 400 - 700 nm, anstatt der Sonnenstrahlung, so ergibt sich ein theoretisches Maximum von bis zu 26,7 % [70]. Die relativ niedrigen Wirkungsgrade sind auf Energieverluste zurückzuführen. Lediglich 45 % des gesamten Sonnenlichtspektrums liegt im photosynthetisch aktiven Bereich und wird von den Lichtsammelkomplexen photoautotropher Organismen absorbiert. Da nur ein Teil der Gesamtenergie der Photonen übertragen werden kann, entsteht ein weiterer Energieverlust von 21 %. Aufgrund des diskreten Energiebedarfs der Reaktionszentren wird bei der Absorption von Photonen mit hohem Energiegehalt die überschüssige Energie als Fluoreszenz dissipiert oder auf Photonen niedrigerer Energie übertragen. Weitere energetische Verluste entstehen bei der Biomassesynthese, der Reflektion von Photonen an der Reaktoroberfläche oder durch respiratorische Effekte [4].

Tabelle 2.1: Typische Kennzahlen konventioneller Photobioreaktorkonzepte mit der Photokonversionseffizienz PCE, der Biotrockenmassekonzentration c_X , der volumetrischen Biotrockenmasseproduktivität $P_{X,V}$, der flächenbezogenen Biotrockenmasseproduktivität $P_{X,A}$ sowie dem Oberflächen-Volumen-Verhältnis $A V^{-1}$ [66,71,72].

System	PCE	c_X	$P_{X,V}$	$P_{X,A}$	$A V^{-1}$
	[%]	[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹ d ⁻¹]	[g m ⁻² d ⁻¹]	[m ² m ⁻³]
Plattenreaktor	1,3 - 6,5	1,7	0,27 - 4,3	19 - 72	10 - 83
Rohrreaktor	1,4 - 6,9	2,1	0,25 - 6,64	19 - 130	22 - 179
Open Pond	1 - 3	0,3	0,04 - 2,5	11 - 27	2,3 - 10

2.3 Strukturierte kinetische Modelle

In einem strukturierten kinetischen Modell werden grundlegende Aspekte der Zellstruktur, -funktion und -zusammensetzung unter Einbeziehung kinetischer Ausdrücke berücksichtigt. Einzelne Reaktionsschritte werden dabei in allgemeine Klassen wie Proteine oder Lipide zusammengefasst, um ein weniger detailliertes Modell zu erhalten und sich auf die wesentlichen Komponenten der Zellen zu konzentrieren. Strukturierte Modelle ermöglichen es somit, die in der Zelle ablaufenden Reaktionen zu simulieren und die Veränderung der Zellbestandteile zu analysieren, vgl. Kapitel 4.2. Unstrukturierte kinetische Modelle, welche die Mikroorganismen als eine einzelne reagierende Spezies betrachten, sind nicht in der Lage, zelluläre Prozesse zu untersuchen [73].

Ein wichtiger Aspekt der Modellerstellung ist die mathematische Beschreibung des Wachstums, des Substratverbrauchs und der Produktbildung. Diese Hauptaufgaben der Zellen sind eng miteinander verknüpft und werden durch die Verfügbarkeit der Substrate beeinflusst. Substrate dienen außerdem der Bereitstellung von Energie für die Zellreaktionen, meist in Form von chemischer Energie des über die oxidative Phosphorylierung gewonnenen ATPs (siehe Abbildung 2.2). Sofern ein Substrat wie Stickstoff nur begrenzt verfügbar ist, wird überschüssige chemische Energie verwendet, um Zellbestandteile zur Energiespeicherung - Kohlenhydrate oder Lipide - zu synthetisieren (vgl. Kapitel 2.1.2). In der Modellerstellung ist es üblich, geschwindigkeitsbestimmende Größen als unabhängige kinetische Ausdrücke zu formulieren und die restlichen Größen mit Hilfe von Massenbilanzen, Elementarbilanzen und stöchiometrischen Verhältnissen auf diese zu beziehen [73,74]. Übliche geschwindigkeitsbestimmende Größen, welche mit kinetischen Modellgleichungen ausgedrückt werden, sind die spezifische Wachstumsrate μ oder die spezifische Substrataufnahmerate r_S . In Tabelle 2.2 sind einige dieser reaktionstechnischen Größen zusammengestellt.

Tabelle 2.2: Makroskopische Prozessvariablen und abgeleitete reaktionstechnische Größen [75].

Makroskopische Prozessvariable	Konzentration	Stoffänderungsgeschwindigkeit		Ausbeutekoeffizient
		Absolut	Spezifisch	
	[g L ⁻¹]	[g L ⁻¹ h ⁻¹]	[h ⁻¹]	[g g ⁻¹]
Biomasse	c _X	R _X = dc _X dt ⁻¹	μ = R _X c _X ⁻¹	-
Substrat	c _S	R _S = dc _S dt ⁻¹	r _S = R _S c _X ⁻¹	Y _{X,S} = R _X R _S ⁻¹ ≈ Δc _X Δc _S ⁻¹
Produkt	c _P	R _P = dc _P dt ⁻¹	r _P = R _P c _X ⁻¹	Y _{P,S} = R _P R _S ⁻¹ ≈ Δc _P Δc _S ⁻¹

2.3.1 Modellgleichungen zur Beschreibung der Wachstumsgeschwindigkeit

Ein in der Photobiotechnologie verbreiteter Ansatz zur Beschreibung der mikrobiellen Wachstumsgeschwindigkeit liefert das Modell von Blackman [76], welches die Photosyntheserate eines hypothetischen Chloroplasten mittels linearer Zusammenhänge wiedergibt. Der Übergang von substratlimitiertem zu substratgesättigtem Wachstum wird durch eine Sättigungskonzentration c_{S,sat} beschrieben. Unterhalb c_{S,sat} besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der spezifischen Wachstumsrate μ und der Substratkonzentration c_S. Oberhalb von c_{S,sat} wird die maximale Wachstumsrate μ_{max} erreicht und die Wachstumsrate ist nicht länger abhängig von der Substratkonzentration. Durch Einführung einer inhibierenden Substratkonzentration c_{S,inh} und einer negativen Geradensteigung m_i besteht außerdem die Möglichkeit, substratinhibiertes Wachstum abzubilden (Gleichung 2.5).

$$\mu = \begin{cases} m \cdot c_S & , \text{für } c_S \leq c_{S,\text{sat}} \\ \mu_{\text{max}} & , \text{für } c_S > c_{S,\text{sat}} \\ -m_i \cdot c_S & , \text{für } c_S \geq c_{S,\text{inh}} \end{cases} \quad 2.5$$

Bei der Kultivierung phototropher Organismen sind die Lichtverfügbarkeit und die Lichteindringtiefen zentrale Einflussfaktoren, da bereits bei geringen Biotrockenmassekonzentrationen eine Lichtlimitierung vorliegt (siehe Abbildung 3.1). Aus diesem Grund erfolgt die Auftragung der spezifischen Wachstumsrate in der Regel über die Lichtintensität oder verwandte Größen. Für photoakklimatisierte Mikroalgen im quasistationären Zustand ergibt sich ein an das Modell von Blackman [76] angelehnter Verlauf. Diese in der Literatur als „Photosynthesis-Irradiance-Curve“ (PI-Kurve) bezeichnete Darstellung liefert eine prozessrelevante Wachstumsrate und berücksichtigt die Kinetik der Photosysteme sowie der enzymatischen Stoffumsätze. Die PI-Kurve ist in drei Bereiche gegliedert: 1. lichtlimitiertes Wachstum, 2. lichtgesättigtes Wachstum und 3. lichtinhibiertes Wachstum (Abbildung 2.5).

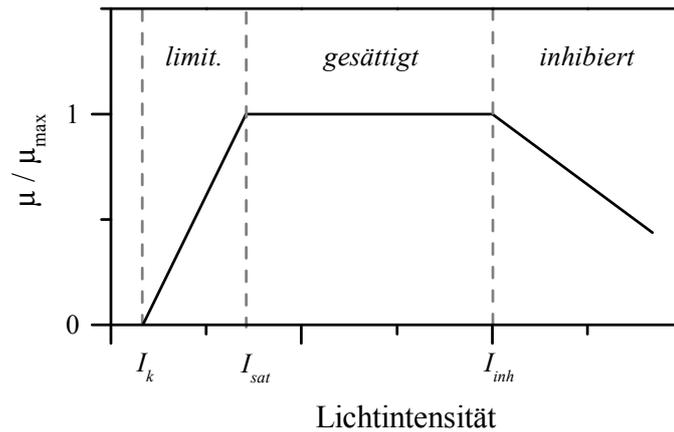


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der spezifischen Wachstumsrate μ einer photoaklimatisierten Mikroalge in Abhängigkeit von der Lichtintensität (PI-Kurve) mit den charakteristischen Größen Lichtkompensationspunkt I_k , Sättigungsintensität I_{sat} und inhibierende Lichtintensität I_{inh} .

In Bereich 1 ist die Wachstumsrate durch den Energieeintrag der Photonen limitiert. Eine Lichtintensität unterhalb des Lichtkompensationspunkts I_k kann aufgrund der Zellatmung zu einem „negativen Wachstum“ - also dem Verlust von Biomasse - führen, vgl. Kapitel 2.1.2. Bereich 2 beginnt für Lichtintensitäten oberhalb der Lichtsättigung I_{sat} , hier wird maximales Wachstum erreicht. Enzymatische Reaktionen der Dunkelreaktion der Photosynthese bilden die Restriktion der Wachstumsrate μ , vgl. Kapitel 2.1.1. Überschüssige Photonen werden in Form von Wärme und Fluoreszenz dissipiert. Steigt die Lichtintensität über I_{inh} , verringert sich die Wachstumsrate aufgrund einer Schädigung des Photosyntheseapparats [4]. Die Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate von der auf dem Reaktor auftreffenden Photonenflussdichte wird in Kapitel 4.1.1 für die Mikroalge *Chlorella vulgaris* oder in Kapitel 4.1.2 für das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. behandelt. Den optimalen Betriebspunkt für Photobioreaktoren liefert die Lichtintensität I_{sat} , da hier lichtgesättigtes und maximales Wachstum vorherrscht.

Mit Ausnahme des linearen Blackman-Modells aus Gleichung 2.5 basieren viele Ausdrücke zur Beschreibung der Wachstumsgeschwindigkeit von Mikroorganismen in Abhängigkeit eines zur Verfügung stehenden Substrats auf sigmoidalen Modellen der Enzymkinetik [77,78]. Eine einfache und weit verbreitete Gleichung, welche die Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms in Abhängigkeit von der reaktionsbestimmenden Substratkonzentration beschreibt, ist die Enzymkinetik nach Michaelis-Menten [77]. Unter der Annahme, dass die geschwindigkeitsbestimmende enzymatische Reaktion geschwindigkeitsbegrenzend für die gesamte Zelle ist, lässt sich eine sehr ähnliche Gleichung formulieren (Gleichung 2.6). Dabei wird angenommen, dass nur ein Substrat limitierend wirkt und die anderen im Überschuss vorliegen.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{k_S + c_S} \quad 2.6$$

Diese als Monod-Gleichung bekannte Kinetik beschreibt die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ der Zellen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration c_S . Für hohe Substratkonzentrationen nähert

sich die spezifische Wachstumsrate der maximalen Wachstumsrate μ_{\max} . Die Sättigungskonstante k_S definiert außerdem die kritische Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Wachstumsrate erreicht wird. Monod bildete außerdem den Zusammenhang von μ und der Substrataufnahmerate r_S mit Hilfe des Ausbeutekoeffizienten $Y_{X,S}$ ($\mu = Y_{X,S} \cdot r_S$, vgl. Tabelle 2.2) [78]. Um den Erhaltungsstoffwechsel zu berücksichtigen, wird dieser Ausdruck üblicherweise um einen sogenannten „Maintenance“ Term μ_e nach Pirt [79], Marr et al. [80] oder Uden [81] erweitert ($\mu = Y_{X,S} \cdot r_S - \mu_e$). Aus thermodynamischer Sicht repräsentiert μ_e den Energieverbrauch der Zelle für Reaktionen, welche nicht der Synthese von Zellmaterial dienen. Viele Arbeiten bestätigten die Notwendigkeit von μ_e zur Bestimmung der minimalen Substratkonzentration unter welchen das Zellwachstum gerade noch möglich ist ($\mu \geq 0 \text{ d}^{-1}$) [82–84]. Basierend auf Gleichung 2.6 wurden verschiedene Varianten entwickelt, um mikrobielles Wachstum mathematisch zu definieren z.B. zur Darstellung substratinhibierender Effekte [85–88].

Das zuvor behandelte Blackman-Modell ist ebenfalls befähigt, einen Maintenance Term darzustellen. Durch Implementierung eines Achsenabschnittes in die erste Geradengleichung entsteht ein mit dem Ansatz von Pirt [79] vergleichbarer Ausdruck: $\mu = m \cdot c_S - \mu_e$, für $c_S \leq c_{S,\text{sat}}$. In Kapitel 4.1 sind Approximationen experimenteller Daten sowohl mit Hilfe der Monod-Gleichung als auch mit dem Blackman Modell zu finden. Für umfassende Ausführungen zum Thema Wachstumskinetiken wird auf weiterführende Literatur verwiesen [73,75,89,90].

2.4 Statistische Verfahren zur Versuchsplanung

Die klassische Versuchsplanung verwendet entweder die heuristische Methode „Versuch und Irrtum“ („trial and error“) oder untersucht die Auswirkung auf das System durch Veränderung jeweils eines Faktors („one factor at a time“). Im Gegensatz dazu liegt bei der statistischen Versuchsplanung („Design of Experiments“) eine simultane Herangehensweise vor, in welcher die Versuche systematisch geplant und statistisch ausgewertet werden. Mehrere Faktoren werden gleichzeitig verändert, was den Versuchsumfang und somit den Zeit- und Arbeitsaufwand im Vergleich zu den klassischen Methoden reduziert. Statistische Versuchspläne lassen sich in Auslesetests - „screening design“ - in Antwortflächenmethoden - „response surface model“ - sowie in gemischte Versuchspläne unterteilen. Auslesetests dienen der Untersuchung einer großen Anzahl von Faktoren mit geringem Versuchsumfang. Über Antwortflächenmethoden können Zusammenhänge zwischen wenigen Faktoren untersucht und optimale Einstellungen ermittelt werden, wobei die ausgewählten Faktoren üblicherweise mit einem vorangegangenen Auslesetest identifiziert wurden. Der Optimierung folgt die Methodvalidierung durch den Test auf Robustheit, indem die Auswirkung geringfügiger Änderungen der Faktoren evaluiert wird [91].

Ein gängiger Auslesetest ist der sogenannte Teilfaktorplan („Fractional Factorial Design“). Die zu untersuchenden Faktoren werden in einem orthogonalen Feld auf zwei Ebenen, Minus (-) und Plus (+),

getestet, siehe Abbildung 2.6. Im Gegensatz zu einem vollständig faktoriellen Versuchsplan (Vollfaktorplan, „Full Factorial Design“) wird im Teilfaktorplan eine verminderte Anzahl an möglichen Faktorkombinationen und -ebenen untersucht. Ergeben sich beispielsweise in einem Vollfaktorplan mit zwei Ebenen f und drei Faktoren k insgesamt $f^k = 2^3 = 8$ Experimente, so halbiert sich im Teilfaktorplan die Anzahl auf $f^{k-1} = 2^{3-1} = 4$ Experimente. Dies ist möglich, da ein Teil der Versuche mit Hilfe statistischer Methoden durch Interaktionen der Faktoren dargestellt werden. Bei der Untersuchung von drei Faktoren k_i werden die Ebenen (- und +) des dritten Faktors k_3 in Abhängigkeit von der Interaktion zwischen dem ersten und zweiten Faktor beschrieben: $k_3 = k_1 \cdot k_2 = (-1) \cdot (-1) = +1$. Der Nachteil von Teilfaktorplänen ist die Vermengung; beobachtete Effekte stellen in Wirklichkeit die Summe mehrerer Effekte und Wechselwirkungen dar. Das Einfügen eines sogenannten Centerpoints als ergänzendes Experiment erhöht jedoch die Genauigkeit des linearen statistischen Modells. Centerpoints geben ein Maß für die Stabilität und Variabilität an und weisen auf potentielle quadratische Effekte hin [91,92].

Das mathematische Modell der statistischen Antwortflächenmethoden basiert auf einem quadratischen Polynom, welche eine Beschreibung von Zweifachwechselwirkungen der Faktoren erlaubt [91]. Eine Variante dieses Modells ist das sogenannte „Central Composite Design“ (CCD). Es beinhaltet einen Vollfaktorplan mit zwei Ebenen, einen Centerpoint sowie ein „Stern-Design“ und ermöglicht die Untersuchung jedes Faktors auf fünf verschiedenen Ebenen. Oft geht das Stern-Design über die Grenzen der tatsächlich untersuchten Ebenen hinaus, weswegen oft das „face-centered“ CCD angewendet wird. Als Optimalitätskriterium wird die I-Optimalität verwendet um die Varianz des Vorhersagemodells möglichst gering zu halten. Bei den Ausleseverfahren wird hingegen ein D-optimales Design verwendet, um die auftretenden Effekte zu schätzen und die Signifikanz ausgewählter Faktoren zu bestimmen [92–94].

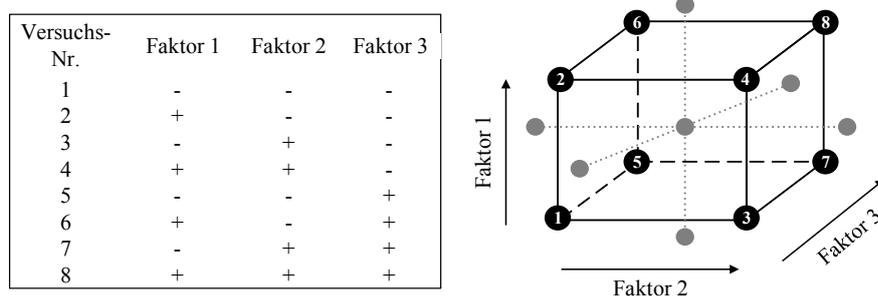


Abbildung 2.6: Orthogonales Feld eines 2^3 -Vollfaktorplans für drei Faktoren mit zwei Ebenen (- und +) (links); geometrisches Modell eines „Central Composite Designs“ (rechts) für drei Faktoren mit zwei Ebenen (- und +), welches einen Vollfaktorplan (schwarz), einen Centerpoint und ein Stern-Design (grau) beinhaltet [92].

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Mikroorganismenkultur

3.1.1 Mikroorganismen

Insgesamt kamen drei Mikroalgenstämme und zwei Cyanobakterienstämme zum Einsatz. Die Mikroalgenstämme wurden von der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG) bezogen, darunter die Grünalgen *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 und *Nannochloropsis limnetica* SAG 18.99 sowie die Kieselalge (Diatomee) *Phaeodactylum tricornutum* SAG 1090-1b. Die Cyanobakterienstämme - der Wildtyp *Synechocystis* sp. PCC6803 sowie die Mutante *Synechocystis* sp. BW86 - wurden von der Stammhaltung der Universität Tübingen vom Interfakultären Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin, Abteilung Organismische Interaktionen, bezogen. Der genetisch modifizierte Stamm *Synechocystis* sp. BW86 besitzt eine P_{II}-I86N Punktmutation im P_{II} Signalprocessorprotein, was zu einer erhöhten Akkumulation von Arginin bzw. des Biopolymers Cyanophycin unter substratlimitierten Wachstumsbedingungen führt [20].

3.1.2 Medien

Sämtliche Chemikalien waren von analysenreiner Qualität (p.a.) und wurden von Carl Roth, Sigma Aldrich, VWR Chemicals oder Merck erworben. Zur Kultivierung von *Chlorella vulgaris* wurde ein modifiziertes TRIS-Acetat-Phosphat (TAP) Medium nach Gorman und Levin [95] und Hutner [96] ohne Zugabe von Acetat eingesetzt. Bei Verwendung einer pH-Regelung wurde zudem auf TRIS als Puffersubstanz verzichtet. Die Zusammensetzung ist Tabelle A1 zu entnehmen. Für *Phaeodactylum tricornutum* wurde ein Basismedium (M&M) nach Mann und Myers [97] verwendet, vgl. Tabelle A2. Eine Zugabe von 3,15 g L⁻¹ TRIS trug in der Vorkulturführung zur Stabilisierung des pH Wertes bei. Die Experimente mit den Stämmen *Nannochloropsis limnetica* und *Synechocystis* sp. wurden in Blue-Green Medium (BG-11) nach Rippka et al. [98] durchgeführt; dessen Zusammensetzung ist in Tabelle A3 beschrieben. Für die Versuche in Mini-Plattenreaktoren, vgl. Kapitel 4.1.2, bzw. die Vorkulturführung wurde das BG-11 Medium mit 0,4 mol L⁻¹ HEPES bzw. mit 0,4 mol L⁻¹ HEPES und 0,2 mol L⁻¹ NaHCO₃ ergänzt.

3.1.3 Stammhaltung und Vorkultur

Zur Stammhaltung wurden *Chlorella vulgaris* und *Phaeodactylum tricornutum* in SAG Schrägagarröhrchen auf einem LED Beleuchtungsmodul bei 21 °C und einer Photonenflussdichte von 10 µmol m⁻² s⁻¹ gelagert. *Nannochloropsis limnetica* und *Synechocystis* sp. wurden unter denselben Bedingungen gelagert, jedoch auf BG-11 Agarplatten, 1 % Agar (w/w), ausplattiert. Die Vorkulturen der Experimente wurden unter sterilen Bedingungen in 500 mL Erlenmeyerkolben mit einem Füllvolumen des jeweiligen

Mediums von 200 mL in Suspension gehalten. Die Kolben wurden auf einem Rotationschüttler (KS 501digital, IKA Werke GmbH, Schüttelfrequenz 100 rpm) in einem Kühlbrutschrank (MKK1200, Flohr Instruments) inkubiert. Jeder Kolben wurde von unten mit warm-weißen LEDs (MS6L083AT, Nichia, Japan) durch ein separat ansteuerbares LED-Feld beleuchtet. Die Kultivierungsbedingungen für Temperatur und Photonenflussdichte betragen 25 °C und 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für *Chlorella vulgaris*, 25 °C und 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für *Nannochloropsis limnetica*, 21 °C und 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für *Phaeodactylum tricornutum* sowie 25 °C und 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für *Synechocystis* sp.. Alle 1 bis 2 Wochen wurden 5 mL der Vorkulturen in frische Kolben überführt. Im Zyklus von 4 bis 6 Monaten wurden die Submerskulturen durch Überimpfung aus dem Schrägagarröhrchen oder der Agarplatte erneuert.

Weiterhin bestand die Möglichkeit, die Kolben aktiv zu begasen, um parallele Experimente im kleinen Maßstab durchzuführen, vgl. Kapitel 4.3.1 und 4.3.2. Hierfür wurden Gummistopfen mit sterilen Anschlüssen für Zu- und Abluft sowie einer Probenentnahmevorrichtung montiert. Für die Kultivierungen wurde bei einer Photonenflussdichte von 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pro Kolben ein Volumenstrom von 20 mL min^{-1} mit einem CO₂-Anteil von 5 % (v/v) mit Hilfe von Massendurchflussreglern (Mass-Flow Controller, MKS Instruments) eingestellt. Die Photonenflussdichte der LED-Einheit wurde mittels eines planaren Lichtsensors (LI-250, LI-Cor, USA) am Innenboden der Kolben justiert. Nach Erreichung der CO₂-Sättigung wurde die Vorkultur in zuvor autoklavierte Kolben inokuliert.

3.1.4 Rührkesselreaktor

Als Rührkesselreaktor stand ein Laborfermenter der Firma BioEngineering AG (Modell KLF 2000) bereit, welcher mit einem Arbeitsvolumen von 1,7 L betrieben wurde. Die Dispersion und Agitation der Kulturbrühe geschah durch zwei Rushton-Turbinen mit 6 Flügeln bei einer Drehzahl von 250 rpm. Der Gaseintrag erfolgte über einen Gasverteilermodul mit eingebauten Strombrechern. Massendurchflussregler regulierten einen Volumenstrom von 95 mL min^{-1} mit einem CO₂-Anteil von bis zu 5 % (v/v). Für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid wurde unter diesen Bedingungen ein k_{La} -Wert von 0,165 min^{-1} , basierend auf der „Gassing-in“ Methode für Flüssigkeiten von Sobotka et al. [99], und 0,148 min^{-1} , basierend auf der Umrechnung von Talbot et al. [100] und dem Diffusionskoeffizienten für CO₂ bei 25 °C von Armstrong [101], ermittelt. Der austretende Abgasstrom wurde mit Hilfe eines Abgas-Messsystems (Mutor 610, Maihak) analysiert. Weiterhin bestand die Möglichkeit über einen pO₂ Sensor (VisiFerm DO Arc 120, Hamilton) den im Medium gelösten Sauerstoffgehalt zu messen. Ein mit Kollimatorlinsen versehenes LED-Modul (6° Abstrahlwinkel, IMM Photonics GmbH, Unterschleißheim, Germany), bestehend aus zwei Halbschalen, umschloss den Glaszylinder des Reaktors vollständig und sorgte für die Beleuchtung der Kulturbrühe. Die Kalibrierung des LED-Moduls erfolgte mit dem planaren Lichtsensor an der Innenseite des Glaszylinders. In der Decken- und Bodenplatte des Rührkessels waren diverse Anschlussmöglichkeiten für Messsonden und weitere Peripherie gegeben. Die Temperierung erfolgte

mittels eines Heiz- und Kühlstabes, welche zusammen mit der Rührerwelle über den dazugehörigen Steuerschrank angesteuert und geregelt wurden. Die Datenaufzeichnung und Regelung weiterer Parameter erfolgte durch das LabView basierte Prozesssteuerungssystem BioProCon. Die pH-Messung verlief über eine potentiometrische pH-Messung (Hamilton Polylite plus) und wurde mittels eines P-Reglers durch Laugenzugabe, meist 1M NaOH, eingestellt. Bei Experimenten mit simuliertem Tag-Nacht-Verlauf wurde der pH Wert zusätzlich mittels PI-Regler über den CO₂-Anteil im Zugas geregelt. Die Regelparameter $K_p = 32,18 \text{ mL min}^{-1}$ und $T_I = 5,63 \text{ min}$ wurden in Vorversuchen nach der Auswertemethode von Ziegler und Nichols berechnet mit einer Totzeit von 101,36 s (Kapitel 3.3.5). Vor Versuchsbeginn wurde das zusammengebaute Reaktorsystem bei 121 °C für 20 min autoklaviert (SIP, Sterilization in Place). Flaschen mit Vorlagemedien wurden separat autoklaviert und zusammen mit der Vorkultur steril angeschlossen.

Ein Messsystem bestehend aus einer Lichtquelle (AVALight-Hal-S, Avantes) und einem Diodenarray Detektor (AvaSpec-3648, Avantes) ermöglichte die Aufzeichnung der optischen Dichte bei verschiedenen Wellenlängen. Mit Hilfe eines PI-Reglers konnte eine kontinuierliche Betriebsweise als Turbidostat mit der optischen Dichte bei 750 nm (OD_{750}) als Regelgröße und der Pumprate an frischem Medium als Stellgröße durchgeführt werden. Die Einstellgrößen des PI-Reglers wurden aus einer früheren Arbeit übernommen mit $K_p = 90 \text{ mL min}^{-1} OD_{750}^{-1}$ und $T_I = 200 \text{ min}^{-1}$ [102].

Bedingt durch die zylindrische Geometrie werden im Rührkesselreaktor die eingestrahnten Photonen für ausreichend geringe Biomassekonzentrationen in Richtung Reaktormitte fokussiert, statt wie im Falle eines einseitig beleuchteten Plattenreaktors der exponentiellen Abschwächung zu folgen, vgl. Abbildung 3.1, links und mittig. Somit kann bei geeignetem Verhältnis von Biomassekonzentration bzw. Lichtabsorption und Photonenflussdichte ein homogenes Lichtprofil über den Reaktorquerschnitt ausgebildet werden. *Chlorella vulgaris* erreichte diesen Betriebspunkt für $c_X = 0,3 \text{ g L}^{-1}$. Rechnerisch ergibt sich der optimale Betriebspunkt, bei dem die Änderung des Lichtprofils minimal wird, durch Ableitung von Gleichung 4.5; es resultiert $\varepsilon \cdot c_X = 45 \text{ m}^{-1}$ [102]. Die Messung des Lichtprofils wurde mit einem sphärischen Lichtsensor (QSL-2101, Biospherical Instruments) durchgeführt, vgl. Abbildung 3.1, rechts. Da Gleichung 4.5 keine Streueffekte an den Zellen berücksichtigt, ergibt sich für den optimalen Betriebspunkt in der Realität ein homogeneres Lichtfeld.

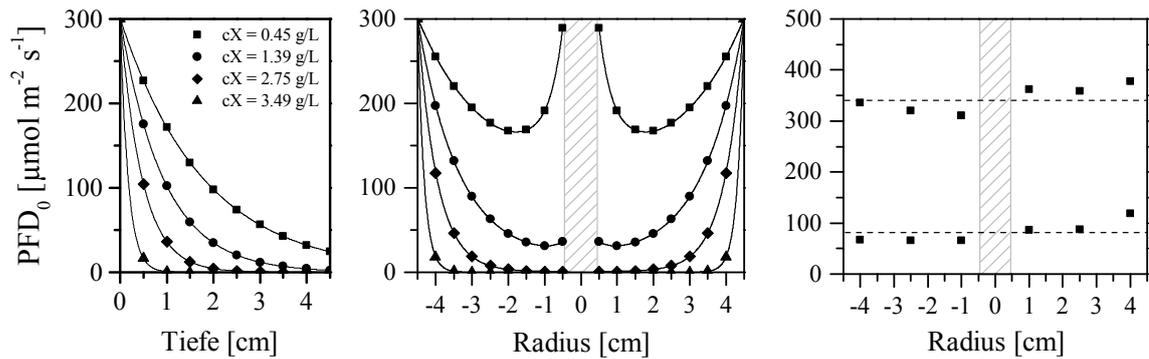


Abbildung 3.1: Lichtprofile von *Chlorella vulgaris* in einem Plattenreaktor nach Gleichung 4.2 (links) und einem Rührkesselreaktors nach Gleichung 4.5 (mittig) für gemessene Extinktionskoeffizienten und verschiedene Biomassekonzentrationen c_X ; sowie gemessene Lichtprofile für zwei verschiedene Photonendichten des Rührkesselreaktors bei einer Biotrockenmassekonzentration von $0,3 \text{ g L}^{-1}$ und einem spezifischen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon \cdot c_X = 55 \text{ m}^{-1}$ (rechts). Die Grau schattierte Fläche markiert die Rührwelle, die horizontal gestrichelten Linien die durchschnittliche Photonendichte.

3.1.5 Mini-Plattenreaktor

Mini-Plattenreaktoren bestehen an jeweils Front- und Rückseite aus Borosilikat Glasscheiben, welche durch eine Decken- und Bodenplatte sowie zwei Seitenteile aus Edelstahl umfasst werden. Die Innenmaße betragen $140 \times 100 \times 20 \text{ mm}$ (H x B x T). Eine an der Bodenplatte eingelegte PTFE-Membran, Porengröße $1 \mu\text{m}$ (THOMAPOR-PTFE-Sinternelemente, Reichelt Chemietechnik), ermöglicht den Gaseintrag und die Durchmischung der Kulturbrühe. Der Volumenstrom pro Reaktor betrug 50 mL min^{-1} mit einem CO_2 -Anteil von 5% (v/v) und wurde über Massendurchflussregler gesteuert. Weiterhin verfügte jede Mini-Platte über ein separat ansteuerbares Beleuchtungsmodul mit je 60 warm-weißen LEDs im Abstand von 10 cm . Eingebaute Kollimatorlinsen (Abstrahlwinkel 6° , IMM Photonics GmbH, Unterschleißheim, Germany) sorgten für eine homogene Bestrahlung des Plattenreaktors. Die Kalibrierung der Beleuchtungsmodule erfolgte mit Hilfe des planaren Lichtsensors an der Innenseite der ersten Glasscheibe. Die Midi-Plattenreaktoren wurden zur Aufnahme einer Lichtkinetik für *Synechocystis* sp. PCC6803 eingesetzt, vgl. Kap. 4.1.2. Das Füllvolumen betrug 200 mL bei einer Temperatur von $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Mini-Platten wurden in einem Kühlbrutschrank inkubiert. Durch den Einbau eines Sterilfilters in der Zuluft- und Abluftstrecke ($0,2 \mu\text{m}$, Minisart SRP15, Sartorius) sowie die Autoklavierung des Reaktorsystems vor Versuchsbeginn wurden sterile Versuchsbedingungen gewährleistet. Nach Einstellung der CO_2 -Sättigung erfolgte die Inokulation der Vorkultur. Ein System aus sechs Mini-Plattenreaktoren ermöglichte die parallele Untersuchung des Einflusses verschiedener Photonendichten.

3.1.6 Midi-Plattenreaktor

Der Aufbau von Midi-Plattenreaktoren entspricht dem, der in Kapitel 3.1.5 beschriebenen Mini-Plattenreaktoren. Die größere Bauform mit den Innenmaßen $350 \times 200 \times 20 \text{ mm}$ (H x B x T) erhöht jedoch den Umfang der Deckenplatten-Anschlüsse. Im Vergleich zu den Mini-Plattenreaktoren können so, neben einem Abgasschlauch und einer Probenentnahmeverrichtung, auch Sonden zur pH- und Temperatur-

Regelung mittels P-Regler sowie Vorrichtungen zur Antischaum- oder Medienzugabe integriert werden. Die separat ansteuerbaren Beleuchtungsmodule bestrahlen den Plattenreaktor von der Frontseite in einem Abstand von 15 cm und sind bestückt mit je 322 warm-weißen LEDs inklusive Kollimatorlinsen. Eine Kalibrierung der Beleuchtungsmodule mit dem planaren Lichtsensor an der Innenseite der ersten Glasscheibe ermöglichte eine beliebige Variation der Photonenflussdichte. Die Temperierung erfolgte über einen Kühlkreislauf und einem elektrischen Heizelement in den Seitenteilen der Midi-Plattenreaktoren. Massendurchflussregler steuerten den Gaseintrag des Luft/CO₂-Gemisches mit einem Volumenstrom von 400 mL min⁻¹ und einem CO₂-Anteil von bis zu 5 % (v/v) pro Reaktor. Vor Reaktoreintritt wurde die CO₂ angereicherte Luft zur Befeuchtung durch eine mit deionisiertem Wasser befüllte Waschflasche geleitet. Die Reaktoren wurden mit einem Füllvolumen von 1,0 L betrieben. Ein RI-Fließbild des Versuchsaufbaus ist in Abbildung A3 gegeben. Sämtliche prozessrelevante Parameter wurden über das LabView basierte Prozesssteuerungssystem BioProCon aufgezeichnet und geregelt. Vor Versuchsbeginn wurde das Reaktorsystem autoklaviert und nach Einstellung der CO₂-Sättigung mit der Vorkultur inokuliert.

Um in den Midi-Plattenreaktoren eine kontinuierliche Betriebsweise analog zu dem Rührkesselreaktor aus Kapitel 3.1.4 zu ermöglichen, wurde eine prozessbegleitende Transmissionsmessung etabliert. Die Messvorrichtung wurde am Seitenelement des Reaktors montiert und beinhaltete eine Photodiode, welche nach Kalibrierung mit dem planaren Lichtsensor an der Außenseite der zweiten Glasscheibe die transmittierte Photonenflussdichte wiedergab. Im Gegensatz zum Rührkesselreaktor aus Kapitel 3.1.4 wurde bei kontinuierlichen Versuchen in Midi-Plattenreaktoren ergo das Prozessmodell Luminostat umgesetzt, welches auf der Messgröße Transmission beruht, vgl. Kapitel 2.2.1. Dabei wurde die Zulaufpumpe (Reglo ICC, Ismatec) über einen PI-Regler gesteuert anhand der Medien-Pumprate als Stellgröße und dem Transmissionssignal als Regelgröße. Die Regelparameter $K_P = 1,07 \text{ mL min}^{-1} \text{ PFD}^{-1}$ und $T_I = 225 \text{ min}^{-1}$ wurden in Vorversuchen mit *Chlorella vulgaris* nach der Auswertemethode von Chien-Hrones-Reswick berechnet (Kapitel 3.3.5). Bei der kontinuierlichen Kultivierung von langsam wachsenden Organismen wie *Phaeodactylum tricornutum* wurden die Regelparameter empirisch angepasst.

3.1.7 Maxi-Plattenreaktor

Der Maxi-Plattenreaktor besteht aus einem Edelstahlrahmen in welchem Polycarbonat-Scheiben mit Abstandhalter aus Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk (EPDM) eingespannt sind. Eine Zentrierschraube in der Mitte des Reaktors bringt zusätzliche Stabilität. Im Querschnitt betrachtet, unterteilt sich das System in ein Kompartiment zur Kultivierung mit den Innenmaßen 924 x 900 x 20 mm (H x B x T) sowie in ein Kompartiment zur Temperierung mit gleicher Bemaßung; zur Temperierung bzw. Kühlung diente zirkulierendes Kühlwasser, welches über einen Wärmetauscher mit einem externen Kühlkreislauf verbunden war. Das Füllvolumen betrug 8,25 L. Zur Beleuchtung wurden warm-weiße LED Spots (je

9W, Sygonix GmbH) im Abstand von 22 cm verwendet, welche eine durchschnittliche Photonenflussdichte von $420 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gewährleisteten. Die Photonenflussdichte wurde an der Außenseite der ersten Scheibe mit dem planaren Lichtsensor gemessen. Eine Begasung der Kulturbrühe sorgte für den Gasaustausch und die Durchmischung. Massendurchflussregler erzeugten einen mit 4 % CO_2 (v/v) angereicherten Luftstrom von insgesamt 400 mL min^{-1} , der über einen Sterilfilter in die Begasungseinheit gelangte. Diese bestand aus zehn 1/8“ Edelstahlrohre mit einer 0,2 mm Begasungsbohrung im unteren Abschnitt der Polycarbonat-Scheibe auf Kultivierungsseite. Im oberen Abschnitt war eine Edelstahleinheit in die Polycarbonat-Scheibe integriert, um die notwendige Peripherie anzuschließen. Ein RI-Fließbild des Versuchsaufbaus ist in Abbildung A4 zu finden. Der Maxi-Plattenreaktor stellte den größten noch autoklavierbaren Reaktor dar. Hierfür wurde das gesamte Reaktorsystem in einem Kammerautoklaven sterilisiert (Systec HX). Nach Einstellung der CO_2 -Sättigung erfolgte die Inokulation mit der Vorkultur. Prozessrelevante Parameter wurden über das LabView basierte Prozesssteuerungssystem BioProCon gesteuert und aufgezeichnet.

Wie beim Midi-Plattenreaktor wurde eine Messvorrichtung zur Bestimmung der Transmission angebracht, um eine kontinuierliche Prozessführung als Luminostat zu realisieren. Die Einstellgrößen des PI-Reglers für den kontinuierlichen Luminostat-Betrieb wurden ebenfalls aus den Midi-Plattenreaktor-Versuchen übernommen, vgl. Kapitel 3.1.6.

3.1.8 Freiland-Plattenreaktor

Der Freiland-Plattenreaktor besteht aus zwei Metallgitterrahmen zwischen denen eine Polyethylen-Tüte eingebracht wird. Im Rahmen dieser Arbeit kam ein Freiland-Plattenreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 230 L, $1.000 \times 6.000 \times 50 \text{ mm}$ (H x B x T) zum Einsatz. Am Boden der Reaktortüte befindet sich eine Begasungsmembran (Perlschlauch, TorQ), durch welche der Gaseintrag mittels Massendurchflussregler erfolgte. Die Belüftungsrate betrug 0,05 vvm bei einem CO_2 -Anteil bis zu 5 % (v/v). Eine Edelstahl-Kopfplatte ermöglichte den Anschluss notwendiger Peripherie und die Temperierung der Kulturbrühe über eine Edelstahl-Kühlschlange. Der Plattenreaktor wurde auf einer Freiland-Versuchsanlage betrieben (KIT - Campus Nord, 49. Breitengrad, Juli/August 2016), um Einflüsse realer Lichtverhältnisse zu untersuchen. Vor Beginn einer Fermentation wurde das Medium mit CO_2 gesättigt. Der pH Wert wurde mittels NaOH oder NH_4OH geregelt. Analog zu den Versuchen im Rührkesselreaktor, Kapitel 4.4.2, wurde während der Freiland-Kultivierung ein PI-Regler verwendet, welcher durch Kombination von Laugenzugabe in der Nachtphase und CO_2 -Zugabe in der Tagesphase die Einstellung des pH Werts ermöglichte. Zur Datenaufzeichnung und automatisierten Regelung des Fermentationsprozesses kam das Prozesssteuerungssystem BioProCon zum Einsatz.

3.2 Analytik

Sämtliche zur Analytik verwendeten Chemikalien wurden von Carl Roth, Sigma Aldrich, VWR Chemicals oder Merck bezogen und waren analysenrein (p.a.).

3.2.1 Biotrockenmasse

Die Bestimmung der Konzentration an Biotrockenmasse (BTM) erfolgte gravimetrisch. Hierfür wurden jeweils 30 mL Kulturbrühe im Chargenprozess, bei Proben mit geringer Biomasse bzw. im kontinuierlichen Betrieb jeweils 60 mL Kulturbrühe, in zwei zuvor gewogene trockene Edelstahl-Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (20 min, 4 °C, 6000 rpm; Rotina 420R, Hettich). Das resultierende Pellet wurde getrocknet (48h, 80 °C; Trockenschrank, Memmert), in einem Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt und mit einer Analysenwaage (ABJ 320-4, Kern) gewogen. Die Bestimmung der BTM-Konzentration erfolgte für jede Kultivierung parallel zur spektrometrischen Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 750 nm (Spaltbreite 1 nm; Lambda 35, Perkin Elmer). Somit konnten für jede Kultivierung stammspezifische Korrelationskoeffizienten ermittelt werden, welche eine indirekte Berechnung der BTM-Konzentration zuließen, falls eine gravimetrische Bestimmung aufgrund niedriger Biomassen oder geringem Arbeitsvolumen nicht möglich war. Im Mittel wurden folgende BTM-Korrelationskoeffizienten bestimmt: 0,198 g L⁻¹ OD₇₅₀⁻¹ für *Chlorella vulgaris*, 0,225 g L⁻¹ OD₇₅₀⁻¹ für *Nannochloropsis limnetica*, 0,300 g L⁻¹ OD₇₅₀⁻¹ für *Phaeodactylum tricorutum* und 0,179 g L⁻¹ für *Synechocystis* sp. PCC6803 bzw. 0,177 g L⁻¹ OD₇₅₀⁻¹ für *Synechocystis* sp. BW86. Eine graphische Auftragung für die Korrelation von OD₇₅₀ und c_X ist exemplarisch in Abbildung A1 zu finden.

3.2.2 Extinktionskoeffizient

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten einer Mikroalgen-Kulturbrühe wurde ein Messaufbau bestehend aus einer LED-Lichtquelle (MS6L083AT, Nichia, Japan), einer Küvette (Schichtdicke 10 mm) und einem fixierten planaren Lichtsensor (LI-250, LI-Cor, USA) genutzt. Zur Messung des Blindwertes wurde die Küvette mit deionisiertem Wasser befüllt, die Messung transmittierter Photonen wurde durch Mikroalgen-Suspension unterschiedlicher Verdünnungsstufen realisiert. Der Berechnung des Extinktionskoeffizienten lag Gleichung 4.2 zugrunde.

3.2.3 Zellzahl

Die Konzentration der Zellzahl wurde in Triplikaten mit Hilfe eines Durchflusszytometers (Guava easyCyte, Merck Millipore) bestimmt. Zwei verschiedene Laser gewährleisteten eine Unterscheidung von Fremdpartikeln und Zellen. Die Gesamt-Zellzahl wird im Streulicht bei einer Wellenlänge von 488 nm aufgenommen; eine Anregung der Pigmente bei 642 nm ermöglicht die Messung von Mikroalgen und Cyanobakterien im Seitwärtsstreulicht.

3.2.4 Pigmente

Die Konzentration an Chlorophyll *a*, Chlorophyll *b* und Carotinoide wurde photometrisch in Duplikaten oder Triplikaten bestimmt. Die Pigmente wurden mit einer Lösung aus 90 % Dimethylsulfoxid (v/v) und 10 % Essigsäure (v/v) aus einem Zellpellet, gewonnen durch Zentrifugation von 1 mL Kulturbrühe (11.000 rpm, 4 °C, 10 min; Mikro 220R, Hettich), unter Verwendung eines Thermoschüttlers (300 rpm, 45 °C, 20 min; Typ MHL, Ditabis) extrahiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (11.000 rpm, 20 °C, 10 min) und der Überstand photometrisch bei 750, 665, 649 und 480 nm vermessen. Der Wert für die Trübung, gemessen bei 750 nm, der jeweiligen Probe wurde von den jeweiligen restlichen Messwerten abgezogen und die Pigmentkonzentration berechnet auf Basis der empirischen Gleichungen nach Wellburn [103], Spaltbreite 1 nm. Als Blindprobe diente die Lösung aus 90 % Dimethylsulfoxid (v/v) und 10 % Essigsäure (v/v).

3.2.5 Kohlenhydrate

Die Quantifizierung der Kohlenhydrate erfolgte mit Hilfe der Anthron-Methode [104]. Hierfür wurde 400 µL Probe mit 800 µL Anthron-Reagenz, bestehend aus 0,1 % (w/v) Anthron in konzentrierter Schwefelsäure (> 95 %), gemischt und bei 95 °C für 16 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlen der Probe im Eisbad gestoppt und die Probe bei einer Wellenlänge von 625 nm photometrisch vermessen. Als Blindprobe kam ein Gemisch aus 400 µL deionisiertem Wasser und 800 µL Anthron-Reagenz zum Einsatz. Die Kalibrierkurve wurde mit Stärke nach Zulkowsky im Bereich von 20 bis 400 mg L⁻¹ erstellt. Für jede Probenahme erfolgte die Kohlenhydratmessung in Doppelbestimmung.

3.2.6 Fettsäuren

Der analytische Nachweis von Fettsäuren, in Form von Fettsäuremethylestern (FAME), erfolgte mit einem Gaschromatographen (Agilent 7890A, Agilent; FID Detektor) und der Trennsäule Supelco SBP-PUFA (30 m x 0,32 mm x 0,2 µm; Sigma-Aldrich) nach Meiser et al. [105], basierend auf der Methode von Lepage und Roy [106]. 20 mg gefriergetrocknete Biomasse (Alpha 1-2 LDplus, Christ) wurde mit 2 mL einer Extraktionslösung, 250 mg L⁻¹ Butylhydroxytoluol (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) in 96 %igem Ethanol (v/v) und 0,5 g Glaskugeln, Durchmesser 0,5 mm, versetzt und mechanisch aufgeschlossen (3x 1 min, 6000 rpm; Precellys 24, Bertin Technologies). Anschließend wurde 1 mL der Ethanolphase abgenommen, erneut zentrifugiert und zur Umesterung mit einer 100:5 (v/v) Methanol/Acetylchlorid Lösung im Verhältnis 20:1 (v/v) verdünnt. Als Standard wurde eine C₄-C₂₄ FAME Lösung eingesetzt (Supelco-18919-1AMP, Sigma-Aldrich).

3.2.7 Proteine

Die Gesamtprotein-Konzentration wurde mit dem Infrarotspektrometer DirectDetect (Merck Millipore) bestimmt. Das System berechnet die Proteinkonzentration anhand der Intensität von Amid-I-Banden,

welche durch Streckschwingungen der Peptidbindungen im mittleren Infrarotbereich (MIR) verursacht wird [107]. Homogenisierte und gewaschene Proben wurden in Duplikaten oder Triplikaten auf eine hydrophile Polytetrafluoroethylen-Membran pipettiert und nach dem Trocknen bei Raumtemperatur innerhalb von zwei Tagen vermessen. Als Standard diente bovines Serumalbumin (BSA). Deionisiertes Wasser wurde zur Messung der Blindprobe eingesetzt.

3.2.8 Cyanophycin

Die Extraktion von Cyanophycin wurde nach einem modifizierten Protokoll von Elbahloul et al. [108] durchgeführt, vgl. Anhang A2.6. Die kolorimetrische Cyanophycin-Bestimmung erfolgte in Triplikaten, bei geringer Probenmenge auch in Duplikaten, nach dem Protokoll von Messineo [109] auf Grundlage einer Arginin-Nachweisreaktion von Sakaguchi [110]. Zur Erstellung der Eichgerade wurde sowohl extrahiertes Cyanophycin als auch L-Arginin eingesetzt. 0,1 mol L⁻¹ HCl wurde zur Messung der Blindprobe verwendet. Eine detaillierte Anleitung zur Cyanophycin-Quantifizierung ist ebenfalls in Anhang A2.6 zu finden.

3.2.9 Aminosäuren

Zur Bestimmung einzelner Aminosäuren wurden die Proben mit Perameisensäure und Wasserstoffperoxid nach Rodehutsord [111] oxidiert und mit 6 mol L⁻¹ HCl für 24 h bei 110 °C hydrolysiert. Die Detektion der Aminosäuren erfolgte wie von Rodehutsord et al. [111,112] beschrieben. Norleucin wurde als interner Standard verwendet. Die Separation und Detektion bei 570 nm, bzw. 440 nm für Prolin, erfolgte mit einem Aminosäuren Analysator (L8900, VWR/Hitachi) und einer Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin. Methionin wurde über Methioninsulfone und Cystein über Cysteinsäure bestimmt. Tryptophan wurde separat mittels Umkehrphasenchromatographie und Fluoreszenzmessung nach alkalischer Hydrolyse mit Bariumhydroxid bestimmt (1100 HPLC, Agilent). Als stationäre Phase diente eine Nucleosil 120-5 C18 Säule inklusive Vorsäule. Die mobile Phase bestand aus einem 0,01 mol L⁻¹ Natriumacetatpuffer, pH 4,5, und Methanol (86:14 (v/v)) mit einem Volumenstrom von 0,8 mL min⁻¹ bei einer Temperatur von 20 °C. Sämtliche Aminosäurekonzentrationen wurden in g pro 16 g Stickstoff formuliert.

3.2.10 Mineralstoffe

Eine Analyse der Mineralstoffe Eisen (Fe), Magnesium (Mg), Phosphor (P), Schwefel (S) und Iod (J) erfolgte nach offiziellen Methoden zur Mengenelement- (Methode 10) und Spurenelementanalyse (Methode 11) des Verbands Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) [113].

3.2.11 Anorganische Ionen

Anorganische Ionen im Nährmedium wurden aus dem Überstand der zentrifugierten Kulturbrühe analysiert. Hierfür stand ein Ionenchromatograph (822 Compact IC plus, Metrohm) mit automatischer Probenvorlage (858 Professional Sample Processor, Metrohm) zur Verfügung. Zur Bestimmung der Anionenkonzentration wurde die Säule Metrosep A Supp 5 150/4 (Metrohm) und als Eluent eine wässrige Lösung mit $3,2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$, $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ und $12,5 \%$ Acetonitril (v/v) verwendet. Zur Quantifizierung der Kationen kam die Säule Metrosep C4 150/4.0 (Metrohm) sowie ein Eluent aus $1,7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ und $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ 2,6-Pyridindicarbonsäure in demineralisiertem Wasser zum Einsatz. Zur Herstellung der Eluenten und zur Verdünnung der Proben, standardmäßig im Verhältnis 1:10, wurde Reinstwasser (Widerstand $14 \text{ M}\Omega$; Ultra Pure water, ELGA) benutzt.

3.3 Berechnungen

In diesem Kapitel werden benutzte Berechnungsformeln aufgeführt. Die zur Modellbildung eingesetzten mathematischen Gleichungen sind Kapitel 4.2 zu entnehmen.

3.3.1 Biomassespezifische Wachstumsrate

Die Bestimmung der maximalen biomassespezifischen Wachstumsrate μ erfolgte über Gleichung 3.1 anhand der Konzentration an Biotrockenmasse zu Beginn, $c_{X,0}$ zum Zeitpunkt t_0 , und am Ende der exponentiellen Wachstumsphase, $c_X(t)$ zum Zeitpunkt t .

$$\mu = \ln\left(\frac{c_X(t)}{c_{X,0}}\right) \cdot \frac{1}{t - t_0} \quad 3.1$$

Bei kontinuierlicher Betriebsweise wurde die biomassespezifische Wachstumsrate μ auf Grundlage der Massenbilanz nach Gleichung 3.2 bestimmt [34]. Mit dem Füllvolumen des Reaktors V_R , der Konzentration der Komponente i im Zulauf $c_{i,\text{ein}}$ bzw. Ablauf $c_{i,\text{aus}}$, des Volumenstroms \dot{V} von Zulauf bzw. Ablauf und der Reaktionsrate r_i .

$$V_R \cdot \frac{dc_i}{dt} = \dot{V} \cdot c_{i,\text{ein}} + r_i \cdot c_i \cdot V_R - \dot{V} \cdot c_{i,\text{aus}} \quad 3.2$$

Die Bilanzierung der Biomasse erfolgt unter der Annahme des quasistationären Zustands, also keine Änderung von c_X in Abhängigkeit von der Zeit, Gleichung 3.3. Somit kann μ aus der Verdünnungsrate D bestimmt werden (Gleichung 3.4).

$$V_R \cdot \frac{dc_X}{dt} = 0 = \mu \cdot c_X \cdot V_R - \dot{V} \cdot c_X \quad 3.3$$

$$\mu = D = \frac{\dot{V}}{V_R} \quad 3.4$$

3.3.2 Biomassezusammensetzung

Die quantitative Zusammensetzung der Biomasse wurde, wenn nicht bereits durch die analytische Methode gegeben, aus der Konzentration c_i der jeweiligen Komponente i bezogen auf die zugehörige Bio-trockenmassekonzentration c_X berechnet (Gleichung 3.5). Die resultierenden biomassespezifischen Anteile werden als Zellquota q_i bezeichnet.

$$q_i = \frac{c_i}{c_X} \quad 3.5$$

Sofern keine Messdaten zur Bestimmung des Lipidanteils zur Verfügung standen, wurde die Zellquota für Lipide (q_L) über einen empirischen Ansatz berechnet. Es galt die Annahme, die Zelle setzt sich zu 100 % aus den Zellquota für Proteine (q_P), Kohlenhydrate (q_{KH}), Lipide (q_L) und DNA/RNA inklusive Ascheanteil (q_{DNA}) zusammen. Hieraus lässt sich ein theoretischer Lipidanteil bestimmen (Gleichung 3.6).

$$q_L = 1 - q_P - q_{KH} - q_{DNA} \quad 3.6$$

Auf Grundlage von Kliphuis et al. [31] wurde für q_{DNA} ein fester Anteil von 10 % verwendet. Dies entspricht dem durchschnittlichen Gehalt an DNA, RNA und Asche der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*.

3.3.3 In silico Proteinanalyse

Eine Analyse der Proteinsequenz bzw. der Aminosäureverteilung des Proteinkomplexes von Photosystem I und II, inklusive der Lichtsammelkomplexe, $q_{PSI/II}$, sowie des Enzyms RuBisCO, $q_{RuBisCO}$, wurde mit Hilfe der bioinformatischen Proteindatenbanken RCSB PDB (RCSB Protein Data Bank) [114] und UniProtKB (Universal Protein Resource Knowledgebase) [115] durchgeführt. Anhand der Datensätze für Photosystem I, PDB ID 1JB0 [116], und Photosystem II, PDB ID 4V62 [117], wurden mit Hilfe des Werkzeugs von ExPASy [118] die Aminosäureprofile der einzelnen Proteine bestimmt, darunter 12 Proteine für Photosystem I und 20 Proteine für Photosystem II, in die Software Microsoft Excel 2013 exportiert und der Gesamt-Aminosäuregehalt gemittelt. Für das Aminosäureprofil von RuBisCO wurde die Zusammensetzung der kleinen Proteinkette, UniProtKB P54206, und großen Proteinkette, UniProtKB P54205, gemittelt.

3.3.4 Photonenkonversionseffizienz

Die Berechnung der Photokonversionseffizienz (PCE) liegt Gleichung 3.7 zugrunde. Nach Dillschneider et al. [119] beträgt der Energiegehalt der Photonen, welche von den warm-weißen LED-Beleuchtungsmodulen ausgehen (vgl. Kapitel 3.1), $E_{\text{Photon}} = 210,48 \text{ kJ mol}^{-1}$.

$$\text{PCE} = \frac{P_x \cdot dH_{\text{MO}}}{E_{\text{Photon}} \cdot \frac{A_{\text{LED}}}{V_R} \cdot (\text{PFD}_0 - \text{PFD}_{\text{trans}}) \cdot \Delta t} \cdot 100 \% \quad 3.7$$

Außerdem wird die Biotrockenmasseproduktivität P_x , die Heizwertenthalpie der Mikroorganismen dH_{MO} , die beleuchtete Reaktoroberfläche A_{LED} , das Flüssig- oder Arbeitsvolumen des Reaktors V_R , die auf die Reaktoroberfläche auftreffende Photonenflussdichte PFD_0 , die transmittierte Photonenflussdichte $\text{PFD}_{\text{trans}}$ und der Beleuchtungszeitraum Δt benötigt.

3.3.5 Auslegung PI-Regler

Zur Bestimmung der PI-Regelparameter kamen zwei heuristische Verfahren zum Einsatz. Anhand von Gleichung 3.8 und Gleichung 3.9 lassen sich die Regelparameter für Führungsverhalten mit maximaler Überschwingung von 20 % nach Chien-Hrones-Reswick berechnen.

$$K_P = \frac{0,59}{K_S} \cdot \frac{T}{T_t} \quad 3.8$$

$$T_I = 1,00 \cdot T_t \quad 3.9$$

Die Berechnungsformeln nach Ziegler und Nichols zur Bestimmung von Regelparameter eines PI-Reglers sind in Gleichung 3.10 und Gleichung 3.11 beschrieben.

$$K_P = \frac{0,9}{K_S} \cdot \frac{T}{T_t} \quad 3.10$$

$$T_I = 3,33 \cdot T_t \quad 3.11$$

Die Sprungantworten des Systems auf Stellgrößenänderungen wurden mit Hilfe der Software OriginPro (9.0G, OriginLab) grafisch ausgewertet. Eine Kurvenanpassung auf Basis eines PT_1 -Glieds, beispielhaft dargestellt in Abbildung A5, ermöglichte die Bestimmung der statischen Verstärkung K_S sowie der Zeitkonstanten T . Die Güte der Approximation wurde über das Bestimmtheitsmaß R^2 und durch den Schnitt der Horizontalen bei $0,63 \cdot K_S$ bzw. $0,95 \cdot K_S$ mit der Vertikalen bei $1 \cdot T$ bzw. $3 \cdot T$ überprüft. Die Verzugszeit oder Totzeit T_t zwischen Stellwertänderung und Eintritt einer Regelgrößenänderung wurde grafisch oder direkt aus den Rohdaten abgelesen. Aus den ermittelten Größen K_S , T und T_t ergeben sich die Parameter Proportionalbeiwert K_P und Nachstellzeit T_I eines PI-Reglers [120,121].

3.3.6 Parameterschätzung

Eine Parameterschätzung ausgewählter Modellparameter erfolgte in Simulink (MATLAB R2016b, The MathWorks) mit Hilfe der Simulink Design Optimization. Als Schätzverfahren wurde ein nichtlineares Verfahren der kleinsten Quadrate („nonlinear least square“) gewählt unter Verwendung des sogenannten

„Trust-Region-Reflective“ Algorithmus mit einer Parametertoleranz von 10^{-3} und einer Funktionstoleranz von 10^{-4} . Die zu optimierende Zielfunktion mit dem Messzustand z_{ik} ist in Gleichung 3.12 beschrieben.

$$\phi_{LS}(p) = \sum_{k=1}^N \sum_{i=1}^n (x_i(x_0, u, p, t_k) - z_{ik})^2 \quad 3.12$$

Die simulierten Zustandsgrößen x_i sind im Allgemeinen abhängig von den Anfangsbedingungen x_0 , den Eingangsgrößen u , den Parametern p und den Messzeitpunkten t_k .

3.3.7 Sensitivitätsanalyse und Parameterschätzfehler

Zur Analyse von Sensitivitäten der geschätzten Modellparameter, siehe Kapitel 4.2.4, wurden sowohl eine globale Sensitivitätsanalyse, mittels Simulink Design Optimization (MATLAB R2016b, The MathWorks), als auch eine lokale Sensitivitätsanalyse durchgeführt. Die lokalen Sensitivitäten wurden über ein externes MATLAB Skript bestimmt (Tabelle A10). Nach Gleichung 3.13 lassen sich die Sensitivitäten W_j eines dynamischen Systems über numerische Differentiation zu jedem Zeitpunkt t berechnen; mit dem Zustandsvektor x , dem Parametervektor p der Länge n und dem Einheitsvektor e_j .

$$W_j(t) = \frac{\partial x}{\partial p_j} = \frac{x(p + \Delta p_j e_j, t) - x(p, t)}{\Delta p_j}, \quad j = 1 \dots n \quad 3.13$$

$$\bar{W}_j(t) = W_j(t) \cdot p_j \quad 3.14$$

Die Sensitivitäten werden durch Gleichung 3.14 in die skalierte Form \bar{W}_j überführt. Zusammen mit der Kovarianzmatrix C , auf deren Hauptdiagonalen sich die quadrierten Varianzen σ_{jk} der Messfehler ϵ_{jk} befinden, können Parameterschätzfehler der Messzeitpunkte t_k berechnet werden. Hierfür wurde die Fischer-Informationsmatrix verwendet, deren skalierte Form in Gleichung 3.15 wiedergegeben ist; p^* entspricht dem exakten Parametervektor nach der iterativen Parameterschätzung, $p \rightarrow p^*$.

$$\bar{F}(p^*) = \sum_{k=1}^N [\bar{W}(t_k)^T C(t_k)^{-1} \bar{W}(t_k)] \quad 3.15$$

Die Elemente der Kovarianzmatrix C wurden über einen heuristischen Ansatz bestimmt. Die Messfehler ϵ_{jk} der Messgrößen $z_j(t_k)$ wurden entweder aus einem relativen Fehler r_j berechnet, $\epsilon_{jk} = r_j \cdot z_j(t_k)$ oder aus einem relativen Fehler r_j eines minimalen Messwerts $z_{j,min}$, unterhalb dessen alle Messfehler konstant sind, $\epsilon_{jk,min} = r_j \cdot z_{j,min}$ für $z_j(t_k) \leq z_{j,min}$. Dabei wurde ein relativer Fehler von 10 % angenommen. Somit ergeben sich die Varianzen aus dem Quadrat der Messfehler zu $\sigma_{jk} = \epsilon_{jk}^2 = r_j^2 (\max(z_j(t_k), z_{j,min}))^2$. Die minimalen Messwerte $z_{j,min}$ der Messzustände Biomassenkonzentration und Proteinkonzentration betragen $0,1 \text{ g L}^{-1}$ sowie $0,01 \text{ g L}^{-1}$ für den Messzustand Ammoniumkonzentration.

Nach Transformation der skalierten Fischer-Informationsmatrix \bar{F} mit Hilfe der Transformationsmatrix Λ_p , einer Diagonalmatrix mit dem Parametervektor p auf der Hauptdiagonalen, können die Parameterschätzfehler ermittelt werden (Gleichung 3.16).

$$\bar{F} = \Lambda_p \cdot F \cdot \Lambda_p, \quad \bar{F}^{-1} = \Lambda_p^{-1} \cdot F^{-1} \cdot \Lambda_p^{-1} \quad 3.16$$

Die untere Schranke γ_{ij} der relativen Streuung des Parameters j wird durch Gleichung 3.17 am Beispiel dreier Parameter berechnet; mit den Elementen der Hauptdiagonalen \bar{s}_{jj} und der invertierten skalierten Fischer-Informationsmatrix \bar{F}^{-1} [122,123].

$$\gamma_{ij} = \sqrt{\bar{s}_{jj}}, \quad \bar{F}^{-1} = \begin{bmatrix} \bar{s}_{11} & \bar{s}_{21} & \bar{s}_{31} \\ \bar{s}_{12} & \bar{s}_{22} & \bar{s}_{32} \\ \bar{s}_{13} & \bar{s}_{23} & \bar{s}_{33} \end{bmatrix} \quad 3.17$$

3.4 Statistische Versuchsplanung

Die statistische Versuchsplanung (Design of Experiments, DoE) wurde eingesetzt, um den Einfluss und die Signifikanz verschiedener Medienbestandteile auf die Protein- und Chlorophyll-Zellquota zu untersuchen. Hierbei kam zunächst ein Teilfaktorplan (Fractional Factorial Design) zum Einsatz. Eine Auflistung der untersuchten Komponenten und Konzentrationen ist in Tabelle A4 zu finden. Zur Erhöhung der Modellauflösung wurde neben der ersten Versuchsreihe, vgl. Tabelle A5, eine Faltung (fold-over) der Experimente in einer zweiten Versuchsreihe durchgeführt. Hierfür wurden die Konzentrationsniveaus (+/-) aus Tabelle A5 umgekehrt. Die Koeffizienten des linearen Modells können so unabhängig von den Interaktionskoeffizienten, welche den gemeinsamen Einfluss zweier Mengenelemente bzw. Komponenten widerspiegeln, berechnet werden. Die im Teilfaktorplan als signifikant eingestuften Mengenelemente wurden anschließend mittels Response Surface Methodology (RSM) untersucht. Hier wurden quadratische und interaktive Koeffizienten berücksichtigt auf Basis eines face-centered Central Composite Design (CCD) und eines I-Optimalitätskriteriums. Der Versuchsplan ist in Tabelle A6 dargestellt. Sowohl beim Fractional Factorial Design als auch beim RSM-Design diente ein 2fach konzentriertes TP Medium als Basismedium, vgl. Kapitel 3.1.2. Zur Erstellung und Auswertung der Versuchspläne wurde die Software JMP (Version 12, SAS Institute) verwendet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Wachstumskinetiken

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wachstumskinetiken der Stämme *Chlorella vulgaris* und *Synechocystis* sp. bestimmt. Die Resultate dienen als Grundlage für das physiologische Zellmodell zur Simulation des Zellwachstums sowie zur Entwicklung von Prozessstrategien zur Beeinflussung der Zellzusammensetzung bezüglich der Makromoleküle und der Übertragung in den Pilotmaßstab.

4.1.1 *Chlorella vulgaris*

Zur Bestimmung der Wachstumskinetiken für *Chlorella vulgaris* kam ein kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor im Turbidostat-Modus zum Einsatz, vgl. Kap. 3.1.4, mit folgenden Grundeinstellungen: Rührerdrehzahl 250 rpm, $c_X = 0,3 \text{ g L}^{-1}$, $\text{PFD}_0 = 300 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $T_R = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,5$, $\text{pCO}_2 = 2 \text{ kPa}$, $V_R = 1,65 \text{ L}$, 1fach TP-Medium (Kapitel 3.1.2). Mittels ionenchromatographischer Analyse (Kapitel 3.2.11) wurde sichergestellt, dass sämtliche Substrate, mit Ausnahme des zu limitierenden Substrats, in ausreichender Konzentration vorlagen. Abbildung 4.1 zeigt einen exemplarischen Prozessverlauf zur Bestimmung einer Wachstumskinetik in Abhängigkeit von der CO_2 -Verfügbarkeit.

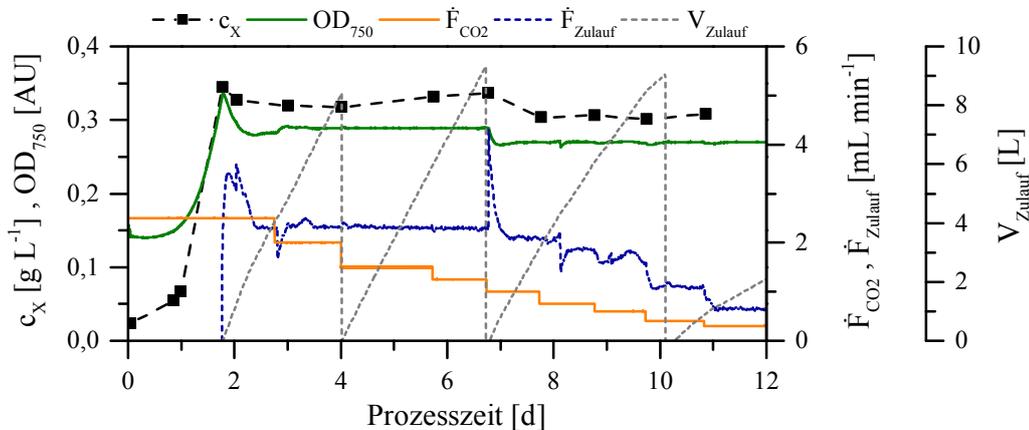


Abbildung 4.1: Prozessverlauf eines kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktors im Turbidostat-Modus zur Bestimmung der Wachstumskinetik von *Chlorella vulgaris* in Abhängigkeit von der CO_2 -Verfügbarkeit, mit der Biotrockenmassekonzentration c_X , der Turbidität bei einer optischen Dichte von 750 nm OD_{750} , dem zugeführten CO_2 -Fluss \dot{F}_{CO_2} , der Pumprate an zugeführtem Medium \dot{F}_{Zulauf} sowie dem zugeführtem Volumen an frischem Medium V_{Zulauf} . Auf Basis des in Abbildung 4.1 dargestellten Prozesses war es möglich die spezifische Wachstumsrate anhand der Verdünnungsrate, bzw. über das zugeführte Volumen an frischem Medium pro Zeit, $\Delta V_{\text{Zulauf}}/\Delta t$, zu berechnen. Insgesamt wurden drei Wachstumskinetiken in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte PFD_0 , dem CO_2 -Partialdruck und der zugeführten Ammoniumkonzentration im Zulauf $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}}$ bestimmt. Zusätzlich wurde der Einfluss auf die Zellquota ermittelt (Abbildung 4.2).

Während der Batchphase steigt OD_{750} , die Turbidität bei einer optischen Dichte von 750 nm, bzw. die Biotrockenmassekonzentration c_X innerhalb einer Prozesszeit von 1,77 d auf $\text{OD}_{750} = 0,33$ bzw. $c_X = 0,34 \text{ g L}^{-1}$ an. Die anschließende Aktivierung der Regler führt zu einer Erhöhung der Pumprate \dot{F}_{Zulauf} sowie des Volumens V_{Zulauf} an zugeführtem Medium. Binnen 2,42 d stellt sich ein Gleichgewichtszustand mit stabilen Werten für c_X (0,30 - 0,33 g L^{-1}) und OD_{750} (0,27 - 0,29) bis zum Ende des Prozesses

ein. Der rapide Abfall von V_{Zulauf} ist mit dem Wechsel der Medienvorlage zu begründen. Die Pumprate an zugeführtem Medium verringert sich mit fortschreitender Prozesszeit von $\dot{F}_{\text{Zulauf}} = 2,3 \text{ mL min}^{-1}$ nach 2,42 d auf $\dot{F}_{\text{Zulauf}} = 0,65 \text{ mL min}^{-1}$ nach 11 d aufgrund der Reduzierung des zugeführten CO_2 -Flusses \dot{F}_{CO_2} von $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ auf $0,095 \text{ mL min}^{-1}$.

Die Wachstumskinetik bezogen auf die Photonenflussdichte PFD_0 wurde mit zwei identischen Versuchsdurchläufen untersucht. Der Mittelwert beider Versuche und die Standardabweichung in Form von Fehlerbalken sind in Abbildung 4.2, oben links, dargestellt. Mit steigender Photonenflussdichte nimmt die spezifische Wachstumsrate μ zu und erreicht den Maximalwert $\mu_{\text{max}} = 2,48 \text{ d}^{-1}$. Approximiert man die Datenpunkte mit dem mathematischen Modell nach Monod (Gleichung 2.6), so errechnet sich die Monod-Konstante bei halbmaximaler spezifischer Wachstumsrate zu $k_{\text{M,PFD}} = 112,58 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Durch Annäherung der Datenpunkte mittels zweier Geraden lässt sich die Photonenflussdichte bestimmen, bei welcher *Chlorella vulgaris* von lichtlimitiertem zu lichtgesättigtem Wachstum übergeht, $\text{PFD}_0 = 200 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mit einer durchschnittlichen Wachstumsrate von $\mu = 2,38 \text{ d}^{-1}$. Zusätzlich ist in Abbildung 4.3 die spezifische CO_2 -Aufnahmerate von *Chlorella vulgaris* über PFD_0 , basierend auf einer Massenbilanz der Abgasanalyse, vgl. Kapitel 3.1.4, aufgetragen. Die maximale CO_2 -Aufnahmerate liegt bei $r_{\text{CO}_2, \text{max}} = 0,25 \text{ h}^{-1}$. Die halbmaximale Aufnahmerate wird bei $\text{PFD}_0 = 53,3 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ erreicht. Die experimentell ermittelten Daten für r_{CO_2} sind essentiell für das in Kapitel 4.2 beschriebene photoautotrophe Wachstumsmodell.

In Abbildung 4.2, oben Mitte, ist der Einfluss des CO_2 -Partialdrucks auf die spezifische Wachstumsrate μ gezeigt. Mit steigender Substratverfügbarkeit steigt die Wachstumsrate von $\mu = 0,6 \text{ d}^{-1}$ bei $p_{\text{CO}_2} = 0,01 \text{ kPa}$ auf $\mu = 2,07 \text{ d}^{-1}$ bei $p_{\text{CO}_2} = 0,52 \text{ kPa}$ rapide an und bleibt anschließend bis zu einem Partialdruck von $p_{\text{CO}_2} = 4,8 \text{ kPa}$ nahezu unverändert. Eine Approximation mit Gleichung 2.6 liefert die Monod-Konstante $k_{\text{M,CO}_2} = 0,023 \text{ kPa}$ sowie eine maximale spezifische Wachstumsrate von $\mu_{\text{max}} = 2,12 \text{ d}^{-1}$. Die Daten aus der Wachstumskinetik in Abhängigkeit von der CO_2 -Verfügbarkeit beruhen auf zwei Turbidostat-Prozessen, welche jeweils den Bereich zwischen $0,01 - 1,26 \text{ kPa}$ und $1,68 - 4,7 \text{ kPa}$ abdecken.

Der Einfluss der Stickstoffquelle Ammonium auf die spezifische Wachstumsrate wird in Abbildung 4.2, oben rechts, ersichtlich. Die niedrigste Wachstumsrate von $\mu = 0,06 \text{ d}^{-1}$ ergab sich bei einer Ammoniumkonzentration von $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 8,4 \text{ mg L}^{-1}$. Mit steigender Stickstoffverfügbarkeit nimmt die spezifische Wachstumsrate zu, bei $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 25,2 \text{ mg L}^{-1}$ und höher wird substratgesättigtes Wachstum erreicht mit einem Maximalwert von $\mu_{\text{max}} = 2,14 \text{ d}^{-1}$. Nach Gleichung 2.6 ergibt sich die Monod-Konstante zu $k_{\text{M,NH}_4} = 14,03 \text{ mg L}^{-1}$. Weiterhin wurde die spezifische CO_2 -Aufnahmerate bestimmt, wie aus Abbildung 4.3 zu entnehmen. Das Minimum von $r_{\text{CO}_2} = 0,06 \text{ h}^{-1}$ wurde bei $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 8,4 \text{ mg L}^{-1}$ bestimmt und erreicht ab $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 25,2 \text{ mg L}^{-1}$ die Sättigung mit dem Maximalwert von $r_{\text{CO}_2} = 0,30 \text{ h}^{-1}$. Ebenso wurde für diesen Versuch die Zellkonzentration bestimmt. Zwischen $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} =$

31,5 - 126 mg L⁻¹ beträgt die Zellkonzentration 1,1·10⁴ Zellen μL⁻¹ und steigt für kleinere Substratkonzentration um das Vierfache auf bis zu 4,0·10⁴ Zellen μL⁻¹ an.

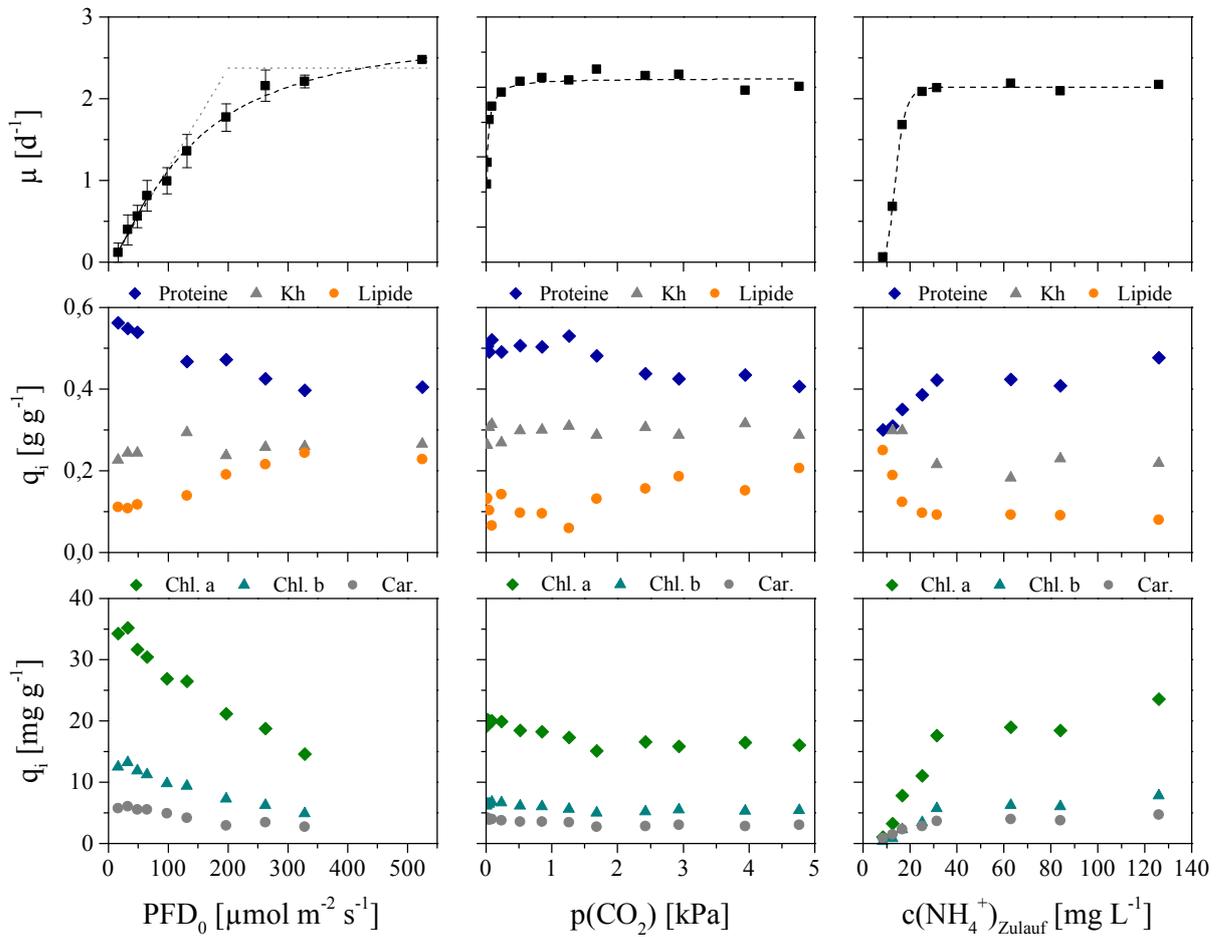


Abbildung 4.2: Spezifische Wachstumsrate μ von *Chlorella vulgaris* in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte PFD₀, dem CO₂-Partialdruck p(CO₂) und der zugeführten Ammoniummenge c(NH₄⁺)_{Zulauf} sowie der Zellquota q_i für Proteine, Kohlenhydrate (Kh), Lipide, Chlorophyll a (Chl.a), Chlorophyll b (Chl.b) und Carotinoide (Car.).

Die Zellquota für Proteine, Kohlenhydrate und Lipide in Bezug auf die Photonenflussdichte PFD₀ ist in Abbildung 4.2, mittig links, aufgetragen. Der Proteingehalt sinkt kontinuierlich mit steigender Lichtintensität von $q_p = 0,56 \text{ g g}^{-1}$ bei PFD₀ = 15,8 μmol m⁻² s⁻¹ auf $q_p = 0,40 \text{ g g}^{-1}$ bei PFD₀ = 328 μmol m⁻² s⁻¹. Der Gehalt an Kohlenhydraten verändert sich hingegen nur marginal um insgesamt 6,8 % bei einem durchschnittlichen Gehalt von $q_{Kh} = 0,25 \text{ g g}^{-1}$. Der nach Kapitel 3.3.2 berechnete Lipidgehalt verhält sich gegenläufig zum Proteingehalt und fällt mit sinkender Photonenflussdichte von maximal $q_L = 0,26 \text{ g g}^{-1}$ auf minimal $q_L = 0,11 \text{ g g}^{-1}$. Der Einfluss des CO₂-Partialdrucks auf die Zellquota ist in der gleichen Zeile zu sehen. Der Proteingehalt wird nur geringfügig beeinflusst, steigt jedoch bei verminderter CO₂-Verfügbarkeit von $q_p = 0,41 \text{ g g}^{-1}$ bei p_{CO₂} = 4,8 kPa auf $q_p = 0,51 \text{ g g}^{-1}$ bei p_{CO₂} = 0,01 kPa CO₂. Der Gehalt an Kohlenhydraten bleibt unverändert mit einer durchschnittlichen Zellquota von $q_{Kh} = 0,29 \text{ g g}^{-1}$ und einer minimalen bzw. maximalen Abweichung von ± 0,03 g g⁻¹. Der Lipidgehalt zeigt einen reziproken Verlauf zum Proteingehalt und sinkt von $q_L = 0,21 \text{ g g}^{-1}$ bei hohen CO₂-Partialdrücken von p_{CO₂} = 4,8 kPa auf $q_L = 0,13 \text{ g g}^{-1}$ bei niedrigen CO₂-Partialdrücken von p_{CO₂} =

0,01 kPa. Abbildung 4.2, mittig rechts, gibt die Variation der Zellquota bei verschiedenen Ammoniumkonzentrationen wieder. Der geringste Proteingehalt von $q_P = 0,30 \text{ g g}^{-1}$ wurde bei einer zugeführten Ammoniumkonzentration von $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 8,4 \text{ mg L}^{-1}$ gemessen. Mit steigender Ammoniumkonzentration nimmt der Proteingehalt zu und erreicht sein Maximum von $q_P = 0,48 \text{ g g}^{-1}$ bei $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 126 \text{ mg L}^{-1}$. Der Kohlenhydrat- und der Lipidgehalt verzeichnen einen gegenteiligen Verlauf. Insgesamt verändert sich der Anteil an Kohlenhydraten um 11,6 %. Der höchste Anteil von $q_{\text{Kh}} = 0,30 \text{ g g}^{-1}$ bei einer Ammoniumkonzentration von $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 12,6 \text{ mg L}^{-1}$ reduziert sich mit steigender Stickstoffverfügbarkeit von $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 25,2 \text{ mg L}^{-1}$ auf $q_{\text{Kh}} = 0,22 \text{ g g}^{-1}$ und bleibt auch bei höheren Substratkonzentrationen nahezu konstant. Eine hohe Stickstoffverfügbarkeit hat einen niedrigen Lipidgehalt zur Folge, welcher sich von $q_L = 0,09 \text{ g g}^{-1}$ bei $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 84,0 \text{ mg L}^{-1}$ mit zunehmender Stickstofflimitierung auf $q_L = 0,25 \text{ g g}^{-1}$ bei $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 8,4 \text{ mg L}^{-1}$ erhöht. Der Gehalt an Lipiden wurde wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben analysiert, eine Auflistung des Fettsäureprofils liefert Tabelle 4.1. Insgesamt wurde die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure (C16:0) und die ungesättigten Fettsäuren Myristoleinsäure (C14:1), Palmitoleinsäure (C16:1), Ölsäure (C18:1), Linolsäure (C18:2) und Alpha-Linolensäure (C18:3) bestimmt. Weiterhin wurde eine unbekannte Fettsäure Cn:i gemessen, welche anhand der Standards der Messmethode, vgl. Kapitel 3.2.6, nicht eindeutig zugeordnet werden konnte. Möglicherweise könnte es sich dabei um Hexadecatriensäure (C16:3) handeln, Stephenson et al. [124] wiesen diese Fettsäure für denselben Stamm nach. Außer für Myristoleinsäure (C14:1), welche nur bei höherer Stickstoffverfügbarkeit gebildet wird, ist für alle Fettsäureanteile eine Zunahme mit abnehmender Stickstoffverfügbarkeit zu beobachten. Die stärkste Zunahme verzeichnet Linolsäure (C18:2), deren Gehalt um den Faktor 16,7 steigt. Der Gehalt von Palmitinsäure (C16:0), Linolsäure (C18:2) und Alpha-Linolensäure (C18:3) erhöht sich um das 2,6-, 2,4- und 2,1fache. Der Anteil ungesättigter Fettsäuren beträgt durchschnittlich $q_{\text{FS, unges.}} = 0,80 \text{ g g}^{-1}$ mit einem Minimal- bzw. Maximalwert von $q_{\text{FS, unges.}} = 0,79 \text{ g g}^{-1}$ bzw. $q_{\text{FS, unges.}} = 0,81 \text{ g g}^{-1}$. Weiterhin ist der Einfluss der untersuchten Energie- und Nährstoffverfügbarkeiten auf die Pigmente Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotinoide in Abbildung 4.2 dargestellt. Mit steigender Photonenflussdichte ist ein stetiger Abfall des Pigmentgehalts zu beobachten. Bei $\text{PFD}_0 = 15,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ werden Anteile von $q_{\text{Chl.a}} = 34,3 \text{ mg g}^{-1}$, $q_{\text{Chl.b}} = 12,5 \text{ mg g}^{-1}$ und $q_{\text{Car}} = 5,7 \text{ mg g}^{-1}$ erreicht, welche bei $327,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bis auf $q_{\text{Chl.a}} = 14,6 \text{ mg g}^{-1}$, $q_{\text{Chl.b}} = 4,9 \text{ mg g}^{-1}$ und $q_{\text{Car}} = 2,7 \text{ mg g}^{-1}$ sinken. Der Pigmentgehalt bei variierender CO_2 -Verfügbarkeit veränderte sich nur geringfügig. Die Maximalwerte liegen bei $q_{\text{Chl.a}} = 20,9 \text{ mg g}^{-1}$, $q_{\text{Chl.b}} = 7,0 \text{ mg g}^{-1}$ und $q_{\text{Car}} = 4,2 \text{ mg g}^{-1}$ für Partialdrücke unterhalb von 1,7 kPa CO_2 . Oberhalb von $p_{\text{CO}_2} = 1,7 \text{ kPa}$ treten keine signifikanten Veränderungen mehr auf, mit Minimalwerten von $q_{\text{Chl.a}} = 16,0 \text{ mg g}^{-1}$, $q_{\text{Chl.b}} = 5,5 \text{ mg g}^{-1}$ und $q_{\text{Car}} = 2,9 \text{ mg g}^{-1}$. Für eine Ammoniumkonzentration im Zulauf von 126 mg L^{-1} sind Anteile von $q_{\text{Chl.a}} = 23,5 \text{ mg g}^{-1}$, $q_{\text{Chl.b}} = 7,8 \text{ mg g}^{-1}$ und $q_{\text{Car}} = 4,7 \text{ mg g}^{-1}$ zu finden, welche bis zu einer Substratkonzentration von $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 31,5 \text{ mg L}^{-1}$ um durchschnittlich 24 % sinken. Eine weitere

Reduktion der Stickstoffverfügbarkeit bewirkt einen starken Abfall des Pigmentgehalts auf Minimalwerte von $q_{\text{Chl.a}} = 1,08 \text{ mg g}^{-1}$, $q_{\text{Chl.b}} = 0,36 \text{ mg g}^{-1}$ und $q_{\text{Car}} = 0,88 \text{ mg g}^{-1}$ bei $c(\text{NH}_4^+) = 8,4 \text{ mg L}^{-1}$. Im Allgemeinen zeigen die Pigmente Chlorophyll a, b und die Carotinoide untereinander einen identischen Verlauf bezüglich der Konzentrationsänderung des Substrats bzw. der Lichtverfügbarkeit.

Tabelle 4.1: Fettsäureprofil von *Chlorella vulgaris* bei verschiedenen Ammoniumkonzentrationen im Zulauf des Turbidostat-Prozesses im Rührkesselreaktor zur Aufnahme der Wachstumskinetik in g Fettsäure pro g Biotrockenmasse; LOD = Nachweisgrenze („limit of detection“); Cn:i = nicht im Standard der Messmethode vorkommende Fettsäure.

$c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}}$ [mg L ⁻¹]	C14:1 [g g ⁻¹]	C16:0 [g g ⁻¹]	C16:1 [g g ⁻¹]	Cn:i [g g ⁻¹]	C18:0 [g g ⁻¹]	C18:1 [g g ⁻¹]	C18:2 [g g ⁻¹]	C18:3 [g g ⁻¹]
8,4	< LOD	0,0445	0,001	0,026	0,003	0,100	0,022	0,054
12,6	< LOD	0,0370	< LOD	0,023	0,002	0,067	0,016	0,044
16,8	< LOD	0,0255	< LOD	0,020	0,001	0,030	0,012	0,035
25,2	0,0006	0,0206	< LOD	0,018	< LOD	0,018	0,010	0,030
31,5	0,0009	0,0176	< LOD	0,021	< LOD	0,009	0,010	0,034
63	0,0010	0,0176	< LOD	0,021	< LOD	0,009	0,010	0,033
84	0,0010	0,0180	< LOD	0,021	< LOD	0,009	0,010	0,032
126	0,0012	0,0169	< LOD	0,021	< LOD	0,006	0,009	0,026

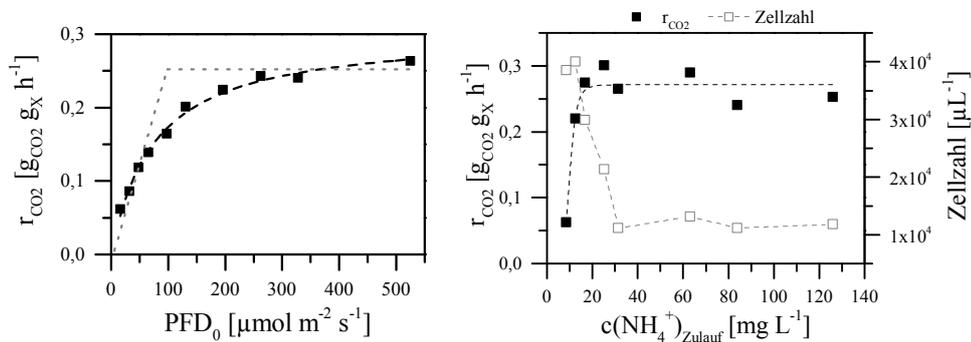


Abbildung 4.3: Spezifische CO₂-Aufnahmerate r_{CO_2} in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte PFD_0 (links) sowie der zugeführten Ammoniummenge $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}}$ mit deren Einfluss auf die Zellkonzentration (rechts) von *Chlorella vulgaris*, basierend aus den Daten der Wachstumskinetik in Abhängigkeit von PFD_0 aus Abbildung 4.2.

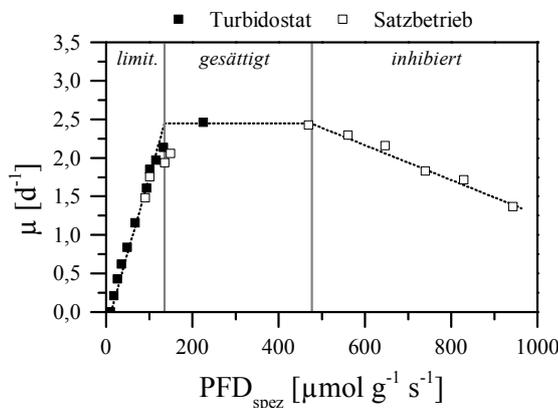


Abbildung 4.4: Spezifische Wachstumsrate μ in Abhängigkeit von der spezifischen Photonenflussdichte PFD_{spez} von *Chlorella vulgaris* basierend aus den Daten der Wachstumskinetik in Abhängigkeit von PFD_0 aus Abbildung 4.2.

Oft ist es hilfreich die spezifische Wachstumsrate μ statt auf flächen-, gas-, oder volumetrisch bezogene Größen, wie in Abbildung 4.2 dargestellt, auf biomassespezifische Größen zu beziehen. Die geringe Biomassekonzentration beim Turbidostat-Prozess zur Gewährleistung einer homogenen Lichtverteilung reicht allerdings meist nicht aus, um eine vollständige Wachstumskinetik in Abhängigkeit von biomassespezifischen Größen abzubilden. Um eine Wachstumskinetik für hohe PFD_{spez} -Werte darstellen zu können ist es jedoch möglich, Daten eines Chargenprozesses zu verwenden, sofern weder Medienkomponenten noch Licht eine limitierende Komponente darstellen. Abbildung 4.4 zeigt beispielhaft eine auf die spezifische Photonenflussdichte PFD_{spez} bezogene Wachstumskinetik für *Chlorella vulgaris*, in welcher die Daten aus Abbildung 4.2 um den Datensatz eines Chargenprozesses im Rührkesselreaktor erweitert wurden. Die Wachstumskinetik lässt sich somit in die drei Bereiche des lichtlimitierten, lichtgesättigten und lichtinhibierten Wachstums einteilen, deren Übergang jeweils bei $135 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ und $475 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ stattfindet. Unterhalb $\text{PFD}_{\text{spez}} = 4,9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ findet kein Zellwachstum mehr statt. Weiterhin war es möglich, die Robustheit von *Chlorella vulgaris* gegenüber verschiedener pH-Werte zu analysieren. Hierfür wurden Chargenprozesse in Midi-Plattenreaktoren mit den pH-Werten 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 und 8,0 durchgeführt. Dabei blieb μ nahezu gleich mit spezifischen Wachstumsraten von jeweils $1,65 \text{ d}^{-1}$, $1,74 \text{ d}^{-1}$, $1,72 \text{ d}^{-1}$, $1,75 \text{ d}^{-1}$, $1,79 \text{ d}^{-1}$ innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase (Daten nicht aufgetragen).

4.1.2 *Synechocystis* sp.

Zur Bestimmung einer Wachstumskinetik für *Synechocystis* sp. BW86 in Abhängigkeit von der zugeführten Phosphatmenge $c(\text{PO}_4^{3-})_{\text{Zulauf}}$ kam ein kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor im Turbidostat-Modus zum Einsatz (Kap. 3.1.4) mit folgenden Betriebsbedingungen: Rührerdrehzahl 250 rpm, $c_X = 0,15 \text{ g L}^{-1}$, $\text{PFD}_0 = 94 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $28 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7,5, 2 kPa CO_2 , $V_R = 1,75 \text{ L}$, BG^{11}_0 Medium (Kapitel 3.1.2). Außerdem wurde eine Wachstumskinetik für *Synechocystis* sp. PCC6803 bei unterschiedlich auftreffenden Photonenflussdichten, PFD_0 , mittels im Chargenprozess betriebener Mini-Plattenreaktoren bestimmt (Kap. 3.1.5). Es lagen folgende Betriebsbedingungen vor: $c_X < 0,125 \text{ g L}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 kPa CO_2 , $V_R = 0,2 \text{ L}$, BG^{11}_0 Medium (Kapitel 3.1.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5 dargestellt.

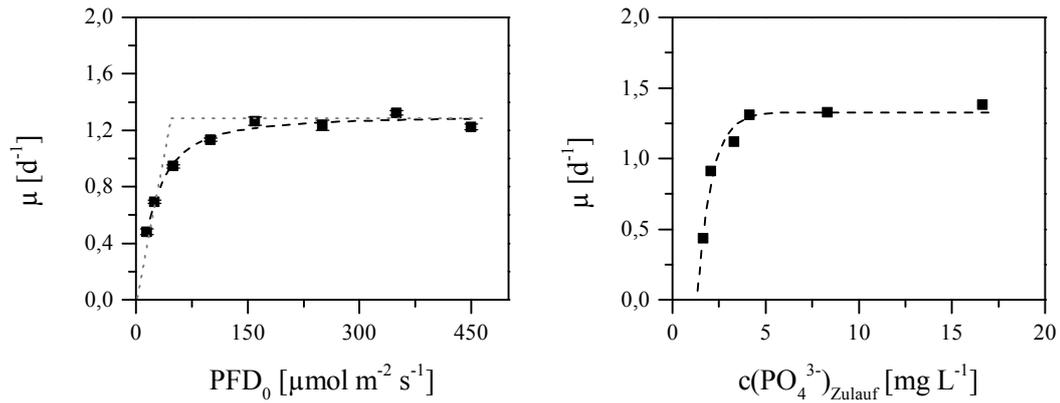


Abbildung 4.5: Spezifische Wachstumsrate μ von *Synechocystis* sp. PCC6803 in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte PFD_0 und von *Synechocystis* sp. BW86 in Abhängigkeit der zugeführten Phosphatmenge $c(\text{PO}_4^{3-})_{\text{Zulauf}}$.

Abbildung 4.5, links, zeigt den Einfluss des auf die Reaktoroberfläche auftreffenden Photonenerflusses PFD_0 auf die Wachstumsrate. Bei niedrigen Photonenflussdichten von $PFD_0 = 15 - 30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ liegt die spezifische Wachstumsrate μ zwischen $0,48 - 0,69 \text{ d}^{-1}$. Der Übergang von lichtlimitiertem zu lichtgesättigtem Wachstum kann durch Annäherung zweier Geraden ermittelt werden und liegt bei $PFD_0 = 46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Eine Approximation mit Gleichung 2.6 resultiert in einer Monod-Konstante $k_{M,PFD} = 23,32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sowie einer maximalen spezifischen Wachstumsrate von $\mu_{\text{max}} = 1,32 \text{ d}^{-1}$.

In Abbildung 4.5, rechts, ist der Einfluss variierender Phosphatkonzentrationen zu sehen. Bei der höchsten untersuchten Phosphatkonzentration von $c(\text{PO}_4^{3-})_{\text{Zulauf}} = 16,65 \text{ mg L}^{-1}$, der im BG¹¹₀ Standardmedium vorherrschenden Konzentration, wird eine maximale Wachstumsrate von $\mu = 1,38 \text{ d}^{-1}$ erreicht. Die durchschnittliche maximale Wachstumsrate unter substratgesättigten Wachstum zwischen $c(\text{PO}_4^{3-})_{\text{Zulauf}} = 4,16 - 16,65 \text{ mg L}^{-1}$ berechnet sich zu $\mu_{\text{max}} = 1,33 \text{ d}^{-1}$ mit $k_{M,\text{PO}_4} = 1,87 \text{ mg L}^{-1}$.

4.2 Modellierung von photoautotrophem Wachstum

Auf Basis der Wachstumskinetiken für *Chlorella vulgaris* in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte und der zugeführten Ammoniumkonzentration aus Kapitel 4.1.1 war es möglich, das Biomassewachstum und die makromolekularen Zellbestandteile in Abhängigkeit von den Prozessbedingungen und der Prozesszeit zu simulieren. MATLAB und die zugehörige Software Simulink (The MathWorks Inc, Version MATLAB R2016b) diente als Programmierumgebung. Abbildung 4.6 zeigt die Modellstruktur, angelehnt an die blockschaltbildförmige Oberfläche der Modellumgebung Simulink, bestehend aus den Bilanzräumen Lichtfeld, Metabolismus, und Reaktor sowie dem Block „Parameterschätzung“. Jeder Bilanzraum enthält eine Systemfunktion (S-function) vom Typ Level-1 MATLAB sowie eine Maske zur Eingabe der Eingangsgrößen. Zur numerischen Lösung der Simulationsdurchläufe wurde ein Variable-step Solver (ode45, Dormand-Prince) verwendet.

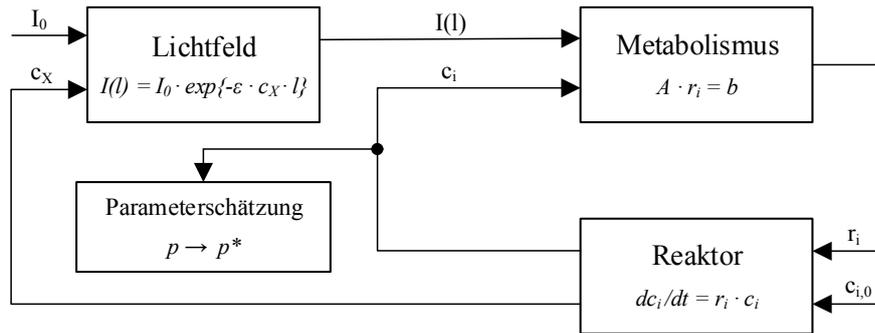


Abbildung 4.6: Modellstruktur des photoautotrophen Wachstumsmodells mit der Lichtintensität I_0 , der Lichtintensität über den Reaktorquerschnitt $I(l)$, der Konzentration an Biomasse c_X bzw. Komponente i c_i , den Startkonzentrationen $c_{i,0}$, der biomasse-spezifischen Rate von Komponente i r_i sowie Startparameter p und optimierte Parameter p^* .

Im Bilanzraum Lichtfeld wird die Lichtverteilung unter Berücksichtigung der Biomassekonzentration c_X über den Reaktorquerschnitt für den jeweiligen Zeitschritt simuliert. Hierfür wird, basierend auf der Formel nach Lambert-Beer (Gleichung 4.2), die Ortsvariable r in 1000 gleichgroße Elemente aufgeteilt und ein Durchschnitt der lokalen Lichtintensität $I(r)$ berechnet bzw. an den Bilanzraum Metabolismus weitergegeben. Der Bilanzraum Metabolismus dient der Berechnung aller spezifischen Bildungs- und Aufnahmeraten r_i auf Zellebene, beruhend auf den Stoffkonzentrationen c_i und der Lichtintensität $I(r)$. Ferner werden in der zugehörigen Systemfunktion (S-function) alle Ausbeutekoeffizienten und Massenanteile definiert (siehe Tabelle 4.2). Nach Bestimmung der Ammoniumaufnahme r_{NH_4} (Gleichung 4.25) und der CO_2 -Aufnahmerate r_{CO_2} (Gleichung 4.21) werden diese zusammen mit der DNA-Bildungsrate r_{DNA} und der ATP-Verbrauchsrate für den Erhaltungsstoffwechsel $r_{\text{ATP,m}}$ in den Ergebnisvektor b des linearen Gleichungssystems (Gleichung 4.29) übergeben. Nach dem Lösen des linearen Gleichungssystems können sämtliche spezifischen Raten r_i über den Ratenvektor r in dem Block „Reaktor“ verwendet werden, um die Stoffkonzentrationen c_i für den aktuellen Zeitschritt zu berechnen. Im Block „Parameterschätzung“ werden die Stoffkonzentrationen mit den experimentell ermittelten Daten verglichen, um ausgehend von den Startparametern p die optimierten Parameter p^* zu ermitteln, vgl. Kapitel 3.3.6. Die zugehörigen Quellcodes sind in Tabelle A10 zu finden.

Folgende Vereinfachungen wurden getroffen, um die Komplexität des Modells zu reduzieren: Temperatur, Druck und pH-Wert sind konstant; der Reaktor ist ideal durchmischt; Algenzellen sterben nicht, sind zu jeder Zeit teilungsfähig und in ihrer Zusammensetzung identisch; Ammonium ist das einzig limitierende Substrat; die CO_2 -Aufnahme ist gekoppelt mit der zur Verfügung stehenden Photonenflussdichte, vgl. Abbildung 4.3.

4.2.1 Lichtfeld

Über den Block „Lichtfeld“ besteht die Möglichkeit, die Lichtverteilung über den Querschnitt dreier Reaktortypen zu simulieren: zylindrischer Rührkesselreaktor, einseitig beleuchteter Plattenreaktor und beidseitig beleuchteter Plattenreaktor. Als Grundlage für die Beschreibung der Eindringtiefe des Lichts dient das Gesetz nach Lambert-Beer (Gleichung 4.1, bzw. Gleichung 4.2 nach Integration) mit der auf

der Reaktoroberfläche einfallenden Lichtintensität I_0 , der Reaktortiefe d , dem Extinktionskoeffizienten ε und der Biomassekonzentration c_X .

$$\frac{dI(r)}{dr} = -\varepsilon \cdot c_X \cdot I(r) \quad 4.1$$

$$I(r) = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot c_X \cdot r} \quad 4.2$$

Allerdings sind weder Verdünnungseffekte noch Mehrfachstreuungen im Gesetz nach Lambert-Beer enthalten. Um die Lichtstreuung an suspendierten Partikeln vor allem bei hohen Biomassekonzentrationen zu berücksichtigen, wurde daher der korrigierte Extinktionskoeffizient ε_{sca} nach dem Modell von Suh et al. [64] verwendet - mit der Weglänge z , dem Koeffizienten zur Korrektur der Biomassestreuung K_c , dem Koeffizienten zur Korrektur der Weglängenstreuung K_z und dem korrigierten maximalen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{sca,m}$ (Gleichung 4.3). Dabei werden K_c und K_z in der Parameterschätzung ermittelt und $\varepsilon_{sca,m}$ aus Gleichung 4.4, welche aus Gleichung 4.3 für $c_X \ll K_c$ und $z \ll K_z$ resultiert.

$$\varepsilon_{sca} = \varepsilon_{sca,m} \cdot \frac{c_X}{K_c + c_X} \cdot \frac{z}{K_z + z} \quad 4.3$$

$$\varepsilon_{sca,m} = \varepsilon_{sca} \cdot K_c \cdot K_z \quad 4.4$$

Abbildung 4.7 zeigt den Einfluss der Biomassekonzentration c_X auf den Extinktionskoeffizienten nach dem Modell von Suh et al. [64] für verschiedene zurückgelegte Weglängen des Lichts z , sowie experimentell bestimmte Extinktionskoeffizienten in Abhängigkeit von c_X (vgl. Kapitel 3.2.2). Beide Verläufe zeigen eine Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten von der im Photobioreaktor vorherrschenden Biomassekonzentration. Da der Extinktionskoeffizient das Maß für die Schwächung von Licht durch das Kulturmedium darstellt und die Lichtverfügbarkeit bei photoautotrophen Prozessen von essentieller Bedeutung ist, vgl. Kapitel 4.1.1 und 5.1.1, ist eine realitätsnahe Beschreibung des biomassebezogenen Extinktionskoeffizienten für eine Modellbildung von großer Wichtigkeit.

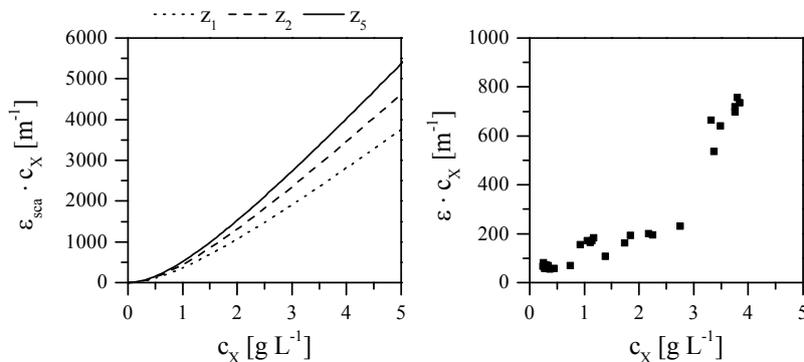


Abbildung 4.7: Korrigierter biomassebezogener Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{sca} \cdot c_X$ nach dem Modell von Suh et al. [64], links, für die Weglänge $z = 1$ cm (z_1), $z = 2$ cm (z_2) und $z = 5$ cm (z_5), sowie dem gemessenen biomassebezogenen Extinktionskoeffizient $\varepsilon \cdot c_X$, rechts, in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration c_X für *Chlorella vulgaris* und einer Schichtdicke von $d = 1$ cm.

Um das Lichtfeld innerhalb des zylindrischen Rührkesselreaktors vollständig zu beschreiben, wurde Gleichung 4.5 herangezogen. Sie beschreibt eine Kompensation der exponentiellen Abschwächung des Lichts nach Lambert-Beer durch einen Fokussierungseffekt in der Reaktormitte [125].

$$I(r) = \frac{I_0 \cdot R}{r} \cdot e^{\varepsilon_{\text{sca}} \cdot c_x \cdot (r-R)}, \quad r_0 \leq r \leq R \quad 4.5$$

Gleichung 4.5 lässt sich durch Anwendung der Kontinuitätsgleichung auf ein infinitesimal kleines Element, in welchem das Licht I über die Mantelfläche A ein- und wieder ausstrahlt ($I_1 \cdot A_1 = I_2 \cdot A_2$), herleiten, vgl. Abbildung A13. Bei Radius r bzw. $r + dr$ ergibt sich durch Einsetzen der Formel zur Berechnung der Mantelfläche eines Zylinders Gleichung 4.6. Nach Trennung der Variablen ergibt sich die mathematische Beschreibung des Fokussierungseffekts (Gleichung 4.7). Die Kombination von Gleichung 4.1 und Gleichung 4.7 mit anschließender Integration resultiert schließlich in Gleichung 4.5, welche eine vollständige Beschreibung des Lichtfelds innerhalb des Rührkesselreaktors erlaubt [125].

$$(I + dI) \cdot 2 \cdot \pi \cdot r \cdot h = I \cdot 2 \cdot (r + dr) \cdot h \quad 4.6$$

$$\left(\frac{dI(r)}{dr}\right)_{\text{Fokus}} = \frac{I(r)}{r} \quad 4.7$$

Zur Bestimmung einer globalen Lichtintensität I_{av} wurde die lokale Lichtintensität des Rührkesselreaktors $I(r)$ aus Gleichung 4.5 über die Lichteindringtiefe, ausgehend von dem Reaktorvolumen, integriert, vgl. Gleichung 4.8.

$$I_{\text{av}} = \frac{1}{R^2 - r_0^2} \int_{r_0}^R I(r) \cdot r \cdot dr \quad 4.8$$

4.2.2 Metabolismus

Die Stoffwechselwege im Block „Metabolismus“ des photoautotrophen Wachstumsmodells sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Sie beschreiben den anabolen und katabolen Metabolismus einer Mikroalgenzelle. Auf Grundlage des metabolischen Netzwerks lassen sich nach Posten und Rinas [126] die spezifischen Bildungsraten durch Bilanzierung der Netzwerkknoten beschreiben. Die zur Berechnung notwendigen Ausbeutekoeffizienten Y_{ij} und Massenanteile e_{ij} sind Tabelle 4.2 zu entnehmen. Es wird angenommen, dass sich die Biomasse ausschließlich aus funktioneller Biomasse, darunter Proteine, Nucleinsäuren und Membranlipide, sowie inaktiver Biomasse, darunter Kohlenhydratspeicher (Stärke) und Speicherlipide (überwiegend TAGs), zusammensetzt. Speicherstoffe werden akkumuliert, sobald die Stickstoffquelle Ammonium aufgebraucht ist [119]. Weiterhin wird auf Basis von Baroukh et al. [37,41] angenommen, dass Glukose das einzige Produkt der Photosynthese darstellt und als Kohlenhydrat-Grundbaustein zum Aufbau weiterer Biomasse fungiert.

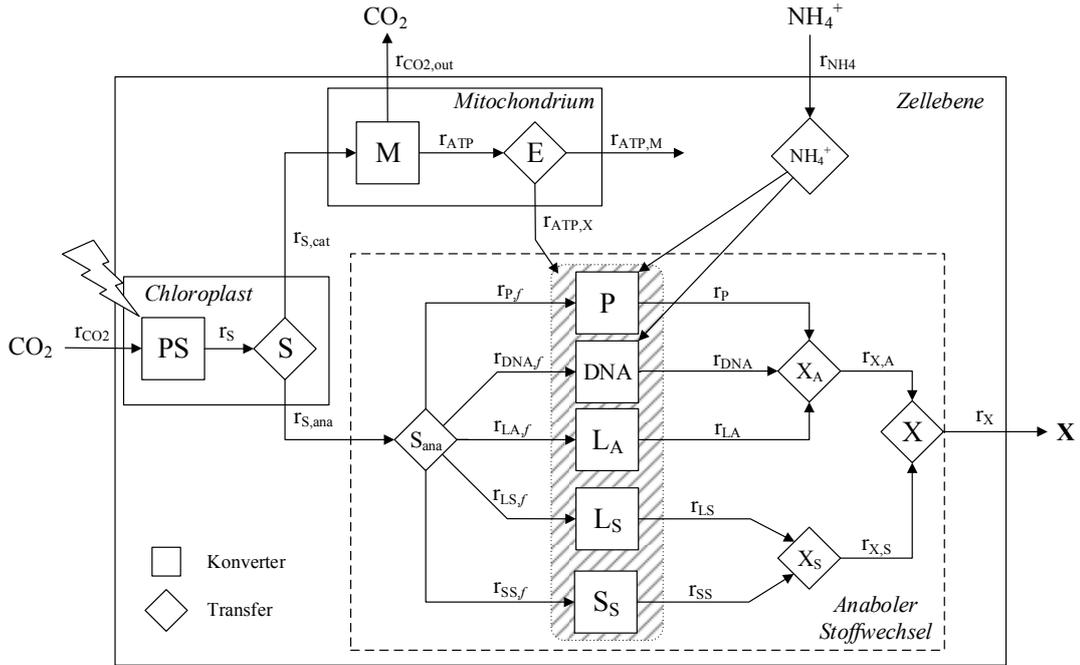


Abbildung 4.8: Modell der Stoffwechselwege im Block „Metabolismus“ des photoautotrophen Wachstumsmodells. Die Transfer-Elemente verteilen Stoffe, die Konverter-Elemente symbolisieren Stoffumwandlung. PS – Photosynthese, S – Substrat/Glukose, M – Mitochondrium, E – Energieverteilung, P – Proteine, DNA – DNA/RNA, LA – aktive/funktionale Lipide (Membranlipide), LS – Speicherlipide, SS – Glukosespeicher (Stärke), XA – aktive Biomasse, XS – inaktive Biomasse/Speicherstoffe, X – Biomasse gesamt.

Die spezifische Bildungsrate aktiver Biomasse r_{XA} setzt sich zusammen aus der spezifischen Bildungsrate für Proteine r_P , Nucleotide r_{DNA} und Membranlipide r_{LA} (Gleichung 4.9). Weiterhin gilt, basierend auf Kliphuis et al. [31], dass r_{DNA} stets 10 % von r_{XA} beträgt (Gleichung 4.10, mit $e_{DNA,XA} = 0,1$). Nach Stephenson et al. [124] besitzt *Chlorella vulgaris* unter stickstoffgesättigten Bedingungen einen Lipidgehalt von $q_L = 0,137 \text{ g g}^{-1}$, wie eigene Messdaten bestätigten (Kapitel 4.1.1). Für r_{LA} wurde daher ein Gehalt von 15 % angenommen, $r_{LA} = e_{LA,XA} \cdot r_{XA}$ mit $e_{LA,XA} = 0,15$, solange Ammonium zur Verfügung steht bzw. hauptsächlich funktionelle Biomasse akkumuliert wird und die Biomasse größtenteils aus funktionaler Biomasse besteht. Zusammen mit $r_{DNA} = e_{DNA,XA} \cdot r_{XA}$ (Gleichung 4.10) lässt sich aus Gleichung 4.9 somit der in Gleichung 4.11 angegebene Ausdruck für r_P bestimmen.

$$r_{XA} = r_P + r_{DNA} + r_{LA} \quad 4.9$$

$$r_{DNA} = e_{DNA,XA} \cdot r_{XA} \quad 4.10$$

$$r_P = r_{LA} \cdot (e_{LA,XA}^{-1} \cdot (1 - e_{DNA,XA}) - 1) \quad 4.11$$

Eine Bilanzierung des Knotenpunkts S_{ana} liefert Gleichung 4.12, welche die Verbrauchsrate von Glukose für den anabolen Stoffwechsel $r_{S,ana}$ widerspiegelt und sich unter Verwendung der Ausbeutekoeffizienten als Gleichung 4.13 formulieren lässt; mit der Bildungsrate für Speicherlipide r_{LS} und der Bildungsrate für Kohlenhydratspeicher bzw. Stärke r_{SS} .

$$r_{S,ana} = r_{P,f} + r_{DNA,f} + r_{LA,f} + r_{LS,f} + r_{SS,f} \quad 4.12$$

$$r_{S,ana} = \frac{r_P}{Y_{P,GLU}} + \frac{r_{DNA}}{Y_{DNA,GLU}} + \frac{r_{LA}}{Y_{LA,GLU}} + \frac{r_{LS}}{Y_{LS,GLU}} + \frac{r_{SS}}{Y_{SS,GLU}} \quad 4.13$$

Speicherstoffe bzw. inaktive Biomasse werden verstärkt angereichert, sobald die Ammoniumkonzentration auf null fällt. Gleichung 4.14 gibt die spezifische Bildungsrate inaktiver Biomasse r_{XS} wieder. Um den höheren Kohlenstoffanteil der Lipide gegenüber den Kohlenhydraten gerecht zu werden, vgl. Verhältnis von Membran- und Speicherlipiden zu Stärke von $2,59 \text{ g}_{C,Lipide} \text{ g}_{C,Stärke}^{-1}$ aus Tabelle 4.2, wurde die Annahme $r_{LS} = 3 \cdot r_{SS}$ getroffen. Die Bildungsrate für die Gesamtbiomasse r_X ergibt sich durch Bilanzierung des Knotenpunktes „X“ in Abbildung 4.8 aus der Bildungsrate für funktionale Biomasse r_{XA} und der Bildungsrate für Speicherstoffe r_{XS} (Gleichung 4.15).

$$r_{XS} = r_{LS} + r_{SS} \quad 4.14$$

$$r_X = r_{XA} + r_{XS} \quad 4.15$$

Die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien dient der Energiebereitstellung in Form von ATP durch die Veratmung von Kohlenhydraten, hier in Form von Glukose. Die Bildungsrate für ATP r_{ATP} wird von dem Modell für jeden Zeitschritt dynamisch berechnet. r_{ATP} und die Bildungsrate für CO_2 $r_{\text{CO}_2,out}$ sind in Gleichung 4.16 bzw. Gleichung 4.17 aufgeführt, jeweils abhängig von der Glukose-Verbrauchsrate zur Energiegewinnung $r_{S,cat}$. Weiterhin erhält man durch die Bilanzierung des Knotenpunktes „E“ eine Gleichung zur Beschreibung der ATP-Verbrauchsrate zur Aufrechterhaltung des Erhaltungsstoffwechsels oder des Maintenance $r_{ATP,M}$ (Gleichung 4.18).

$$r_{ATP} = r_{S,cat} \cdot Y_{ATP,GLU} \quad 4.16$$

$$r_{\text{CO}_2,out} = r_{S,cat} \cdot Y_{\text{CO}_2,GLU} \quad 4.17$$

$$r_{ATP} = r_{ATP,M} + r_{ATP,X} \quad 4.18$$

Die ATP-Verbrauchsrate zur Bildung neuer Biomasse $r_{ATP,X}$ lässt sich über eine Energiebilanz des anabolen Stoffwechsels ausdrücken, vgl. Gleichung 4.19. Die zugehörigen Ausbeutekoeffizienten sind Tabelle 4.2 zu entnehmen.

$$r_{ATP,X} = \frac{r_P}{Y_{P,ATP}} + \frac{r_{DNA}}{Y_{DNA,ATP}} + \frac{r_{LA}}{Y_{LA,ATP}} + \frac{r_{LS}}{Y_{LS,ATP}} + \frac{r_{SS}}{Y_{SS,ATP}} \quad 4.19$$

ERGEBNISSE

Tabelle 4.2: Massenanteile und Ausbeutekoeffizienten [36,42,127,128]; p.e. („parameter estimation“) = variabler Wert basierend auf der Parameterschätzung; Ausbeutekoeffizient $Y_{GLU,CO_2}=0,682$.

	$e_{C,i} [g_C g_i^{-1}]$	$e_{N,i} [g_N g_i^{-1}]$	$Y_{i,ATP} [g_i g_{ATP}^{-1}]$	$Y_{i,GLU} [g_i g_{GLU}^{-1}]$
CO ₂	0,272	-	-	1,466
NH ₄ ⁺	-	0,778	-	-
C ₆ H ₁₂ O ₆	0,4	-	-	1
ATP	-	-	1	106,976
Proteine	0,53	p.e.	0,00913	0,755
Membranlipide	0,646	-	0,00534	0,615
DNA/RNA	0,37	0,16	0,01419	1,082
Speicherlipide	0,77	-	0,00277	0,519
Stärke	0,546	-	0,01471	0,909

Die geschwindigkeitsbestimmende Rate zur Bildung von Biomasse stellt die aus den Wachstumskinetiken abgeleitete CO₂-Aufnahmerate r_{CO_2} dar. Die in den Thylakoidmembranen innerhalb der Chloroplasten ablaufende Lichtreaktion stellt die notwendige Energie in Form von ATP zur Verfügung, um die in den Pyrenoiden ablaufende, durch das Enzym RuBisCO katalysierte Dunkelreaktion zur CO₂-Fixierung zu gewährleisten. Der Zusammenhang von Lichtabsorption und CO₂-Aufnahme wurde mittels einer Michaelis-Menten Kinetik beschrieben, wobei die zur Verfügung stehende Lichtmenge als Substrat in Gleichung 4.20 eingeht mit der maximalen CO₂-Aufnahmerate $r_{CO_2,max}$, vgl. Abbildung 4.3. Wie bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben, wurde um den Effekt der Lichtdurchdringung über den Reaktorquerschnitt zu berücksichtigen, eine durchschnittliche Lichtintensität I_{av} berechnet. Mit Hilfe von I_{av} ist es möglich, eine globale bzw. durchschnittliche CO₂-Aufnahmerate $r_{CO_2,\emptyset}$ für den ganzen Reaktor zu berechnen, siehe Gleichung 4.21.

$$r_{CO_2}(r) = r_{CO_2,max} \cdot \frac{I(r)}{k_I + I(r)} \quad 4.20$$

$$r_{CO_2,\emptyset} = r_{CO_2,max} \cdot \frac{I_{av}}{k_I + I_{av}} \quad 4.21$$

Für den Ausdruck von $r_{CO_2}(r)$ bzw. $r_{CO_2,\emptyset}$ wurde die Michaelis-Menten Kinetik dem Modell von Blackman vorgezogen, um gleichmäßige Simulationsverläufe zu gewährleisten. Anhand von $r_{CO_2,\emptyset}$ lässt sich mit Hilfe des Ausbeutekoeffizienten Y_{GLU,CO_2} die Glukose-Bildungsrate r_S bestimmen (Gleichung 4.22) sowie die Verteilung von Glukose durch Bilanzierung des Knotenpunktes „S“ (Gleichung 4.23). Eine Kohlenstoffbilanz für die gesamte Zelle mit CO₂ als alleiniger Kohlenstoffquelle erweitert das Modell um Gleichung 4.24.

$$r_S = r_{CO_2,\emptyset} \cdot Y_{GLU,CO_2} \quad 4.22$$

$$r_S = r_{S,ana} + r_{S,cat} \quad 4.23$$

$$r_{CO_2,0} \cdot e_{C,CO_2} = r_{CO_2,out} \cdot e_{C,CO_2} + r_P \cdot e_{C,P} + r_{DNA} \cdot e_{C,DNA} + r_{LA} \cdot e_{C,LA} + r_{LS} \cdot e_{C,LS} + r_{SS} \cdot e_{C,SS} \quad 4.24$$

Die Rate mit dem größten Einfluss auf die Zellzusammensetzung stellt die NH_4^+ -Aufnahmerate r_{NH_4} dar, abgeleitet von den Wachstumskinetiken aus Kapitel 4.1. Gleichung 4.25 gibt die Berechnung von r_{NH_4} wieder basierend auf Michaelis-Menten Kinetiken. Dabei stellt $r_{NH_4,max}$ die maximale NH_4^+ -Aufnahmerate und $r_{NH_4,lim}$ eine Glukoseabhängige NH_4^+ -Aufnahmerate dar, somit ist sichergestellt dass die Zelle nicht mehr NH_4^+ aufnimmt als metabolisch verarbeitet werden kann.

$$r_{NH_4} = \min \left(r_{NH_4,max} \cdot \frac{c_{NH_4}}{k_{NH_4} + c_{NH_4}}, r_{NH_4,lim} \cdot \frac{c_{NH_4}}{k_{NH_4} + c_{NH_4}} \right) \quad 4.25$$

Um $r_{NH_4,lim}$ mathematisch auszudrücken, wurde für die Bedingung $c(NH_4^+) \geq 0 \text{ mg L}^{-1}$ eine Bilanz um den Knotenpunkt „S_{ana}“ (Abbildung 4.8) erstellt ohne Berücksichtigung der Bildungsraten für Speicherstoffe (Gleichung 4.26). Gleichung 4.26 berücksichtigt ergo, dass Speicherstoffe erst nach Verzehr der Stickstoffquelle synthetisiert werden [119]. Mit Hilfe einer Stickstoffbilanz für den Gesamtorganismus, Gleichung 4.27, lässt sich $r_{NH_4,lim}$ durch Einsetzen von Gleichung 4.26 in Gleichung 4.27 zu Gleichung 4.28 lösen.

$$r_{S,ana} = \frac{r_P}{Y_{P,GLU}} + \frac{r_{LA}}{Y_{LA,GLU}} + \frac{r_{DNA}}{Y_{DNA,GLU}} \quad 4.26$$

$$r_{NH_4,lim} = r_P \frac{e_{N,P}}{e_{N,NH_4}} + r_{DNA} \frac{e_{N,DNA}}{e_{N,NH_4}} \quad 4.27$$

$$r_{NH_4,lim} = \frac{e_{N,P}}{e_{N,NH_4}} Y_{P,GLU} \left(r_{S,ana} - \frac{r_{LA}}{Y_{LA,GLU}} - \frac{r_{DNA}}{Y_{DNA,GLU}} \right) + r_{DNA} \frac{e_{N,DNA}}{e_{N,NH_4}} \quad 4.28$$

Die Gleichungen des metabolischen Netzwerks können nun in ein lineares Gleichungssystem der Form $A_{eq} \cdot r = b_{eq}$ überführt werden, um die spezifischen Raten zu berechnen, vgl. Gleichung 4.29. Dabei stellt A_{eq} eine $m \times n$ Matrix dar mit m Gleichheitsbedingungen und n spezifischen Bildungsraten, r ein Vektor der spezifischen Bildungsraten und b_{eq} den Ergebnisvektor mit zuvor berechneten oder vorgegebenen Bildungsraten.

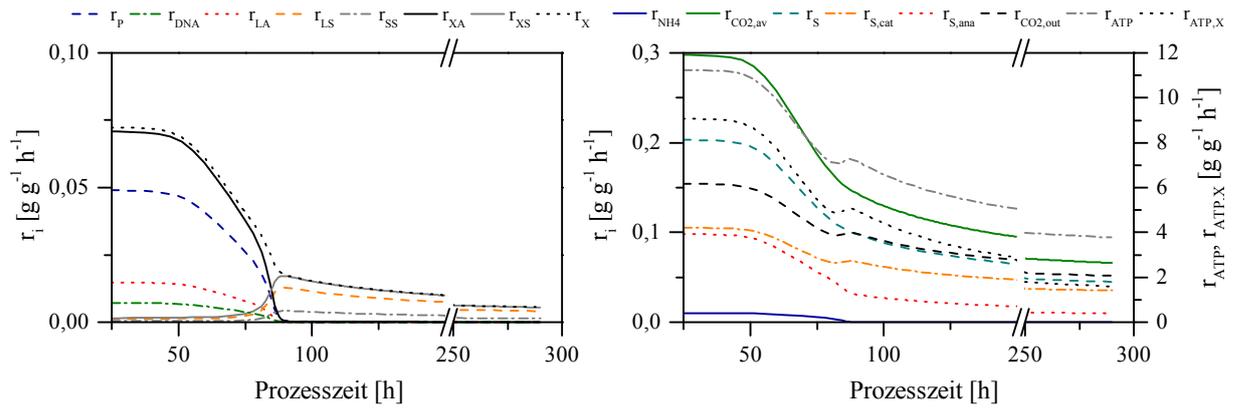


Abbildung 4.9: Spezifische Aufnahme- und Bildungsrate r_i der Stoffwechselwege im Block „Metabolismus“ des Rührkesselreaktors, basierend auf den Parametern von Chargenprozess I aus Kapitel 4.2.4, mit der Bildungsrate für Proteine r_P , Nucleinsäuren r_{DNA} , Membranlipide r_{LA} , Lipidspeicher r_{LS} , Stärkespeicher r_{SS} , funktionale Biomasse r_{XA} , inaktive Biomasse r_{XS} und gesamte Biomasse r_X (links), sowie der Aufnahme- und Verbrauchsrate für Ammonium r_{NH4} und CO_2 $r_{CO2,av}$, der Glukosebildungsrate r_S und den Verbrauchsrate für Glukose $r_{S,cat}$, $r_{S,ana}$, CO_2 $r_{CO2,out}$ und ATP r_{ATP} , $r_{ATP,X}$.

4.2.3 Reaktor

Im Block „Reaktor“ wird die zeitliche Veränderung der volumetrischen Konzentrationen durch Integration der in Gleichung 4.30 gegebenen Differentialgleichung berechnet. Da ausschließlich funktionelle Biomasse zur Generierung neuer Biomasse befähigt ist, beziehen sich sämtliche biomassebezogenen Konzentrationen auf c_{XA} - darunter dc_X , dc_{XA} , dc_{XS} , dc_P , dc_{LA} , dc_{LS} , c_{SS} und c_{DNA} - sowie der dazugehörigen Rate r_i von Stoff i . Eine Ausnahme bildet die Ammoniumkonzentration, deren Abnahme proportional zur Konzentration der Stickstoff enthaltenden Zellbestandteile ist (Gleichung 4.31).

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \cdot c_{XA} \quad 4.30$$

$$\frac{dc_{NH4}}{dt} = -r_{NH4} (c_P + c_{DNA}) \quad 4.31$$

Auf Grundlage der in Kapitel 4.2.2 ermittelten Raten und den Parameterwerten aus Tabelle 4.2 lassen sich die oben genannten Konzentrationsverläufe simulieren, vgl. Abbildung 4.10. Nach einer lag-Phase von 1 d steigen die biomassebezogenen Konzentrationen bis zu einer Prozesszeit von 2,5 d exponentiell an, bevor sich lineare Verläufe einstellen. c_{NH4} verhält sich gegenläufig und erreicht nach 3,63 d den Wert null. Infolgedessen steigt die Konzentration an funktionaler Biomasse c_{XA} und somit c_P , c_{LA} sowie c_{DNA} nicht weiter an. Die Proteinkonzentration beträgt hier $1,36 \text{ g L}^{-1}$ bei einer Biomassekonzentration von $2,22 \text{ g L}^{-1}$. Nach Verbrauch der Stickstoffquelle werden vermehrt Speicherstoffe akkumuliert, weshalb die Konzentrationen der Speicherstoffe ansteigen. Simultan mit der steigenden Konzentration an Speicherstoffen steigt c_X an, allerdings weniger stark als zuvor und mit einem flacher werdenden Verlauf gegen Prozessende. Nach einer Prozesszeit von 12 d erreichen c_X , c_{LS} und c_{SS} finale Werte von $5,83 \text{ g L}^{-1}$, $2,87 \text{ g L}^{-1}$ und $0,96 \text{ g L}^{-1}$.

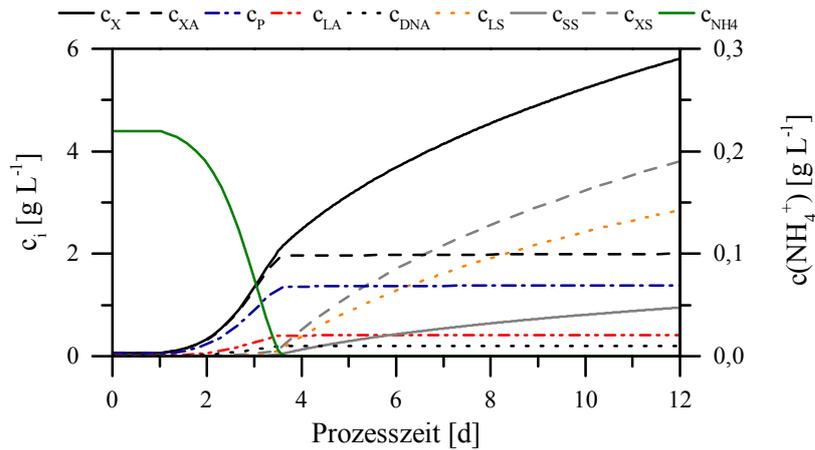


Abbildung 4.10: Simulierte Konzentrationsverläufe im Block „Reaktor“ des Rührkesselreaktors über der Prozesszeit, basierend auf den Parametern von Chargenprozess I aus Kapitel 4.2.4, mit der Konzentration an Biomasse c_X , funktionaler Biomasse c_{XA} , Proteine c_P , Membranlipide c_{LA} , Nukleotide c_{DNA} , Lipidspeicher c_{LS} , Stärkespeicher c_{SS} , inaktiver Biomasse c_{XS} und Ammonium c_{NH_4} .

4.2.4 Parameterschätzung und Parameterschätzfehler

Zur Ermittlung optimaler Parameter standen für die Parameterschätzung zwei Versuche im Chargenprozess zur Verfügung, welche im Rührkesselreaktor (Kapitel 3.1.4) durchgeführt wurden. Die folgenden Betriebsbedingungen der Experimente lagen vor: Rührerdrehzahl 250 rpm, $c_{X,0} = 0,02 \text{ g L}^{-1}$, $PFD_0 = 300 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $T_R = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,5$, $p_{\text{CO}_2} = 2 \text{ kPa}$, $V_R = 1,70 \text{ L}$, 2fach TP-Medium (Kapitel 3.1.2). In Simulink wurden zur Schätzung die in Kapitel 3.3.6 aufgeführte Zielfunktion sowie die in Tabelle 4.3 aufgeführten Parameter verwendet. Die Messdaten der Biomassekonzentration c_X , der Proteinkonzentration c_P und der Ammoniumkonzentration c_{NH_4} stammen von Chargenprozess I und II. In Tabelle 4.4 sind die zugehörigen Parameterschätzfehler gelistet, vgl. Kapitel 3.3.7. Da die Streuungen für den Parametersatz aus Chargenprozess I und II in der gleichen Größenordnung liegen und besonders für Chargenprozess I niedrig ausfallen, können die experimentellen Datensätze hinreichend geschätzt und simuliert werden. Lediglich die Parameter k_{NH_4} und K_z zeigen besonders im Chargenprozess II einen erhöhten relativen Fehler von 47,64 % bzw. 30,94 %.

Tabelle 4.3: Parameterwerte aus der Parameterschätzung zweier Chargenprozesse im Rührkesselreaktor.

Charge	k_t	k_{NH_4}	$e_{N,P}$	K_c	K_z
	$[\mu\text{mol m}^{-2} \text{ h}^{-1}]$	$[\text{g L}^{-1}]$	$[\text{g}_N \text{ g}_P^{-1}]$	$[\text{g L}^{-1}]$	$[\text{m}]$
I	24267	0,007024	0,14	3,3587	0,01
II	15650	0,010953	0,14	1,0368	0,01

Tabelle 4.4: Untere Schranke der relativen Streuung der geschätzten Parameterwerte zweier Chargenprozesse im Rührkesselreaktor.

Charge	k_I [%]	k_{NH_4} [%]	$e_{N,P}$ [%]	K_c [%]	K_z [%]
I	4,86	10,52	1,52	6,80	18,95
II	4,90	47,64	3,21	7,04	30,94

Die Simulationsergebnisse des Modells mit ermittelten Parametern für Chargenprozess I und II sind mit den zugehörigen Messdaten in Abbildung 4.11 dargestellt. Die Simulationsergebnisse für $c(NH_4^+)$ liegen bei Chargenprozess I um maximal $0,03 \text{ g L}^{-1}$ über den Messdaten und zeigen eine gute Übereinstimmung für den Zeitraum des vollständigen Ammoniumverbrauchs, welcher zwischen 3,25 - 3,92 d eintritt. Gleichzeitig stagniert die simulierte Proteinkonzentration auf einen konstanten Wert von $c_p = 1,36 \text{ g L}^{-1}$. Die Messwerte liegen mit einer durchschnittlichen Konzentration von $c_p = 1,51 \text{ g L}^{-1}$ zwischen 3,92 - 10,02 d darüber. Eine gute Übereinstimmung, mit Abweichungen zwischen Simulations- und Messdaten unterhalb $0,1 \text{ g L}^{-1}$, zeigt sich für die Konzentration an Biotrockenmasse c_x . Für die Daten aus Chargenprozess II wurde ebenfalls eine gute Übereinstimmung zwischen Simulations- und Messdaten für c_x festgestellt; die maximale Abweichung beträgt $0,22 \text{ g L}^{-1}$. Hier zeigen die Daten für $c(NH_4^+)$ zu Beginn eine gute Übereinstimmung, unterscheiden sich jedoch im Zeitpunkt des kompletten Ammoniumverbrauchs. Laut Messdaten tritt dieser Zeitpunkt zwischen 4,19 - 5,00 d ein, die Simulation ergibt 3,75 d. Nach Verbrauch der Stickstoffquelle stellt sich bezogen auf die Messdaten eine durchschnittliche Proteinkonzentration von $1,58 \text{ g L}^{-1}$ ein; die Simulationsdaten liefern konstante $1,48 \text{ g L}^{-1}$.

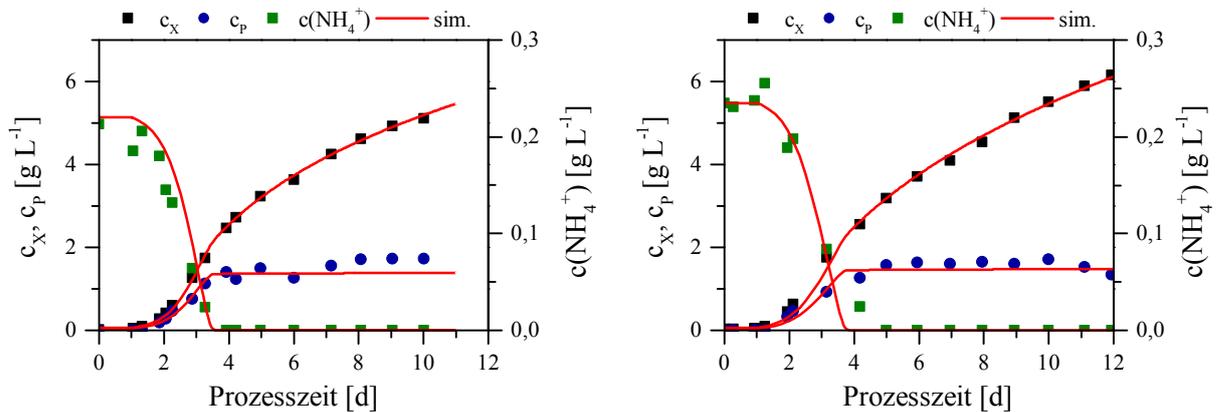


Abbildung 4.11: Chargenprozess I, links, und Chargenprozess II, rechts, im Rührkesselreaktor zur Parameterschätzung inklusive Simulationsergebnissen des photoautotrophen Wachstumsmodells (sim.), mit den Messdaten für die Konzentrationen von Biotrockenmasse c_x , Proteinen c_p und Ammonium $c(NH_4^+)$.

4.2.5 Parametersensitivitäten

Parametersensitivitäten ermöglichen eine Beurteilung des Einflusses eines Parameters auf eine simulierte Größe. Je höher die Parametersensitivität, desto empfindlicher reagiert das System. Bei niedriger Sensitivität verhält sich das System robust hinsichtlich Änderungen des Parameters. Abbildung 4.12 zeigt die lokalen skalierten Sensitivitäten der Parameter k_I , k_{NH_4} , $e_{N,P}$, K_c und K_z in Bezug auf c_x , c_p und

c_{NH_4} für Chargenprozess I aus Kapitel 4.2.4. Sensitivitäten des Parametervektors von Chargenprozess II werden aufgrund des nahezu identischen Verlaufs nicht behandelt. Sämtliche Parameterverläufe weisen nach 3,45 d ein lokales Maximum, Minimum oder einen Wendepunkt auf. Bezogen auf die Biomassekonzentration c_X folgen alle Kurven anschließend ihrem Trend bis zu einer Prozesszeit von 12 d mit Ausnahme der Funktion für die Monod-Konstante k_{NH_4} , welche nach ihrem Minimum wieder gegen null strebt. Insgesamt führen höhere Werte der Korrekturkoeffizienten des Extinktionskoeffizienten K_c und K_z zu einer Erhöhung von der Biotrockenmassekonzentration c_X , wohingegen höhere Werte der Monod-Konstanten für PFD₀ und NH_4^+ , k_I und k_{NH_4} , sowie der Stickstoffmassenanteil für Proteine e_{NP} eine Minderung von c_X zur Folge haben. In Bezug auf die Proteinkonzentration c_P laufen die Kurven nach 3,45 d wieder gegen null mit Ausnahme von der skalierten Sensitivität $\delta c_P \delta e_{\text{NP}}^{-1}$, welche ihrem Trend weiter folgt und nach einer Prozesszeit von 4 d abflacht. Der Massenanteil von Stickstoff in den Proteinen e_{NP} besitzt die größte Sensitivität bezüglich der Proteinkonzentration c_P . Alle auf die Ammoniumkonzentration c_{NH_4} bezogenen skalierten Sensitivitäten streben nach 3,45 d wieder gegen null. Auch hier hat e_{NP} die größte Sensitivität bezüglich c_{NH_4} . In allen Sensitivitätsverläufen weisen die Parameter k_{NH_4} und K_z die größte Robustheit auf, ergo sind diese Parameter aus der Reaktionsrate nur schwer zu ermitteln. Im Gegenzug besitzen die Parameter k_I und e_{NP} die größte Sensitivität. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Parameterschätzfehlern aus Tabelle 4.4, nach welcher die Monod-Konstante für Ammonium k_{NH_4} und der Korrekturkoeffizient für den Extinktionskoeffizient K_z die höchste Streuung, die Monod-Konstante für PFD₀ k_I und der Stickstoff-Massenanteil für Proteine e_{NP} jedoch die geringste Streuung in der Parameterschätzung aufweisen.

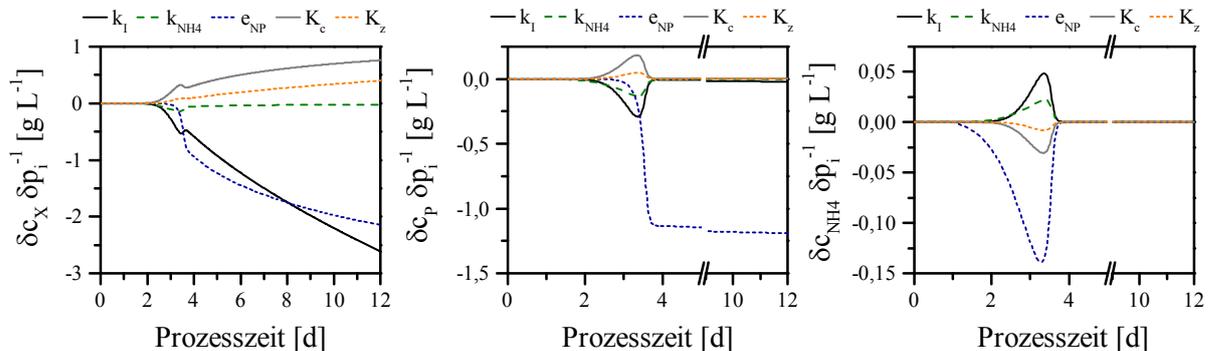


Abbildung 4.12: Skalierte Sensitivitäten der Parameter k_I , k_{NH_4} , e_{NP} , K_c und K_z mit $\delta p_i = p_i \Delta p_i^{-1}$ für c_X , c_P und c_{NH_4} für Chargenprozess I.

Zusätzlich zur lokalen Sensitivitätsanalyse wurde eine globale Sensitivitätsanalyse mit Simulink durchgeführt um Interaktionen des gesamten Parametervektors auf das Simulationsergebnis und dessen Abweichung zur Messgröße c_X aus Chargenprozess I zu untersuchen. Die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung der zufälligen Parameterwerte wurde anhand den ermittelten Werten aus der Parameterschätzung (Tabelle 4.3) mit einer Abweichung von $\pm 20\%$ festgelegt. Je Parameter wurden 200 Wertekombinationen simuliert und die Summe der resultierenden quadratischen Fehler ausgewertet (vgl. Abbildung

A14). Analog zu den in Abbildung 4.12 dargestellten Ergebnissen der lokalen Sensitivitätsanalyse besitzt der Parameter k_1 den größten Einfluss auf das globale Simulationsergebnis und die anderen Parameter.

4.3 Untersuchung von Prozessstrategien zur Beeinflussung einzelner Zellbestandteile

Um den Einfluss der Verfügbarkeit verschiedener Medienbestandteile und variierender Photonenflussdichten auf die Zusammensetzung photoautotropher Mikroorganismen genauer zu untersuchen, wurden zunächst Schüttelkolben-Vorversuche im Chargenprozess durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine genauere Untersuchung einzelner Faktoren in kontinuierlichen Prozessen. Hierbei lag das Hauptaugenmerk auf der Betrachtung der Steigerung des Gesamtproteingehalts in Folge einer Akkumulation einzelner Proteingruppen.

4.3.1 Schüttelkolben I

In der Versuchsreihe „Schüttelkolben I“ wurden parallele Schüttelkolben-Ansätze mit *Chlorella vulgaris* im Chargenprozess durchgeführt. Dabei wurde neben der Biomassekonzentration der Gesamtproteingehalt und der Gehalt an Chlorophyll a untersucht bei einer PFD_0 von 50, 100, 200 und 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Für jede eingestellte Photonenflussdichte kamen drei begaste Schüttelkolben zum Einsatz unter folgenden Versuchsbedingungen: 25 °C, pH 7,5, 5 kPa CO_2 , $V_{\text{Medium}} = 0,200 \text{ L}$, 2fach TP-Medium, vgl. Kapitel 3.1.2 und Kapitel 3.1.3. Abbildung 4.13 zeigt den Verlauf der der Biotrockenmassekonzentration, des Protein- und Chlorophyll a -Gehalts sowie der Stickstoffverfügbarkeit.

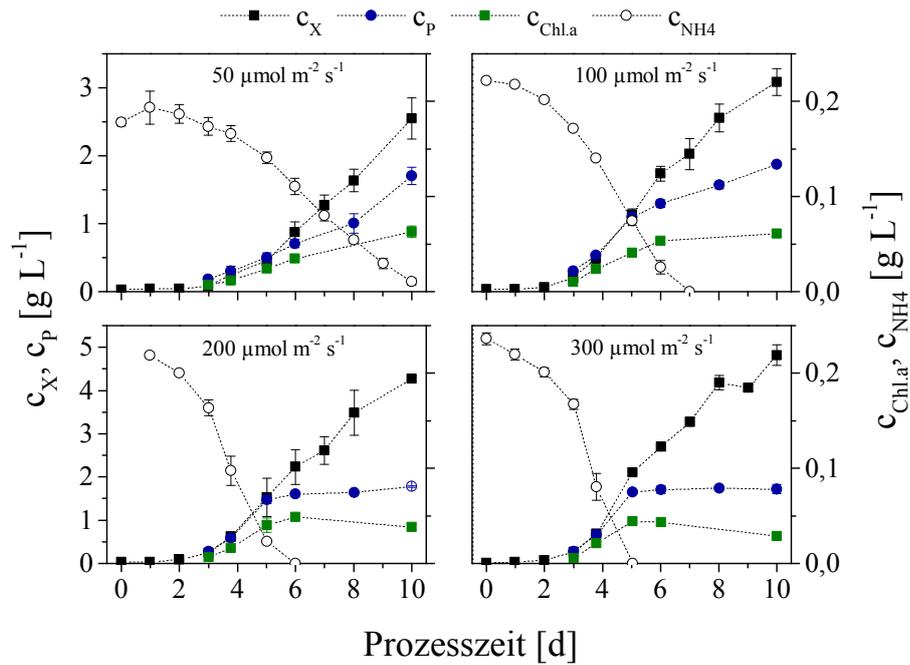


Abbildung 4.13: Vorversuch Schüttelkolben I in begasten Schüttelkolben mit *Chlorella vulgaris* im Chargenprozess bei verschiedenen Photonenflussdichten mit der Konzentration an Biotrockenmasse c_X , Proteinen c_P , Chlorophyll a $c_{Chl.a}$ und Ammonium c_{NH_4} .

Mit steigender Photonenflussdichte steigt die Biotrockenmassekonzentration schneller an, gleichzeitig wird das vorhandene Ammonium nach kürzerer Prozesszeit verbraucht. Die maximal erreichten Biotrockenmassekonzentrationen c_X betragen 2,55, 3,08, 4,27 und 4,82 $g L^{-1}$ bei einer Photonenflussdichte PFD_0 von jeweils 50, 100, 200 und 300 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$. Die Verläufe von c_X weisen die herkömmlichen Wachstumsphasen eines photoautotrophen Wachstums auf mit einer lag-, exponentiellen und linearen Phase. Während bei der geringsten Photonenflussdichte die Stickstoffquelle bis zum Versuchsende verfügbar war, wurde für $PFD_0 = 100, 200$ und $300 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ ein vollständiger Verbrauch des Stickstoffs nach 7 d, 6 d und 5 d beobachtet. Nach eintretender Stickstofflimitierung wurde weder die Proteinsynthese noch die Chlorophyll-Synthese weitergeführt. Lediglich der Proteinverlauf bei $PFD_0 = 100 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ verzeichnet einen Anstieg der Proteinkonzentration um 0,3 $g L^{-1}$. Die maximal erreichten Konzentrationen für c_P ergeben sich zu 1,70, 1,88, 1,78 und 1,72 $g L^{-1}$ bei einer Photonenflussdichte von jeweils 50, 100, 200 und 300 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$.

4.3.2 Schüttelkolben II - Design of Experiments

Um neben der Stickstoffverfügbarkeit den Einfluss weiterer Medienbestandteile auf die Protein- und Chlorophyllakkumulation zu ermitteln, wurden in der Versuchsreihe „Schüttelkolben II“ die Komponenten $MgSO_4$, $FeSO_4$, PO_4^{3-} (in Form von K_2HPO_4 und KH_2PO_4), NH_4Cl und $NaCl$ mittels statistischer Versuchsplanung (Design of Experiments) hinsichtlich der Zellquota für Proteine bei Versuchsende, bzw. nach einer Prozesszeit von sieben Tagen, untersucht. Dabei wurden folgende Versuchsbedingungen festgesetzt: Chargenprozess, $PFD_0 = 300 \mu mol m^{-2} s^{-1}$, $T_R = 25 \text{ } ^\circ C$, $pH = 7,5$, $p_{CO_2} = 5 \text{ kPa}$, V_{Medium}

= 0,200 L. Als Medium diente 2fach konzentriertes TP-Medium, vgl. Kapitel 3.1.2, wobei für die Konzentrationen der Komponenten MgSO_4 , FeSO_4 , PO_4^{3-} , NH_4Cl und NaCl die in Tabelle A4 angegebenen Werte verwendet wurden. Zu Beginn wurde ein Teilfaktorplan (Fractional Factorial Design) mit einem fold-over Design erstellt basierend auf der in Tabelle A5 angegebenen Versuchsmatrix und der in Tabelle A4 gelisteten Codierung. Insgesamt wurden 20 verschiedene Schüttelkolbenansätze analysiert. Abbildung 4.14, links, zeigt die gemessenen und die vorhergesagten spezifischen Proteinnengen vom Fractional Factorial Screening Design. Das statistische Modell beschreibt die Ergebnisse mit einem Wahrscheinlichkeitswert von $p < 0,0001$ und kann die experimentell ermittelten Werte mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,93$ wiedergeben. Zur Auswertung des Modells wurde ein zweiseitiger t-Test angewendet, dessen Ergebnisse in Tabelle 4.5 aufgeführt sind. Die signifikanten Mengenelemente sind als Erstes gelistet. Bezogen auf den spezifischen Proteingehalt zeigt Ammoniumchlorid den stärksten Einfluss und q_p steigt mit erhöhter Zugabe von NH_4Cl , wie der positive t-Wert von 11,23 ergibt. Weiterhin ergibt sich für dieses Substrat eine sehr hohe Signifikanz aufgrund des geringen p-Werts unter 0,0001. MgSO_4 und FeSO_4 in Kombination besitzen mit einem p-Wert von 0,0067 ebenfalls eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit, den Proteingehalt zu beeinflussen. Der t-Wert von -3,27 weist jedoch darauf hin, dass bereits geringe Konzentrationen von MgSO_4 und FeSO_4 hierfür ausreichen. Phosphat hat einen ausreichend kleinen p-Wert von 0,0243, um signifikant für die Proteinakkumulation zu sein. Der t-Wert von -2,58 weist darauf hin, dass die Prüfgröße im Signifikanzbereich liegt. Laut dem statistischen Modell zeigen NaCl und MgSO_4 alleine betrachtet keinen Einfluss auf die Zielgröße. Aus den dargestellten Ergebnissen lassen sich anhand der Vorhersageformel des Modells für eine maximale spezifische Proteinnmenge von $q_p = 0,62 \text{ g g}^{-1}$ die notwendigen Konzentrationsniveaus ausgeben: $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 1,5 \text{ g L}^{-1}$, $c(\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}) = 0,8 \text{ g L}^{-1}$, $c(\text{PO}_4^{3-}) = 0,162 \text{ g L}^{-1}$, $c(\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}) = 0,01 \text{ g L}^{-1}$ und $c(\text{NaCl}) = 0,0 \text{ g L}^{-1}$. Um unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine Erhöhung von q_p zu erreichen, müssen zu einem 2fach konzentrierten TP Medium ergo eine 2fach erhöhte Zugabe von NH_4Cl , eine 4fach erhöhte Zugabe von $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ sowie keine erhöhte Zugabe von $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, PO_4^{3-} und NaCl erfolgen. Eine visuelle Darstellung der Ergebnisse in Form eines Konturplots ist exemplarisch für die Mengenelemente $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ und NH_4Cl in Abbildung 4.14 rechts gezeigt. Eine Veränderung der Menge an MgSO_4 verändert den Zielparameter q_p weniger als eine Zugabe von NH_4Cl . Ein prozentualer Proteinanteil von über 53 % wird erreicht durch Verwendung von $1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ und $0,8 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$. Gemittelt über alle Experimente betrug $q_p = 0,4 \text{ g g}^{-1}$.

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Medienkomponenten des Fractional Factorial Screening Designs bezüglich der spezifischen Proteinnmenge von *Chlorella vulgaris*, basierend auf einem zweiseitigen t-Test mit einer Signifikanzgrenze von $\alpha = 0,05$. Die Konzentrationsniveaus der untersuchten Substrate sind in Klammern angegeben, der Parameterschätzwert liefert den Koeffizienten für die Vorhersageformel des Modells.

Medienkomponente	c_{\min} ; c_{\max} [g L ⁻¹]	Parameter- schätzwert	Standardfehler	t-Wert	p-Wert
(NH ₄ Cl)	0,75 ; 1,5	0,11016818	0,00980888	11,23	< 0,0001

ERGEBNISSE

(MgSO ₄ x 7 H ₂ O) · (FeSO ₄ x 7 H ₂ O)	-	-0,03207303	0,00980888	-3,27	0,0067
(PO ₄ ³⁻)	0,162 ; 0,486	-0,02526439	0,00980888	-2,58	0,0243
(FeSO ₄ x 7 H ₂ O)	0,01 ; 0,05	-0,01743729	0,00980888	-1,78	0,1008
(NaCl)	0,0 ; 7,5	-0,01191379	0,00980888	-1,21	0,2479
(MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	0,2 ; 0,8	0,01020294	0,00980888	1,04	0,3188
(MgSO ₄ x 7 H ₂ O) · (PO ₄ ³⁻)	-	-0,00714887	0,00980888	-0,73	0,4801

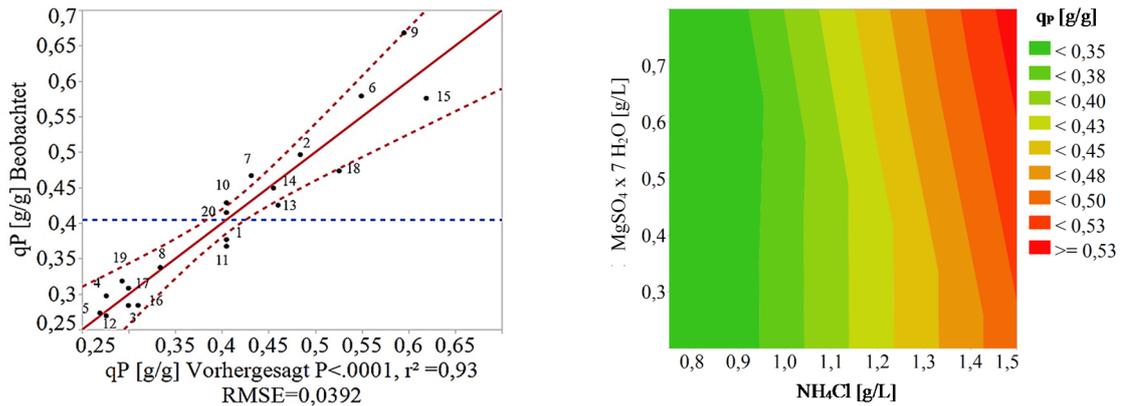


Abbildung 4.14: Zellquota für Proteine q_P für gemessene und vorhergesagte Ergebnisse des Fractional Factorial Screening Designs (links) mit resultierendem Konturplot der Parameter $MgSO_4 \times 7 H_2O$ und NH_4Cl und deren Einfluss auf q_P (rechts) für *Chlorella vulgaris*.

Um mögliche Interaktionen und deren Auswirkungen auf die spezifische Protein- oder Chlorophyllmenge genauer zu analysieren, wurde im Anschluss zum Fractional Factorial Screening Design ein Optimierungsdesign mittels Response Surface Methodology (RSM) entworfen, vgl. Kapitel 3.4. Dabei wurden die Mengenelemente NH_4Cl , $MgSO_4 \times 7 H_2O$ und $FeSO_4 \times 7 H_2O$ betrachtet bezüglich ihrer Signifikanz aus Tabelle 4.5 oder ihres Effekts auf den Pigmentgehalt, vgl. Abbildung A8. Abgesehen von der in Tabelle A6 angegebenen Versuchsmatrix waren die Versuchsbedingungen des RSM Designs identisch. Die experimentell ermittelten und die von dem Modell vorhergesagten Daten der 12 Schüttelkolbenansätze stimmen sehr gut überein, wie dem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 1,00$ aus Abbildung 4.15, links, zu entnehmen ist. Der p-Wert beträgt $< 0,0099$ und die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (RSME) 0,0139. Die durchschnittliche Zellquota für Proteine beträgt $q_P = 0,5 \text{ g g}^{-1}$. Die Ergebnisse des Optimierungsdesigns sind in Tabelle 4.6 nach sinkendem Einfluss auf q_P gelistet. Neben dem Einfluss der einzelnen Komponenten sind quadratische und interaktive Beziehungen dargestellt. Die höchste Signifikanz mit einem positiven Effekt auf q_P verzeichnet Ammoniumchlorid in Kombination mit Magnesiumsulfat mit einem p-Wert von 0,004. Eine hohe Ammoniumchlorid-Konzentration (quadratischer Koeffizient) beeinflusst den Zielparameter negativ (t-Wert = -12,09), der p-Wert beträgt 0,0068. Ähnlich stark ist der Einfluss von Magnesiumsulfat und der Interaktion von Magnesium- und Eisensulfat auf q_P (p-Werte von 0,0082 bzw. 0,0085). Laut der Vorhersageformel des Modells ist unter den gegebenen Versuchsbedingungen ein maximaler Proteinanteil von $q_P = 0,65 \text{ g g}^{-1}$ erzielbar, wenn

folgende Substratkonzentrationen vorliegen: $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 3,88 \text{ g L}^{-1}$, $c(\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}) = 1,2 \text{ g L}^{-1}$ und $c(\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}) = 0,08 \text{ g L}^{-1}$. Das statistische RSM-Modell erlaubt neben der visuellen Darstellung der Ergebnisse in 2-dimensionalen Konturplots eine 3-dimensionale Darstellung. Abbildung 4.15, rechts, zeigt exemplarisch den Einfluss der Konzentrationsniveaus von NH_4Cl und MgSO_4 auf q_p . Sehr hohe oder sehr niedrige NH_4Cl -Konzentrationen von 5 g L^{-1} bzw. $1,2 \text{ g L}^{-1}$ resultieren in geringeren Proteinanteilen von bis zu 20 %. Gleichzeitig reduziert sich der Proteinanteil bei geringer Zugabe von MgSO_4 deutlich. Betrachtet man $q_{\text{Chl.a}}$ statt q_p für dieselben Komponenten, so bildet sich ein eindeutiges Maximum aus, vgl. Abbildung A8. Die Vorhersageformel des RSM-Designs gibt einen Höchstwert von $50,7 \text{ mg g}^{-1}$ für Chlorophyll a an, allerdings unter leicht abweichenden Konzentrationsniveaus von $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 3,26 \text{ g L}^{-1}$, $c(\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}) = 0,98 \text{ g L}^{-1}$ und $c(\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}) = 0,08 \text{ g L}^{-1}$. Korreliert man sämtliche Zellquota für Proteine und Chlorophyll a des Fractional Factorial Screening Designs und des Optimierungsdesigns, so ergibt sich ein Verhältnis von $q_{p,\text{Chl.a}} = 8 \text{ g g}^{-1}$ ($R^2 = 0,83$, siehe Abbildung A9).

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Mengenelemente des Optimierungsdesigns bezüglich der spezifischen Proteinmenge von *Chlorella vulgaris*, basierend auf einem zweiseitigen t-Test mit einer Signifikanzgrenze von $\alpha = 0,05$. Die Konzentrationsniveaus der untersuchten Parameter sind in Klammern angegeben, der Parameterschätzwert liefert den Koeffizienten für die Vorhersageformel des Modells.

Medienkomponente	$c_{\text{min}} ; c_{\text{max}}$ [g L ⁻¹]	Parameter- schätzwert	Standardfehler	t-Wert	p-Wert
(NH ₄ Cl) · (MgSO ₄ x 7H ₂ O)	-	0,1223023	0,007761	15,76	0,004
(NH ₄ Cl) · (NH ₄ Cl)	-	-0,107449	0,008891	-12,09	0,0068
(MgSO ₄ x 7H ₂ O)	0,5 ; 1,2	0,0635627	0,005799	10,96	0,0082
(FeSO ₄ x 7H ₂ O) · (MgSO ₄ x 7H ₂ O)	-	0,0803806	0,007458	10,78	0,0085
(MgSO ₄ x 7H ₂ O) · (MgSO ₄ x 7H ₂ O)	-	-0,07229	0,008705	-8,3	0,0142
(NH ₄ Cl) · (FeSO ₄ x 7H ₂ O)	-	-0,039174	0,007574	-5,17	0,0354
(FeSO ₄ x 7H ₂ O)	0,03 ; 0,08	-0,028384	0,005784	-4,91	0,0391
(FeSO ₄ x 7H ₂ O) · (FeSO ₄ x 7H ₂ O)	-	-0,008972	0,009576	-0,94	0,4477
(NH ₄ Cl)	1,2 ; 5,0	0,0046544	0,005521	0,84	0,488

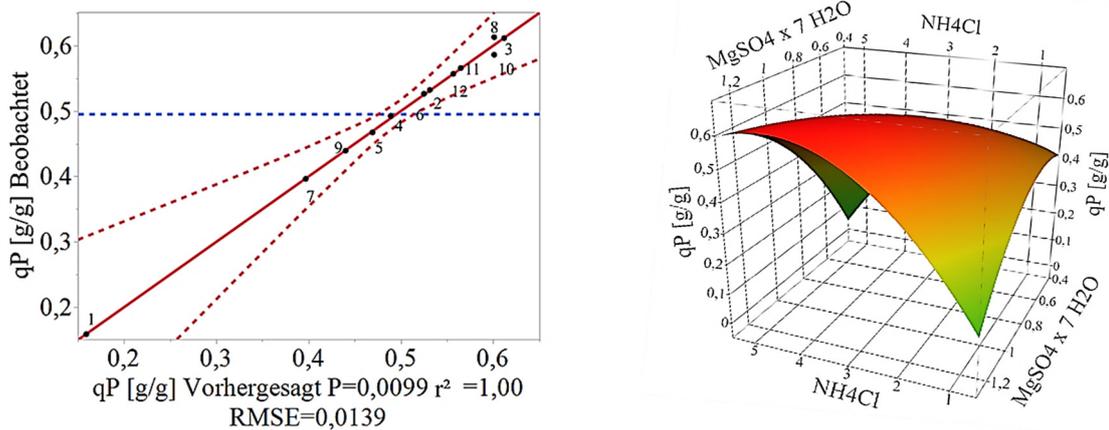


Abbildung 4.15: Zellquota für Proteine q_P für gemessene und vorhergesagte Ergebnisse des Optimierungsdesigns (links) und 3D-Plot des Optimierungsdesigns der Parameter NH_4Cl und $MgSO_4$ in $g L^{-1}$ und deren Einfluss auf die Zellquota für Proteine q_P (rechts) für *Chlorella vulgaris*.

4.3.3 Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit

Um eine gezielte Veränderung der Zellzusammensetzung durch Variation der Stickstoffverfügbarkeit zu erreichen, wurden kontinuierliche Prozesse im Luminostat-Modus in Midi-Plattenreaktoren gefahren, vgl. Kapitel 3.1.6. Die Prozessbedingungen für den Stamm *Chlorella vulgaris* sind wie folgt: Begasungsrate $0,4 vvm$, $p_{CO_2} = 2 kPa$, $PFD_0 = 330 \mu mol m^{-2} s^{-1}$, $V_R = 1,0 L$, $pH = 7,5$, $T_R = 25 \text{ }^\circ C$, Sollwert Transmission für PI-Regler Zulaufpumpe $PFD_{trans} = 20 \mu mol m^{-2} s^{-1}$. Als stickstoffarmes bzw. -reiches Medium diente 1fach bzw. 2,5fach konzentriertes TP Medium. In folgenden Zeiträumen kamen die Medien zum Einsatz: 1fach TP zwischen 3 d und 8 d, dann 2,5fach TP bis 10,2 d, anschließend wieder 1fach TP bis 13,9 d und schließlich 2,5fach TP bis zum Versuchsende nach einer Prozesszeit von 18 d. Der Prozessverlauf ist in Abbildung 4.16 zu sehen. Innerhalb von 2,7 d sank die Transmission von $PFD_{trans} = 285 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ auf $PFD_{trans} = 20 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ und der kontinuierliche Prozess wurde durch Aktivierung des PI-Reglers für die Zulaufpumpe gestartet. Daher stiegen ab diesem Zeitpunkt das Volumen an zugeführtem Medium V_{Zulauf} sowie die Pumprate \dot{V}_{Zulauf} an, was eine stabile Biomassekonzentration c_X zwischen $1,06 - 1,21 g L^{-1}$ bis zum Eintritt der Substratlimitierung nach 6,8 d zur Folge hatte. Abgesehen von Ammonium standen die restlichen Komponenten des TP-Mediums ausreichend zur Verfügung, wie ionenchromatographische Messungen bestätigten, vgl. Kapitel 3.2.11. Während der stickstofflimitierten Wachstumsphase ist ein Anstieg von c_X auf $2,24 g L^{-1}$ nach 7,8 d zu beobachten, was ungefähr einer Verdoppelung der Biomassekonzentration entspricht. Im gleichen Zeitraum steigt die Zellzahl um das Fünffache, von $4,53 - 5,20 \cdot 10^{10} Zellen L^{-1}$ auf $2,43 \cdot 10^{11} Zellen L^{-1}$ nach 7,8 d. Unter Berücksichtigung des Verhältnisses Masse pro Zelle spricht dies für eine Verkleinerung des Zelldurchmessers, wie eine morphologische Betrachtung der Zellen unter dem Lichtmikroskop bestätigte (vgl. Abbildung A11). Der Zelldurchmesser verkleinerte sich von $5 - 10 \mu m$ auf $2 - 5 \mu m$. Trotz Anstieg der Biomassekonzentration und der Zellzahl bleibt das Transmissionssignal unverändert. Dies bedeutet,

dass die akkumulierte Biomasse (in Form von Speicherstoffen) und die veränderte Zellzahl bzw. -morphologie keine Veränderung der Absorption von Photonen im PAR-Bereich bewirken. Allerdings wurde eine erhöhte Trübung, gemessen bei einer Wellenlänge von 750 nm, beobachtet.

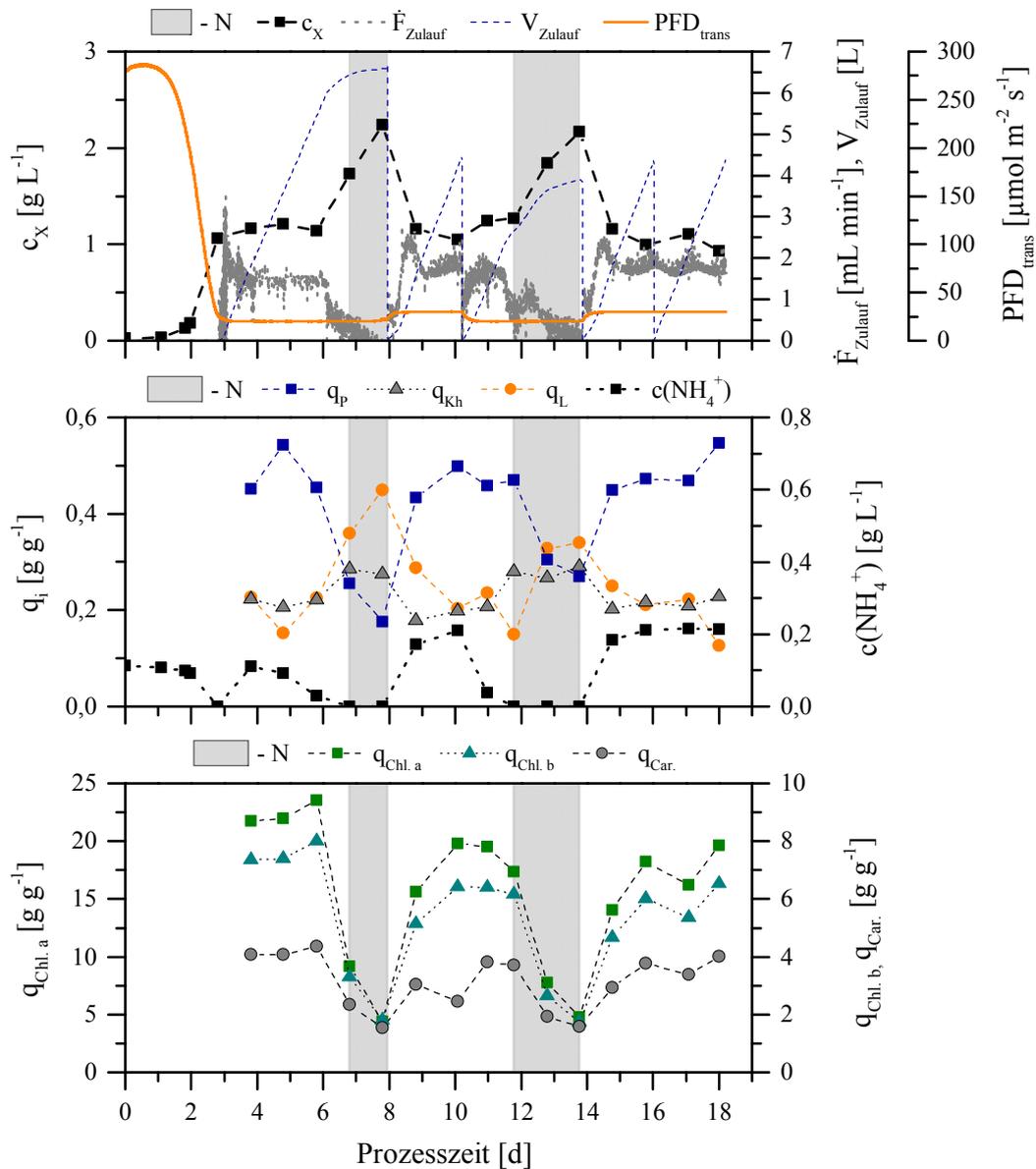


Abbildung 4.16: Prozessverlauf bei einem kontinuierlich betriebenen Midi-Plattenreaktor im Luminostat-Modus zur Beeinflussung der makromolekularen Zellzusammensetzung von *Chlorella vulgaris* durch den Faktor Stickstoff, mit der Biotrockenmassekonzentration c_X , dem Transmissionssignal im PAR-Bereich PFD_{trans} , der Pumprate an zugeführtem Medium \dot{F}_{Zulauf} sowie dem zugeführtem Volumen an frischem Medium V_{Zulauf} (oben); der Ammoniumkonzentration $c(\text{NH}_4^+)$ und den Zellquota für Proteine q_p , Kohlenhydrate q_{Kh} und Lipide q_L (mittig); sowie den Zellquota für Chlorophyll a $q_{Chl.a}$, Chlorophyll b $q_{Chl.b}$ und Carotinoide $q_{Car.}$ (unten). Die grauen Balken (-N) markieren den Zeitraum in welchem $c(\text{NH}_4^+) = 0 \text{ mg L}^{-1}$ gilt.

Durch einen Medienwechsel nach einer Prozesszeit von 8 d zu 2,5fach TP und einer Erhöhung des Transmission-Sollwerts auf $PFD_{trans} = 30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$, wurde die Kultur mit frischem Stickstoff versorgt, was ein Absinken der Konzentration an Biomasse sowie der Zellzahl nach 8,8 d auf $c_X = 1,16 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $c_{Zellen} = 5,19 \cdot 10^{10} \text{ Zellen L}^{-1}$ bewirkte. Ein Medienwechsel von 1fach TP auf 2,5fach TP induzierte nach 11,8 d bzw. 13,8 d erneut die beschriebenen Phänomene des stickstofflimitierten und stickstoffge-

sättigten Wachstums. Über die Steigung des Signals V_{Zulauf} war es möglich die spezifische Wachstumsrate μ zu berechnen mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 \geq 0,99$. In Übereinstimmung mit den ermittelten Wachstumskinetiken aus Kapitel 4.1.1 betrug diese $\mu = 2,10 \pm 0,08 \text{ d}^{-1}$ unter Stickstoffsättigung, reduzierte sich mit Beginn der Stickstofflimitierung auf $\mu = 1,84 \pm 0,05 \text{ d}^{-1}$ und strebte mit fortschreitender Limitierungsdauer gegen null. Die Pumprate \dot{V}_{Zulauf} betrug zwischen $1,5 - 1,8 \text{ mL min}^{-1}$ während ausreichend Stickstoff vorhanden war und fiel mit sinkender Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. Mit einer maximalen Ammoniumkonzentration im Medium von $c(\text{NH}_4^+) = 215,4 \text{ mg L}^{-1}$ ergibt sich ein spezifischer Stickstoffgehalt $e_{N,X} = 8,1 \pm 0,8 \%$ bzw. ein Ausbeutekoeffizient von $Y_{X,N} = 12,37 \pm 1,25 \text{ g g}^{-1}$. Unter Verwendung eines Heizwerts von 18 kJ g^{-1} für *Chlorella vulgaris* [129] errechnet sich eine maximale PCE von $16,5 \%$ in der substratgesättigten Wachstumsphase. Die Zellquota für Proteine resultierten in einem Gehalt zwischen $q_P = 0,45 \text{ g g}^{-1}$ und $q_P = 0,55 \text{ g g}^{-1}$, welcher durch die Stickstofflimitierung auf $0,18 - 0,30 \text{ g g}^{-1}$ sank. Der Speicherstoffanteil verhielt sich divergierend, mit Kohlenhydratanteilen zwischen $q_{Kh} = 0,27 \text{ g g}^{-1}$ und $q_{Kh} = 0,29 \text{ g g}^{-1}$ sowie Lipidanteilen zwischen $q_L = 0,33 \text{ g g}^{-1}$ und $q_L = 0,45 \text{ g g}^{-1}$ unter Stickstoffmangel. Bei ausreichender Stickstoffverfügbarkeit sanken die Anteile für q_{Kh} auf $0,18 - 0,23 \text{ g g}^{-1}$ und für q_L auf $0,15 - 0,29 \text{ g g}^{-1}$. Die zugehörigen Zellquota der Pigmente sind ebenfalls in Abbildung 4.16 zu finden. Der Gehalt an Chlorophyll a fiel durch die Stickstofflimitierung von $q_{Chl.a} = 20,1 \pm 2,3 \text{ mg g}^{-1}$ auf $q_{Chl.a} = 4,59 \pm 0,25 \text{ mg g}^{-1}$ ab. Chlorophyll b und die Carotinoide folgten diesem Trend und sanken von $q_{Chl.b} = 7,58 \text{ mg g}^{-1}$ und $q_{Car.} = 4,17 \text{ mg g}^{-1}$ auf $q_{Chl.b} = 2,54 \text{ mg g}^{-1}$ und $q_{Car.} = 1,95 \text{ mg g}^{-1}$. Die veränderte Pigmentzusammensetzung resultierte in einer Änderung des Absorptionsspektrums der Zellen bezüglich der Peakform und -höhe, vgl. Abbildung A10.

Um die Übertragbarkeit der Prozessstrategie zu verifizieren, wurden analoge Versuche mit den Stämmen *Nannochloropsis limnetica*, *Phaeodactylum tricorutum* und *Synechocystis* sp. BW86 durchgeführt. Abbildung 4.17 zeigt einen Ausschnitt des Prozessverlaufs für den jeweiligen Stamm.

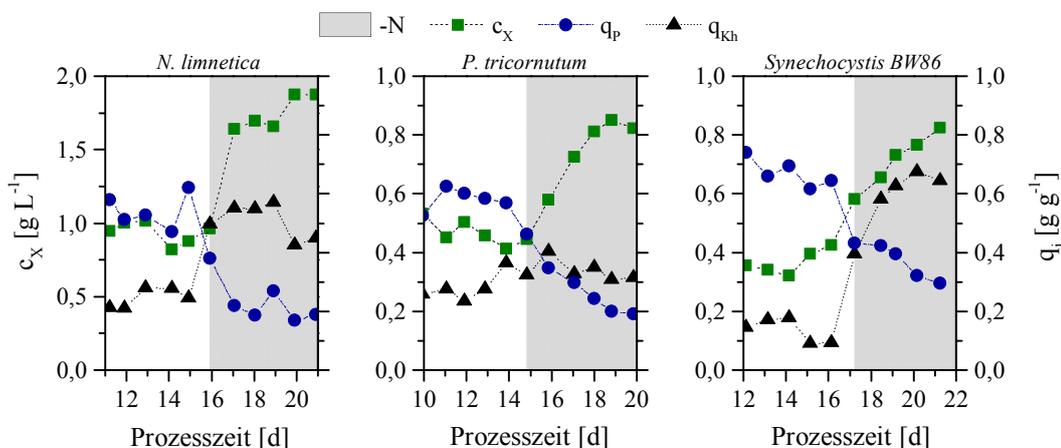


Abbildung 4.17: Prozessverlauf eines kontinuierlich betriebenen Midi-Plattenreaktors im Luminostat-Modus zur Untersuchung des Einflusses auf die makromolekulare Zellzusammensetzung von *Nannochloropsis limnetica* (links), *Phaeodactylum tricorutum* (mittig) und *Synechocystis* sp. BW86 (rechts) durch den Faktor Stickstoff, mit der Biotrockenmassekonzentration c_X sowie den Zellquota für Proteine q_P und Kohlenhydrate q_{Kh} . Die grauen Balken (-N) markieren den Zeitraum in welchem $c(\text{NH}_4^+) = 0$ bzw. $c(\text{NO}_3^-) = 0$ gilt.

Für den Stamm *Nannochloropsis limnetica* wurden folgende Prozessbedingungen eingestellt: $V_R = 1,0 \text{ L}$, $\text{PFD}_0 = 200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Begasungsrate $0,4 \text{ vvm}$, $p_{\text{CO}_2} = 2 \text{ kPa}$, $\text{pH} = 7,5$, $T_R = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, Transmissions-Sollwert für PI-Regler Zulaufpumpe $\text{PFD}_{\text{trans}} = 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Als stickstoffarmes bzw. -reiches Medium diente $\text{BG}^{11} \text{ 5xP}$ bzw. $\text{BG}^{11} \text{ 5xP -N}$, siehe Tabelle A3. Die maximale Nitratkonzentration im kontinuierlichen Prozess betrug $c(\text{NO}_3^-) = 786 \text{ mg L}^{-1}$. Ab einer Prozesszeit von $14,2 \text{ d}$ wurde das stickstoffarme Medium zugeführt, was ein stickstofflimitiertes Wachstum, mit $c(\text{NO}_3^-)$ unterhalb der Detektionsgrenze, ab $15,9 \text{ d}$ induzierte. Andere Substrate wirkten auf Basis der in Kapitel 3.2.11 beschriebenen ionenchromatographischen Analyse nicht limitierend. Während des substratgesättigten Wachstums stellte sich eine Transmission von $\text{PFD}_{\text{trans}} = 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bei einer Wachstumsrate von $\mu = 0,82 \text{ d}^{-1}$ und einer durchschnittlichen Konzentration an Biotrockenmasse c_X von $0,93 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$ ein. Nach einer Prozesszeit von $15,9 \text{ d}$ stieg c_X auf bis zu $1,87 \text{ g L}^{-1}$ an, bei gleichbleibender Transmission von $\text{PFD}_{\text{trans}} = 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Nach $19,5 \text{ d}$ war ein leichter Anstieg bis zu $\text{PFD}_{\text{trans}} = 14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bei Prozessende zu beobachten (Daten nicht aufgetragen). Die durchschnittliche Zellzahl stieg während diesen Zeitraums von $4,6 \cdot 10^{10} \pm 7,6 \cdot 10^{10} \text{ Zellen L}^{-1}$ auf $1,3 \cdot 10^{11} \pm 2,1 \cdot 10^9 \text{ Zellen L}^{-1}$. Unter dem Lichtmikroskop war eine Verkleinerung des Zelldurchmessers von $5 - 10 \mu\text{m}$ auf $3 - 8 \mu\text{m}$ zu beobachten. Bei ausreichender Verfügbarkeit von Stickstoff stellt sich außerdem ein spezifischer Gehalt von $e_{N,X} = 8,4 \pm 0,5 \%$ mit einem Ausbeutekoeffizienten von $Y_{X,N} = 11,98 \pm 0,55 \text{ g g}^{-1}$ ein. Die maximal erreichte PCE beträgt $5,6 \%$ mit einem Heizwert für *Nannochloropsis limnetica* von 18 kJ g^{-1} [129]. Die Protein-Zellquota q_P beträgt $0,47 - 0,62 \text{ g g}^{-1}$ zwischen 11 d und 15 d und sinkt in der stickstofflimitierten Phase auf $0,17 - 0,27 \text{ g g}^{-1}$. Der Kohlenhydratanteil verhält sich gegenläufig und steigt von $q_{\text{Kh}} = 0,24 \pm 0,04 \text{ g g}^{-1}$ auf $q_{\text{Kh}} = 0,51 \pm 0,06 \text{ g g}^{-1}$. Die nach Kapitel 3.3.2 berechnete Lipid-Zellquota unterliegt größeren Schwankungen, folgt jedoch demselben Trend mit durchschnittlich $q_L = 0,13 \text{ g g}^{-1}$ in der substratgesättigten Phase und $q_L = 0,18 \text{ g g}^{-1}$ bis $q_L = 0,30 \text{ g g}^{-1}$ in der substratlimitierten Phase. Eine Pigmentanalyse zeigte einen analogen Trend wie zuvor für *Chlorella vulgaris* ermittelt. Die durchschnittlichen Zellquota liegen bei $q_{\text{Chl.a}} = 20,1 \pm 2,3 \text{ mg g}^{-1}$, $q_{\text{Chl.b}} = 7,91 \pm 0,78 \text{ mg g}^{-1}$, $q_{\text{Car.}} = 4,40 \pm 0,25 \text{ mg g}^{-1}$ und sinken aufgrund der Stickstofflimitierung auf $q_{\text{Chl.a}} = 3,83 \pm 1,6 \text{ mg g}^{-1}$, $q_{\text{Chl.b}} = 1,51 \pm 0,65 \text{ mg g}^{-1}$, $q_{\text{Car.}} = 1,57 \pm 0,27 \text{ mg g}^{-1}$ (Daten nicht aufgetragen). Die Änderung der Zellzusammensetzung unter Stickstofflimitierung wirkte sich zudem auf die Absorptionsspektren der ganzen Zellen aus, vgl. Abbildung A10.

Abbildung 4.17 mittig zeigt einen Ausschnitt des Prozessverlaufs für *Phaeodactylum tricorutum*. Folgende Prozessbedingungen wurden verwendet: $V_R = 1,0 \text{ L}$, $\text{PFD}_0 = 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Begasungsrate $0,4 \text{ vvm}$, $p_{\text{CO}_2} = 2 \text{ kPa}$, $\text{pH} = 7,7$, $T_R = 21 \text{ }^\circ\text{C}$, Transmissions-Sollwert für PI-Regler Zulaufpumpe $\text{PFD}_{\text{trans}} = 15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Als Medium diente M&M bzw. „M&M -N“, siehe Tabelle A2. Die mittlere Nitratkonzentration während der Zugabe des M&M Mediums betrug $c(\text{NO}_3^-) = 450 \pm 24 \text{ mg L}^{-1}$ und sank nach dem Wechsel zu dem stickstoffarmen „M&M -N“ Medium auf $c(\text{NO}_3^-) = 0,34 \pm 0,06 \text{ mg L}^{-1}$. Andere Substrate lagen laut ionenchromatographischer Analyse (Kapitel 3.2.11) ausreichend vor. Der Wechsel

zu „M&M -N“ erfolgte nach 12,9 d und induzierte ein stickstofflimitiertes Wachstum nach 14,8 d. Dies führte zu einem Anstieg der Biotrockenmassenkonzentration von durchschnittlich $c_X = 0,45 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ auf bis zu $c_X = 0,85 \text{ g L}^{-1}$. Die Transmission im Luminostat wurde auf $\text{PFD}_{\text{trans}} = 15 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ geregelt, stieg in den letzten 3 - 4 d jedoch leicht an auf $\text{PFD}_{\text{trans}} = 19 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Daten nicht aufgetragen). Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigten das Vorhandensein aller Morphologien von *Phaeodactylum tricorutum* (dreihörnig, spindelförmig, oval) unter stickstoffgesättigten Bedingungen. Bei geringer Stickstoffverfügbarkeit bildete sich hauptsächlich die ovale Morphologie mit einzelnen spindelförmigen Zellen aus, vgl. Abbildung A11. Die spezifische Wachstumsrate unter Stickstoffsättigung betrug $\mu = 0,68 \text{ d}^{-1}$ mit $e_{N,X} = 0,12 \text{ g g}^{-1}$ und einem Ausbeutekoeffizienten von $Y_{X,N} = 8,05 \pm 0,38 \text{ g g}^{-1}$. Am Ende der Kultivierung betrug die Wachstumsrate $\mu = 0,05 \text{ d}^{-1}$. Die maximal erreichte PCE betrug 8,8 % unter der Annahme eines Heizwerts für *Phaeodactylum tricorutum* von $20,6 \text{ kJ g}^{-1}$ [119]. Die maximale Zellquota der Proteine lag bei $q_P = 0,63 \text{ g g}^{-1}$ und sank nach einer Prozesszeit von 14,8 d auf bis zu $q_P = 0,19 \text{ g g}^{-1}$. Analog war ein Rückgang des Pigmentgehalts zu beobachten. Der Anteil an Chlorophyll a sank von maximal $q_{\text{Chl.a}} = 22,17 \text{ mg g}^{-1}$ auf ein Minimum von $q_{\text{Chl.a}} = 4,05 \text{ mg g}^{-1}$, $q_{\text{Car.}}$ von $9,28 \text{ mg g}^{-1}$ auf $2,74 \text{ mg g}^{-1}$ (Daten nicht aufgetragen). Einen leichten Anstieg verzeichnete hingegen die Zellquota der Kohlenhydrate von durchschnittlich $q_{\text{Kh}} = 0,30 \pm 0,06 \text{ g g}^{-1}$ auf $q_{\text{Kh}} = 0,36 \pm 0,05 \text{ g g}^{-1}$. Höher war der Anstieg der Lipid-Zellquota mit $q_L = 0,10 \pm 0,05 \text{ g g}^{-1}$ unter stickstoffgesättigtem auf $q_L = 0,34 \pm 0,06 \text{ g g}^{-1}$ unter stickstoffarmen Wachstum. Anhand der Aufnahme von Absorptionsspektren ganzer Zellen konnte zudem eine Veränderung der Peakform und der Peakhöhe unter stickstofflimitiertem Wachstum festgestellt werden, vgl. Abbildung A10.

Ein Ausschnitt des kontinuierlichen Prozesses im Luminostat-Modus mit dem Stamm *Synechocystis* sp. BW86 ist in Abbildung 4.17, rechts, gegeben. Der Versuch wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt: $V_R = 1,0 \text{ L}$, $\text{PFD}_0 = 70 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Begasungsrate $0,4 \text{ vvm}$, $p_{\text{CO}_2} = 2 \text{ kPa}$, $\text{pH} = 7,5$, $T_R = 28 \text{ }^\circ\text{C}$, Transmissions-Sollwert für PI-Regler Zulaufpumpe $\text{PFD}_{\text{trans}} = 10 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Als stickstoffarmes bzw. -reiches Medium diente $\text{BG}^{11} \text{ 5xP}$ bzw. $\text{BG}^{11} \text{ 5xP -N}$, siehe Tabelle A3. Nach einer Prozesszeit von 12,3 d erfolgte der Wechsel zu dem „ $\text{BG}^{11} \text{ 5xP -N}$ “ Medium. Eine Stickstofflimitierung trat nach 17,2 d ein, die Biomassekonzentration nahm von durchschnittlich $c_X = 0,37 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ auf bis zu $c_X = 0,82 \text{ g L}^{-1}$ zu. In diesem Zeitraum war eine minimale Zunahme der Transmission von $\text{PFD}_{\text{trans}} = 5 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ auf $\text{PFD}_{\text{trans}} = 6 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ erkennbar (Daten nicht aufgetragen). Unter stickstofflimitiertem Wachstum konnte unter dem Lichtmikroskop vermehrt die Ausbildung von Granula beobachtet werden, vgl. Abbildung A11. Die höchste spezifische Wachstumsrate wurde mit $\mu = 0,67 \text{ d}^{-1}$ aus der Verdünnungsrate berechnet. Verwendet man einen Heizwert von 22 kJ g^{-1} für *Synechocystis* sp. BW86 [130], so errechnet sich die maximal PCE zu 11,2 %. Wenn die Zellen ausreichend mit Stickstoff versorgt waren, akkumulierten sie große Mengen an Proteinen von bis zu $q_P = 0,74 \text{ g g}^{-1}$. Im Falle einer Substratlimitierung sank dieser Anteil jedoch bis auf $q_P = 0,30 \text{ g g}^{-1}$ unter den gegebenen Versuchsbedingungen. Ein starker

Anstieg der Kohlenhydrat-Zellquota wurde während der stickstofflimitierten Phase festgestellt, insgesamt stieg diese durchschnittlich von $q_{Kh} = 0,14 \pm 0,04 \text{ g g}^{-1}$ auf $q_{Kh} = 0,63 \pm 0,05 \text{ g g}^{-1}$. Aufgrund der hohen Zellquota der Proteine bzw. Kohlenhydrate konnte kein nennenswerter Lipidanteil ermittelt werden, was darauf schließen lässt, dass *Synechocystis* sp. BW86 eine sehr geringe Lipid-Zellquota ($q_L \leq 10 \%$) besitzt. Tabelle 4.7 listet zusammenfassend die Bereiche der Zellquota sowie wichtige Versuchsgrößen aller untersuchter Stämme auf.

Tabelle 4.7: Zellquota der Stämme *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis limnetica*, *Phaeodactylum tricorutum* und *Synechocystis* sp. BW86 für Proteine q_P , Lipide q_L und Kohlenhydrate q_{Kh} sowie der Zellquota für Stickstoff q_N , dem Biomasse-Ausbeutekoeffizienten für Stickstoff $Y_{X,N}$, der maximal erreichten Photonenkoeffizienz PCE_{max} und der maximal erreichten spezifischen Wachstumsrate μ_{max} in den kontinuierlich betriebenen Midi-Plattenreaktoren im Luminostat-Modus mit induziertem Stickstoffmangel; n.a. = nicht auswertbar.

Parameter		<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis limnetica</i>	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	<i>Synechocystis</i> sp. BW86
q_P	[g g ⁻¹]	0,24 - 0,50	0,22 - 0,55	0,19 - 0,63	0,30 - 0,74
q_L	[g g ⁻¹]	0,22 - 0,39	0,13 - 0,24	0,10 - 0,36	$\leq 0,10$
q_{Kh}	[g g ⁻¹]	0,21 - 0,28	0,24 - 0,51	0,30 - 0,36	0,14 - 0,63
q_N	[g g ⁻¹]	8,1	8,4	12,4	n. a.
$Y_{X,N}$	[g g ⁻¹]	12,4	11,9	8,1	n. a.
PCE_{max}	[%]	16,5	5,6	8,8	11,2
μ_{max}	[d ⁻¹]	2,10	0,82	0,68	0,67

4.3.4 Einfluss der Phosphorquelle

Die Veränderung der Zellzusammensetzung bei variierender Phosphatverfügbarkeit wurde bei dem Stamm *Synechocystis* sp. und dem Speicherstoff Cyanophycin untersucht. Die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse sind ebenfalls in Trautmann et al. [15] zu finden. Verschiedene Chargenprozesse wurden in Midi-Plattenreaktoren dem Wildtyp *Synechocystis* sp. PCC6083 und dem genetisch modifizierten Stamm *Synechocystis* sp. BW86 vorgenommen. Dabei ist *Synechocystis* sp. BW86 aufgrund einer P_{II}-I86N Punktmutation in der Lage, höhere Cyanophycinanteile zu akkumulieren, siehe Kapitel 3.1.1. Unter folgenden Prozessbedingungen wurden die Versuche durchgeführt: Begasungsrate 0,4 vvm, $p_{CO_2} = 2 \text{ kPa}$, $V_R = 1,0 \text{ L}$, $PFD_0 = 70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $pH = 7,5$, $T_R = 28 \text{ }^\circ\text{C}$, Biomasse-Startkonzentration $c_X = 0,03 \text{ g L}^{-1}$. Als Medium diente BG¹¹ Medium, vgl. Tabelle A3. Durch eine Reduktion der Komponente K_2HPO_4 wurden die Startkonzentrationen an Phosphat auf $c(PO_4^{3-}) = 1,66 \text{ mg L}^{-1}$, $2,08 \text{ mg L}^{-1}$, $3,33 \text{ mg L}^{-1}$, $4,16 \text{ mg L}^{-1}$ und $16,65 \text{ mg L}^{-1}$ eingestellt. Dies entspricht einer Konzentration des Elements Phosphor von $c(\text{Phosphor}) = 0,54 \text{ mg L}^{-1}$, $0,68 \text{ mg L}^{-1}$, $1,09 \text{ mg L}^{-1}$, $2,71 \text{ mg L}^{-1}$ und $5,43 \text{ mg L}^{-1}$. Um eine Kaliumlimitierung durch Reduzierung der Medienkomponente K_2HPO_4 zu vermeiden, wurde das Medium außerdem im äquimolaren Verhältnis mit KCl versetzt. Abbildung 4.18

zeigt exemplarisch die Ergebnisse eines Chargenprozesses mit *Synechocystis* sp. BW86 bei einer Phosphat-Startkonzentration von $c(\text{PO}_4^{3-}) = 3,33 \text{ mg L}^{-1}$ bzw. einer Phosphor-Startkonzentration von $c(\text{Phosphor}) = 1,09 \text{ mg L}^{-1}$.

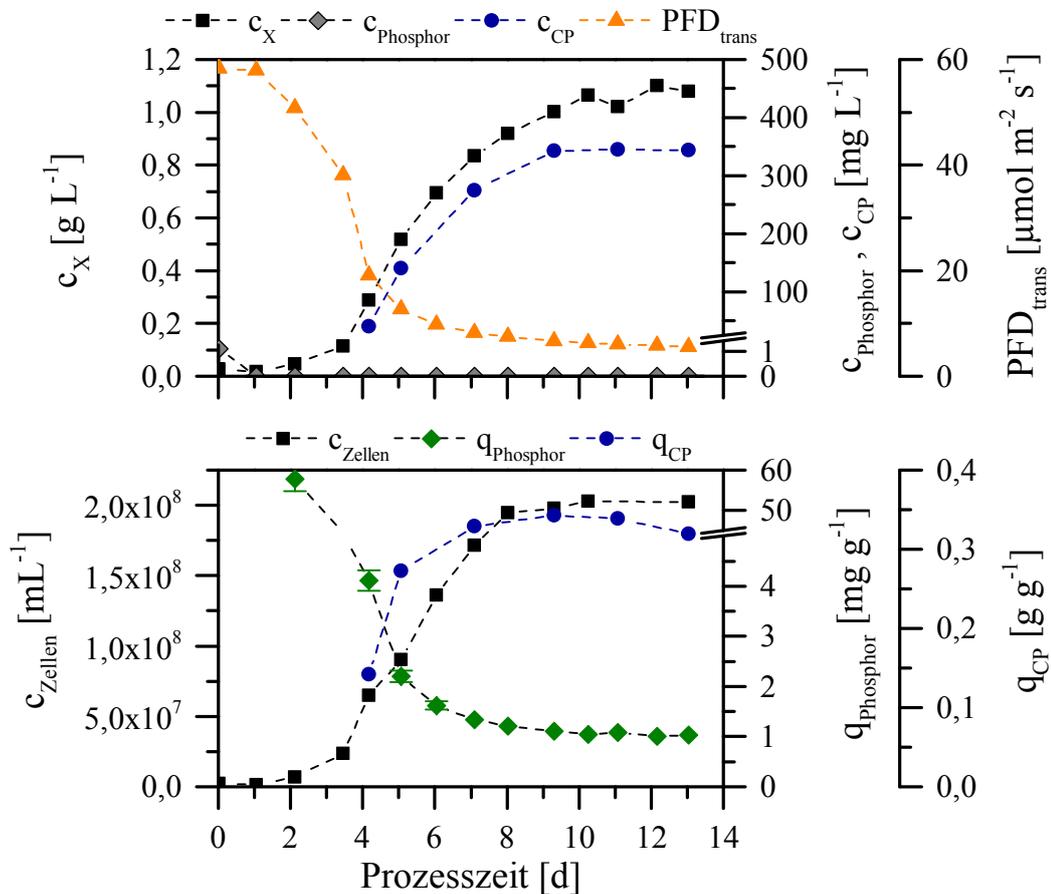


Abbildung 4.18: Prozessverlauf eines Chargenprozesses im Midi-Plattenreaktor zur Untersuchung des Einflusses der Phosphatverfügbarkeit auf die makromolekulare Zellzusammensetzung von *Synechocystis* sp. BW86 bei einer Phosphatkonzentration von $3,33 \text{ mg L}^{-1}$ ($1,09 \text{ mg L}^{-1}$ Phosphor), mit der Biotrockenmassekonzentration c_X , dem Transmissionssignal im PAR-Bereich $\text{PFD}_{\text{trans}}$, der Konzentration an Phosphor c_{Phosphor} und Cyanophycin c_{CP} (oben) sowie der Zellkonzentration c_{Zellen} und den Zellquota für Phosphor q_{Phosphor} und Cyanophycin q_{CP} (unten).

Die Zellen wuchsen exponentiell bis zu einer Prozesszeit von 4 d. Während dieser Zeit sank $\text{PFD}_{\text{trans}}$ um 67 % auf $19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Zwischen 4 d und 8 d nahm die Biomassekonzentration linear zu. Nach 8 d bis 9 d wurde die stationäre Wachstumsphase erreicht mit einer maximalen Biomassekonzentration von $c_X = 1,1 \text{ g L}^{-1}$. Die Transmission erreichte zu Versuchsende ein Minimum von $\text{PFD}_{\text{trans}} = 6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Da Phosphat die einzig limitierende Medienkomponente darstellte, kann die stationäre Wachstumsphase nur aufgrund einer eintretenden Phosphatlimitierung induziert worden sein. Laut ionenchromatographischer Analyse betrug nach 13 d die Konzentration von Nitrat $c(\text{NO}_3^-) = 0,864 \text{ g L}^{-1}$ und die von Sulfat $c(\text{SO}_4^{2-}) = 0,012 \text{ g L}^{-1}$. Die vorgelegte Phosphatkonzentration wurde also innerhalb eines Tages konsumiert. Die Cyanophycin-Konzentration erhöhte sich bis Eintritt in die stationäre Wachstumsphase um das 8,5fache von $c_{\text{CP}} = 40 \text{ mg L}^{-1}$ auf $c_{\text{CP}} = 340 \text{ mg L}^{-1}$, woraus eine Cyanophycin-Zellquota von jeweils $q_{\text{CP}} = 0,14 \text{ g g}^{-1}$ und $q_{\text{CP}} = 0,34 \text{ g g}^{-1}$ resultiert. Über den Prozessverlauf nahm q_{CP} während der linearen Wachstumsphase zu. Innerhalb der stationären Wachstumsphase war ein minimaler Rückgang

von $q_{CP} = 0,34 \text{ g g}^{-1}$ auf $0,32 \text{ g g}^{-1}$ zu beobachten, aufgrund der Zunahme von c_X zwischen 10 d und 13 d von $1,0 \text{ g L}^{-1}$ auf $1,1 \text{ g L}^{-1}$. Der Zuwachs von c_X kann durch die Akkumulation von Proteinen oder Speicherstoffen wie Lipiden, Polyhydroxybuttersäure (PHB) oder Glykogen erklärt werden [131]. Die Phosphor-Zellquota $q_{Phosphor}$ zeigte einen gegenläufigen Trend im Vergleich zu Zellkonzentration c_{Zellen} . Am Ende der exponentiellen Phase betrug $q_{Phosphor} = 4,1 \text{ mg g}^{-1}$ und reduzierte sich zu $q_{Phosphor} = 1,2 \text{ mg g}^{-1}$ am Ende der linearen bzw. zu $q_{Phosphor} = 1,0 \text{ mg g}^{-1}$ am Ende der stationären Wachstumsphase. Die Ergebnisse aus Abbildung 4.18 zeigen, dass die größte Zunahme von q_{CP} innerhalb einer Phosphor-Zellquota von $4,1 - 1,2 \text{ mg g}^{-1}$ ($= 16,6 - 6,0 \text{ ng Phosphor pro Zelle}$) auftrat und die stationäre Wachstumsphase bei $q_{Phosphor} = 1,0 \text{ mg g}^{-1}$ (bzw. $5,5 \text{ ng Phosphor pro Zelle}$) initiiert wurde.

Analog zu dem in Abbildung 4.18 dargestellten Beispiel wurden für *Synechocystis* sp. PCC6083 und *Synechocystis* sp. BW86 für alle angegebenen Phosphatkonzentrationen Chargenprozesse durchgeführt. Die zugehörigen Resultate der Cyanophycin-Zellquota q_{CP} und der erreichten Photokonversionseffizienz (PCE) in Abhängigkeit von der Phosphor-Zellquota c_P - als K_2HPO_4 im Medium vorgelegt - sind in Abbildung 4.19 aufgetragen.

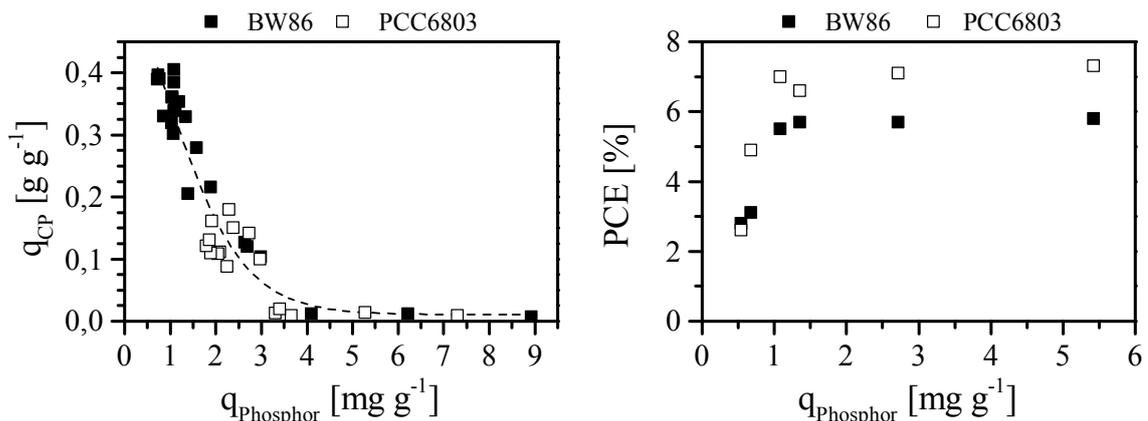


Abbildung 4.19: Cyanophycin-Zellquota q_{CP} (links) sowie die erreichte Photokonversionseffizienz (PCE, rechts) in Abhängigkeit von der Phosphor-Zellquota $c_{Phosphor}$ für *Synechocystis* sp. BW86 und *Synechocystis* sp. PCC6083.

Der genetisch modifizierte Stamm *Synechocystis* sp. BW86 erreichte Cyanophycinanteile von maximal 40,5 %, wohingegen der Wildtyp *Synechocystis* sp. PCC6083 maximal 18,0 % erzielte. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Akkumulation von Cyanophycin erst für Phosphoranteile unter $q_{Phosphor} = 4 \text{ mg g}^{-1}$ auftritt. Höhere Anteile haben keinen nennenswerten Effekt. Überdies konnte für $q_{Phosphor} < 1 \text{ mg g}^{-1}$ keine weitere Zunahme an q_{CP} festgestellt werden, da hier zumeist die stationäre Wachstumsphase einsetzte. Die stetig abnehmende Phosphor-Zellquota verhinderte höchstwahrscheinlich die Synthese weiterer Nukleinsäuren, wodurch der Zellmetabolismus zum Erliegen kam. Dabei sind allein die vorherrschende Phosphatlimitierung und nicht die zur Verfügung stehenden Photonen verantwortlich für die Einstellung der Stoffwechselaktivität, wie durch die reduzierte PCE für $q_{Phosphor} < 1 \text{ mg g}^{-1}$ bestätigt wurde. In der Regel besitzt der Wildtyp um eine 0,9 - 1,8 % erhöhte PCE gegenüber dem genetisch

modifizierten Stamm. Für Phosphor-Zellquota über 1 mg g^{-1} besitzt *Synechocystis* sp. PCC6083 eine durchschnittliche PCE von 7,0 %, *Synechocystis* sp. BW86 hingegen durchschnittlich 5,7 %.

Eine Zusammenfassung der Chargenprozesse bezüglich erreichter Biomassekonzentration, Zelldichten, Cyanophycin-Zellquota und PCE-Werte sind in Tabelle 4.8 aufgelistet. *Synechocystis* sp. PCC6083 erzielte höhere Biomassekonzentration und Zelldichten bei Versuchsende, was auf eine höhere Konvertierung des aufgenommenen Phosphats zu Biomasse hinweist. Im Gegenzug war die erreichte Cyanophycin-Zellquota bei Versuchsende geringer im Vergleich zu *Synechocystis* sp. BW86, was darauf hindeutet dass der genetisch modifizierte Stamm die vorhandenen Ressourcen vorzugsweise zur Aminosäure- bzw. Cyanophycin-Synthese verwendet verbunden mit einem negativen Effekt auf die Biomasseproduktion. Unter Berücksichtigung der PCE-Werte wird offensichtlich, dass der Wildtyp-Stamm die absorbierte Energie in Form von Photonen effizienter zu Biomasse konvertiert. Anhand der dargestellten Ergebnisse lassen sich folgende Schlussfolgerungen für den Wildtyp *Synechocystis* sp. PCC6803 sowie dem Produktionsstamm *Synechocystis* sp. BW86 formulieren:

- (i) die Synthese von Cyanophycin wird induziert für $q_{\text{Phosphor}} < 4 \text{ mg g}^{-1}$,
- (ii) das stöchiometrische Limit wird für $q_{\text{Phosphor}} < 1 \text{ mg g}^{-1}$ erreicht, hier geht das Zellwachstum in die stationäre Phase über,
- (iii) in Abhängigkeit von der Phosphat-Verfügbarkeit können unter den eingestellten Versuchsparametern Cyanophycinanteile von 10-40 % erreicht werden und
- (iv) die Zellen sind unter Phosphatlimitierung, bzw. für $q_{\text{Phosphor}} > 1 \text{ mg g}^{-1}$ nicht gestresst, wie die gleich bleibenden PCE-Werte belegen.

Tabelle 4.8: Vorgelegte Phosphor-Konzentrationen $c_{P,0}$, berechnet aus eingesetztem K_2HPO_4 , und zugehörige finale Biomassekonzentrationen $c_{X,\text{end}}$, Zellkonzentrationen $c_{\text{Zellen},\text{end}}$, Cyanophycin-Zellquota $c_{CP,\text{end}}$ und die erreichte Photokonversionseffizienz PCE von *Synechocystis* sp. BW86 (BW86) und *Synechocystis* sp. PCC6803 (6803); n.a. = nicht auswertbar.

$c_{P,0}$ [mg L ⁻¹]	$c_{X,\text{end}}$ [g L ⁻¹]		$c_{\text{Zellen},\text{end}}$ [mL ⁻¹]		$q_{CP,\text{end}}$ [g g ⁻¹]		PCE [%]	
	BW86	6803	BW86	6803	BW86	6803	BW86	6803
5.43	2.1	2.3	4.0×10^8	4.3×10^8	0.156	0.002	5.8	7.3
2.71	2.2	2.4	n.a.	4.5×10^8	0.159	0.016	5.7	7.1
1.36	1.6	2.0	n.a.	3.4×10^8	0.250	0.110	5.7	6.6
1.09	1.1	1.7	2.0×10^8	2.9×10^8	0.331	0.135	5.5	7.0
0.68	0.7	1.1	1.5×10^8	1.9×10^8	0.360	0.156	3.1	4.9
0.54	0.7	0.6	1.5×10^8	8.2×10^7	0.402	0.180	2.8	2.6

4.3.5 Einfluss der Photonenflussdichte

Der Einfluss der Photonenflussdichte auf die Zellzusammensetzung wurde durch Kombination eines kontinuierlichen Luminostat- und Chemostat-Prozesses im Maxi-Plattenreaktor, vgl. 3.1.7, realisiert.

Dabei sollte im Luminostat-Betrieb der Arbeitspunkt des lichtgesättigten Wachstums und im Chemostat-Betrieb der Arbeitspunkt des lichtlimitierten Wachstums angefahren werden, um Daten der Wachstumskinetiken aus Kapitel 4.1.1 zu verifizieren und hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung genauer zu untersuchen. Hierfür wurde *Chlorella vulgaris* unter folgenden Prozessbedingungen kultiviert: $V_R = 8,25$ L, $PFD_0 = 420 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Begasungsrate 0,05 vvm, $p_{\text{CO}_2} = 4$ kPa, $\text{pH} = 7,5$, $T_R = 25$ °C, Transmission für PI-Regler im Luminostat-Betrieb $PFD_{\text{trans}} = 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Als Medium wurde ein 2,5fach konzentriertes TP Medium für den Luminostat-Betrieb sowie ein modifiziertes TP Medium „TP_{mod.}“ für den Chemostat-Betrieb eingesetzt, vgl. Tabelle A1. Das Medium „TP_{mod.}“ verfügt über höhere Anteile der Komponenten für Stickstoff, Phosphor, Schwefel und Magnesium um Substratlimitierungen zu vermeiden. Der Prozessverlauf ist in Abbildung 4.20 abgebildet.

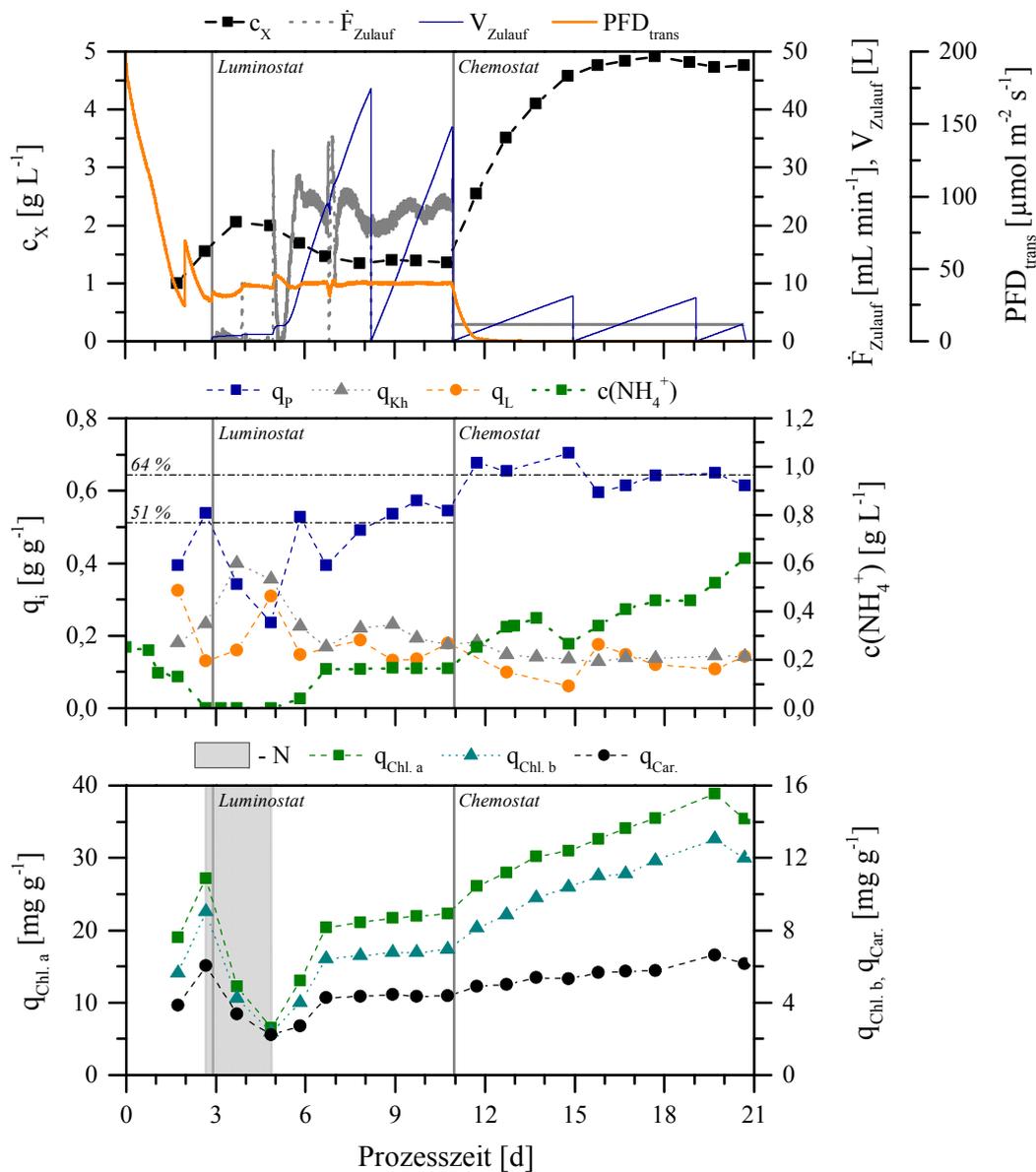


Abbildung 4.20: Prozessverlauf eines kontinuierlich betriebenen Maxi-Plattenreaktors im Luminostat- und Chemostat-Betrieb zur Untersuchung der Einflüsse auf die makromolekulare Zellzusammensetzung von *Chlorella vulgaris* durch den Faktor Photonenflussdichte, mit der Biotrockenmassekonzentration c_X , dem Transmissionsbereich PFD_{trans} , der Pumprate an zugeführtem Medium \dot{V}_{Zulauf} , dem zugeführtem Volumen an frischem Medium V_{Zulauf} (oben), der Ammoniumkonzentration $c(\text{NH}_4^+)$ und den Zellquota für Proteine q_p , Lipide q_L und Kohlenhydrate q_{Kh} (mittig), sowie den Zellquota für Chlorophyll a

$q_{\text{Chl.a}}$, Chlorophyll b $q_{\text{Chl.b}}$ und Carotinoide q_{Car} (unten). Die grauen Balken (-N) markieren den Zeitraum in welchem $c(\text{NH}_4^+) = 0$ gilt. Die grauen vertikalen Geraden markieren den Zeitraum in welchem die Zulaufpumpe ein- bzw. umgeschaltet wurde; die schwarzen horizontalen Geraden markieren die durchschnittliche Protein-Zellquota für die Prozesszeit 6,7 - 10,8 d ($q_p = 0,51 \text{ g g}^{-1}$) bzw. 11,7 - 20,7 d ($q_p = 0,64 \text{ g g}^{-1}$).

Die Transmission sinkt innerhalb von 2 d von $\text{PFD}_{\text{trans}} = 220 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ auf $\text{PFD}_{\text{trans}} = 24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Der Sprung auf $\text{PFD}_{\text{trans}} = 68 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ lässt sich mit einer Neuplatzierung der Transmissions-Messvorrichtung von der Reaktorunterseite auf die Reaktormitte begründen. Dies war notwendig, da sich aufgrund der Begasungsvorrichtung Totzonen an der Reaktorunterseite ausbildeten, welche die Aufzeichnung der Transmission verfälschten. Nach einer Prozesszeit von 2,9 d wurde der Luminostat-Betrieb durch Aktivierung des PI-Reglers der Zulaufpumpe gestartet. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt kein Ammonium mehr im Medium nachweisbar. Aufgrund der vorherrschenden Stickstofflimitierung stiegen das Volumen und die Pumprate an frisch zugeführtem Medium bis 4,8 d nur geringfügig an. Nach 4,8 d nahmen \dot{V}_{Zulauf} und V_{Zulauf} schließlich rapide zu; nach 6,7 d stellte sich ein stabiler Prozess ein mit einer durchschnittlichen Konzentration an Biomasse und Ammonium von $c_X = 1,37 \text{ g L}^{-1}$ und $c(\text{NH}_4^+) = 0,164 \text{ g L}^{-1}$. Hieraus resultierte $q_{\text{N,X}} = 8,5 \pm 0,3 \%$ und $Y_{\text{X,N}} = 11,75 \pm 0,42 \text{ g g}^{-1}$. Basierend auf einer externen Kjeldahl-Analyse zur Bestimmung des Aminosäuregehalts, vgl. Kapitel 3.2.9, betrug $q_{\text{N,X}} = 8,75 \%$. Die Transmission betrug zu diesem Zeitpunkt $\text{PFD}_{\text{trans}} = 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bei einer durchschnittlichen Pumprate von 21 mL min^{-1} . Durch die Integration von V_{Zulauf} bzw. des Waagensignals berechnet sich die maximale Wachstumsrate im Luminostaten zu $\mu_{\text{max}} = 1,71 \pm 0,05 \text{ d}^{-1}$. Die maximal erreichte PCE betrug $8,39 \%$. Anhand von V_{Zulauf} lassen sich weiterhin die Zeiträume des Medienwechsels erkennen. Nach 8,2 d wurde ein neuer Vorlagebehälter mit 2,5fach konzentriertem TP Medium abgeschlossen, nach 10,9 d folgte dann ein Medienwechsel zu TP_{mod} bis zum Versuchsende. Insgesamt wurden 80 L Medium in der Luminostat-Phase und 20 L Medium in der Chemostat-Phase verbraucht. Nach 10,9 d wurde der Luminostat-Prozess von dem Chemostat-Prozess durch manuelle Reduktion der Pumprate auf $\dot{V}_{\text{Zulauf}} = 2,9 \text{ mL min}^{-1}$ abgelöst. Innerhalb einer Prozesszeit von 2 d waren keinerlei transmittierende Photonen auf der Rückseite des Maxi-Plattenreaktors mehr messbar. Die Biotrockenmassekonzentration stieg unmittelbar nach Umstellung auf die unregelmäßige Pumprate an und erreichte nach 17,7 d ihr Maximum von $c_X = 4,9 \text{ g L}^{-1}$. Die Wachstumsrate betrug dabei $\mu = 0,23 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ mit einer PCE von $2,96 \%$. Aufgrund des verlangsamten Wachstums und der hohen vorgelegten Ammoniumkonzentration im TP_{mod} Medium begann $c(\text{NH}_4^+)$ stetig anzusteigen und erreichte nach 20,7 d einen Maximalwert von $c(\text{NH}_4^+) = 0,619 \text{ g L}^{-1}$. Im Vergleich zum Luminostaten erhöhte sich $q_{\text{N,X}}$ auf $11,5 \pm 0,01 \%$. Ausgehend von einer extern durchgeführten Kjeldahl-Analyse, vgl. Kapitel 3.2.9, wurde ein Stickstoffanteil von $q_{\text{N,X}} = 9,97 \%$ bestimmt. Zwischen 6,7 - 10,8 d wurden spezifische Anteile von durchschnittlich $q_p = 0,51 \text{ g g}^{-1}$, $q_{\text{Kh}} = 0,20 \text{ g g}^{-1}$ und $q_L = 0,16 \text{ g g}^{-1}$ erreicht. Die Produktbildungsrate für Proteine betrug $P_p = 1,21 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und der Stickstoffanteil der Proteine $17,0 \pm 2,4 \%$. Eine extern durchgeführte Fettsäureanalyse, vgl. Kapitel 3.2.6, ergab für eine Sammelprobe dieses Betriebspunkts einen Fettsäureanteil von $q_{\text{FS}} = 0,109 \text{ g g}^{-1}$, vgl. Tabelle 4.10. Die Messdaten in der Zeit bis zu 6,7 d konnten aufgrund der

vorherrschenden Stickstofflimitierung nicht verwendet werden. Vor allem die Zellquota für Chlorophyll a und b sowie der Carotinoide machen die Auswirkung des Stickstoffmangels deutlich. Im stabilen Luminostaten ergaben sich im Mittel Anteile von $q_{\text{Chl.a}} = 21,8 \pm 0,52 \text{ mg g}^{-1}$, $q_{\text{Chl.b}} = 6,77 \pm 0,15 \text{ mg g}^{-1}$ und $q_{\text{Car.}} = 4,37 \pm 0,06 \text{ mg g}^{-1}$. Während des Chemostat-Betriebs, zwischen einer Prozesszeit von 11,7 - 20,7 d, wiesen die Zellquota einen gleichmäßigeren Verlauf auf. Die Protein-Zellquota erhöhte sich auf $q_{\text{P}} = 0,64 \text{ g g}^{-1}$, während q_{Kh} auf $0,14 \text{ g g}^{-1}$ und q_{L} auf $0,12 \text{ g g}^{-1}$ sank. Der Stickstoffanteil der Proteine betrug $e_{\text{N,P}} = 18,0 \pm 1,7 \%$ und die Produktbildungsrate der Proteine $P_{\text{P}} = 0,706 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Die Fettsäureanalyse ergab für diesen Betriebspunkt einen Anteil von $q_{\text{L}} = 0,112 \text{ g g}^{-1}$, vgl. Tabelle 4.10. Ein linearer Anstieg war für den Pigmentanteil zu beobachten mit einem Maximum von $q_{\text{Chl.a}} = 35,3 \text{ mg g}^{-1}$ für Chlorophyll a, $q_{\text{Chl.b}} = 11,8 \text{ mg g}^{-1}$ für Chlorophyll b und $q_{\text{Car.}} = 5,94 \text{ mg g}^{-1}$ für Carotinoide. Tabelle A8 liefert eine tabellarische Zusammenfassung dieser Daten.

Mit Augenmerk auf den durchschnittlichen Gehalt von $q_{\text{P}} = 0,51 \text{ g g}^{-1}$ in der lichtgesättigten-Phase (Luminostat) und $q_{\text{P}} = 0,64 \text{ g g}^{-1}$ in der lichtlimitierten Phase (Chemostat), hervorgehoben durch die horizontale Strich-Punkt Linie mittig von Abbildung 4.20, konnte der Trend der Proteinakkumulation - wie zuvor in Kapitel 4.1.1 anhand der Wachstumskinetiken beschrieben - bestätigt werden. Um eine genauere Aussage zu bekommen, welche Proteingruppe für diese Zunahme verantwortlich ist, wurden für die jeweiligen Prozessphasen eine Aminosäuren-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde während den Prozesszeiten von 6,7 - 10,8 d und 11,7 - 20,7 d regelmäßig Kulturbrühe aus dem Überlauf entnommen und zu einer Sammelprobe vereinigt. Der Vergleich des Anstiegs spezifischer Aminosäureanteile aus den Sammelproben bei lichtgesättigtem und lichtlimitiertem Wachstum mit den Aminosäureanteilen bekannter Proteingruppen aus bioinformatischen Proteindatenbanken, vgl. Kapitel 3.3.2, sollte mögliche Zusammenhänge klären. Tabelle 4.9 listet die Ergebnisse auf. Die Summe der gemessenen Aminosäureanteile nahm vom Turbidostat- zum Chemostat-Prozess um 13,87 % zu und stimmt somit gut mit der Zunahme der in Abbildung 4.20 dargestellten durchschnittlichen Protein-Zellquota von $q_{\text{P}} = 0,51 \text{ g g}^{-1}$ auf $q_{\text{P}} = 0,64 \text{ g g}^{-1}$ überein. Weiterhin war eine Zunahme des Anteils essentieller Aminosäuren von 42,7 % zu beobachten, dabei verzeichneten die Anteile von Leucin mit 10,5 %, Phenylalanin mit 7,1 %, Valin mit 6,3 % und Threonin mit 6,0 % den stärksten Anstieg. Unter den nicht essentiellen Aminosäuren wiesen Asparagin und Asparaginsäure mit 13,0 %, Alanin mit 12,3 % sowie Glutamin und Glutaminsäure mit 7,8 % den größten Zuwachs auf. Eine Übereinstimmung des Anstiegs der analysierten Anteile $\Delta q_i / \sum(\Delta q_i)$ mit dem prozentualen Aminosäureanteil der Proteinkomplexe Photosystem I und II (PSI/II) oder Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO) ist jedoch schwer erkennbar. Stimmt der prozentuale Zuwachs der Aminosäuren Arginin und Phenylalanin beispielsweise gut mit $q_{\text{PSI/II}}$ überein, so zeigt $\Delta q_i / \sum(\Delta q_i)$ für die Aminosäuren Isoleucin und Valin eine bessere Übereinstimmung mit q_{RuBisCO} . Wird der prozentuale Zuwachs der Aminosäuren von der Luminostat- zur Chemostat-Probe, $\Delta q_i / \sum(\Delta q_i)$, mit dem prozentualen Anteil der jeweiligen Aminosäure im Photosystem

ERGEBNISSE

I und II, $q_{\text{PSI/II}}$, verglichen, so ergibt sich eine Übereinstimmung von insgesamt 77,2 %. Wird $\Delta q_i / \sum(\Delta q_i)$ hingegen mit der Aminosäureverteilung des Enzyms RuBisCO, q_{RuBisCO} , verglichen, so ergibt sich eine Übereinstimmung von insgesamt 72,2 %. Dies bedeutet, dass 12 der 18 analysierten Aminosäuren zu über 80 % den Anstieg von $\Delta q_i / \sum(\Delta q_i)$ zu $q_{\text{PSI/II}}$ beschreiben, darunter Ala, Arg, Glx, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp und Tyr. Nur 7 der 18 analysierten Aminosäuren beschreiben zu über 80 % den Anstieg von $\Delta q_i / \sum(\Delta q_i)$ zu q_{RuBisCO} , darunter Ala, Glx, Ile, Met, Thr, Tyr und Val. Daraus ist ein Trend zur Akkumulation von Aminosäuren, welche der Aminosäureverteilung der Photosysteme $q_{\text{PSI/II}}$ entsprechen, abzuleiten.

Tabelle 4.9: Aminosäureprofil von *Chlorella vulgaris* aus der lichtgesättigten (Luminostat) und lichtlimitierten (Chemostat) Wachstumsphase im Maxi-Plattenreaktors mit der prozentualen Zunahme einzelner Aminosäuren sowie dem prozentualen Aminosäureanteil der Proteinkomplexe Photosystem I und II (PSI/II) und Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO); *essentielle Aminosäure.

Aminosäure	$q_{i,\text{Turbidostat}}$ [mg g ⁻¹]	$q_{i,\text{Chemostat}}$ [mg g ⁻¹]	Δq_i [mg g ⁻¹]	$\Delta q_i / \sum(\Delta q_i)$ [%]	$q_{\text{PSI/II}}$ [%]	q_{RuBisCO} [%]
Ala	45,1	54,6	9,5	12,3	9,80	12,75
Arg	32,2	34,7	2,5	3,2	3,62	7,20
Asx	44,0	54,0	10,0	13,0	5,92	7,80
Cys	5,4	5,3	-0,1	-0,1	1,08	2,80
Glx	66,9	72,9	6,0	7,8	7,11	7,70
Gly	28,7	32,6	3,9	5,1	7,27	6,80
His	12,5	13,5	1,0	1,3	1,54	2,15
Ile*	16,1	19,1	3,0	3,9	6,75	3,15
Leu*	43,2	51,3	8,1	10,5	12,09	8,15
Lys*	28,1	31,8	3,7	4,8	3,46	3,45
Met*	11,7	13,1	1,4	1,8	2,26	1,90
Phe*	23,8	29,3	5,5	7,1	7,35	3,15
Pro	23,7	28,0	4,3	5,6	5,45	8,00
Ser	23,9	27,5	3,6	4,7	4,99	7,20
Thr*	22,2	26,8	4,6	6,0	6,45	6,20
Trp*	10,1	11,9	1,8	2,3	2,17	1,55
Tyr	16,1	19,6	3,5	4,5	3,91	3,85
Val*	25,6	30,5	4,9	6,3	8,75	5,95

Die Ergebnisse der Fettsäureanalytik aus der Sammelprobe des Turbidostat- und Chemostat-Betriebs sind in Tabelle 4.10 aufgelistet. Insgesamt konnten die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure (C16:0) sowie fünf ungesättigte Fettsäuren, darunter Myristoleinsäure (C14:1), Palmitoleinsäure (C16:1), Ölsäure (C18:1), Linolsäure (C18:2) und Alpha-Linolensäure (C18:3), nachgewiesen werden. Die unbekannte

Fettsäure Cn:i konnte mit den bei der Messung eingesetzten Standards, vgl. Kapitel 3.2.6, nicht zugeordnet werden. Eventuell könnte es sich dabei um die gesättigte Fettsäure Hexadecatriensäure (C16:3) handeln [124]. Die ungesättigten Fettsäuren repräsentieren 82,7 % bzw. 81,5 % des gesamten Fettsäureanteils der Turbidostat- bzw. Chemostat-Probe. Die Anteile der Fettsäuren in beiden Proben sind vergleichbar. Die größten Abweichungen von 0,0011 g g⁻¹, 0,0039 g g⁻¹ und 0,0074 g g⁻¹ treten bei den Werten für Myristoleinsäure (C14:1), Ölsäure (C18:1) und Linolsäure (C18:2) auf. Die Summe der spezifischen Anteile aller Fettsäuren in beiden Proben stimmt zu 97,3 % überein.

Tabelle 4.10: Fettsäureprofil von *Chlorella vulgaris* aus der lichtgesättigten (Luminostat) und lichtlimitierten (Chemostat) Wachstumsphase im Maxi-Plattenreaktor; LOD = Nachweisgrenze („limit of detection“); Cn:i = nicht im Standard der Messmethode vorkommende Fettsäure.

Probe	C14:1 [g g ⁻¹]	C16:0 [g g ⁻¹]	C16:1 [g g ⁻¹]	Cn:i [g g ⁻¹]	C18:1 [g g ⁻¹]	C18:2 [g g ⁻¹]	C18:3 [g g ⁻¹]	Σ [g g ⁻¹]
Turbidostat	0,0015	0,0188	< LOD	0,0279	0,0052	0,0108	0,0448	0,109
Chemostat	0,0026	0,0207	0,0005	0,0257	0,0013	0,0182	0,0430	0,112

4.4 Maßstabsvergrößerung in den Pilotmaßstab

Um eine ökonomisch sinnvolle Prozessstrategie mit hoher Proteinausbeute zu entwickeln, wurden Versuche im Pilotmaßstab durchgeführt. Zuvor war es allerdings notwendig, im Labormaßstab die Regelgüte des CO₂-Reglers sowie die Zellzusammensetzung bei Tag-Nacht-Zyklen zu untersuchen, um eine ausreichende Versorgung der Algen zu gewährleisten und eine überschüssige Zugabe von CO₂ zu vermeiden. Der direkte Einfluss der Kohlenstoffquelle CO₂ und der zugehörigen im Medium gelösten Carbonatspezies auf den pH-Wert stellte aufgrund der Zellatmung während den Nachtphasen eine besondere Herausforderung bei der Auslegung des CO₂-Reglers dar. Als Modellorganismus kam der Stamm *Chlorella vulgaris* zum Einsatz.

4.4.1 Regelgüte des CO₂-Reglers im Tag-Nacht-Betrieb

Um die Regelgüte des CO₂-Reglers im Tag-Nacht-Betrieb zu untersuchen, wurden Chargenprozesse im Rührkesselreaktor, vgl. Kap. 3.1.4, durchgeführt. Eine Beschreibung der Ermittlung der Regelparameter des PI-Reglers ist in Kapitel 3.3.5 zu finden. Abbildung 4.21 zeigt den Wachstumsverlauf und die zur Regelung notwendigen Messgrößen für einen Tag-Nacht-Chargenprozess im 12/12 h Zyklus. Zu Beginn wurde eine konstante Photonenflussdichte von PFD₀ = 150 μmol m⁻² s⁻¹ eingestellt, um Biomasse anzureichern. Nach 1,2 d erfolgte die Umstellung auf den Tag-Nacht Betrieb mit einer durchschnittlichen Photonenflussdichte von PFD₀ = 300 μmol m⁻² s⁻¹ gemittelt über 24 h und einem Tagesmaximum von PFD₀ = 884,6 μmol m⁻² s⁻¹. Außerdem wurden folgende Prozessbedingungen verwendet: Rührerdrehzahl 250 rpm, T_R = 25 °C, pH = 7,5, pCO₂ = 1 - 6 kPa, V_R = 1,7 L, 2fach TP-Medium (Kapitel 3.1.2). Während den Tagphasen stieg c_x aufgrund der Photosyntheseleistung der Zellen an und erreichte zu

Prozessende eine maximale Konzentration von $3,01 \text{ g L}^{-1}$. In den Nachtphasen wurde kein nennenswerter Anstieg von c_x beobachtet. Sowohl in den Tag- als auch in den Nachtphasen wurde Ammonium verbraucht. Nach 4,2 d konnte kein Ammonium mehr im Medium nachgewiesen werden. Andere untersuchte Nährstoffkomponenten wirkten nicht limitierend, mit $c(\text{PO}_4^{3-}) = 45,58 \text{ mg L}^{-1}$ und $c(\text{SO}_4^{2-}) = 12,81 \text{ mg L}^{-1}$ nach 6 d (Daten nicht aufgetragen).

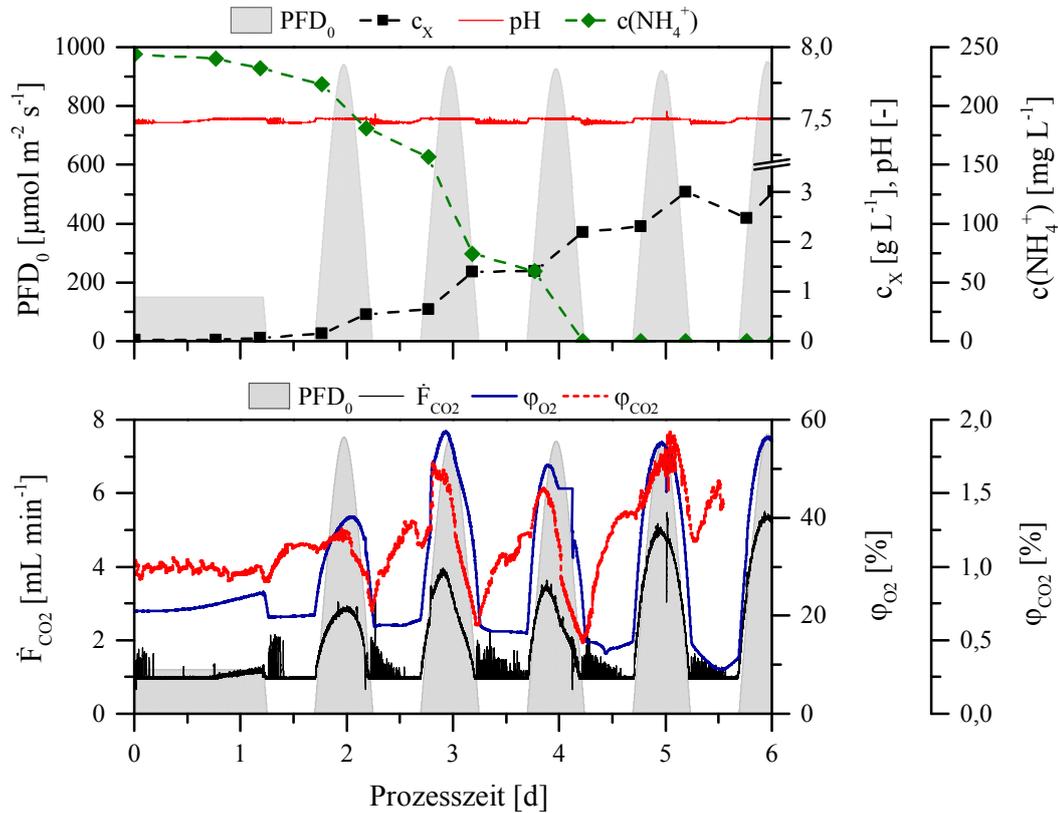


Abbildung 4.21: Prozessverlauf eines Tag-Nacht-Chargenprozesses im Rührkesselreaktor zur Überprüfung der eingestellten Regelparameter des CO_2 -Reglers, mit der Photonendichte PFD_0 , der Biotrockenmassekonzentration c_x , dem pH-Wert und der Ammoniumkonzentration $c(\text{NH}_4^+)$ (oben) sowie dem Volumenstrom an zugeführtem CO_2 \dot{F}_{CO_2} , dem O_2 - und CO_2 -Volumenanteil im Abgas φ_{O_2} bzw. φ_{CO_2} (unten).

Trotz wechselnder Lichtverhältnisse und somit variierender Mengen gelöster Carbonatspezies verblieb das pH-Signal mit geringen Abweichungen von $\pm 0,05$ bei einem Wert von $\text{pH} = 7,5$, was für eine gute Wahl der Regelparameter und eine hohe Regelgüte spricht. Der durchschnittliche CO_2 -Fluss betrug $\dot{F}_{\text{CO}_2} = 1,80 \text{ mL min}^{-1}$. Die Schwankungen von \dot{F}_{CO_2} , welche vor allem während den Nachtphasen auftraten, sind durch die Zugabe des pH-Stellmittels NaOH zu begründen. Der Regler versuchte durch Anpassung des CO_2 -Stroms, die verursachte pH-Wert Änderung auszugleichen. Ein kontinuierlicher Anstieg von \dot{F}_{CO_2} war zu Beginn der Tageszyklen zu beobachten. Stieg die Lichtverfügbarkeit, so war auch eine Erhöhung des CO_2 -Flusses zu beobachten. p_{CO_2} lag im Durchschnitt während den Tagphasen bei $p_{\text{CO}_2} = 1,27 \text{ kPa}$. Dies entspricht $1,25 \text{ \% CO}_2$ (v/v) im Abgas. Eine Kohlenstofflimitierung kann, aufgrund der in Kapitel 4.1.1 gezeigten Daten für die Wachstumskinetiken, ausgeschlossen werden. Außerdem zeigen die Photonendichte und der gelöste Sauerstoffanteil im Medium analoge Verläufe. Ein Maximalwert von $\varphi_{\text{O}_2} = 57,7 \text{ \%}$ (v/v) wird nach 2,9 d während der simulierten Mittagszeit

erreicht. Außerdem sank φ_{O_2} während den Nachtphasen mit steigendem c_x infolge der vermehrten Zellatmung. Letzteres war ebenfalls für die Zunahme des CO_2 -Anteils im Abgas während den Nachtphasen verantwortlich. Die gewählte PI-Reglereinstellung gewährleistete unabhängig von der Lichtverfügbarkeit eine ausreichende CO_2 -Versorgung. Die Regelung war zudem präzise genug, um trotz variierender Lichtverhältnisse einen stabilen pH-Wert zu gewährleisten.

4.4.2 Repetitiver Tag-Nacht-Chargenprozess im Labormaßstab

Als Vorversuch zu der Freiland-Kultivierung wurde ein repetitiver Chargenprozess („repeated batch“) mit Tag-Nacht-Zyklen im Rührkesselreaktor durchgeführt. Zur Vermeidung einer Stickstofflimitierung wurde das pH-Stellmittel 0,5 M NaOH durch eine 2,5 %ige Ammoniak-Lösung (v/v) ersetzt. Auch hier wurde ein Tag-Nacht-Zyklus von 12/12 h gewählt mit einer konstanten Photonenflussdichte zu Beginn von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, einer durchschnittlichen Photonenflussdichte innerhalb 24 h von $373,77 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einem Tagesmaximum von $1015,51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Weiterhin wurden nachfolgende Prozessbedingungen eingestellt: Rührerdrehzahl 250 rpm, $T_R = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,5$, $p_{CO_2} = 1 \text{ kPa}$ bis $p_{CO_2} = 5 \text{ kPa}$, 0,056 vvm, $V_R = 1,7 \text{ L}$, 2fach TP-Medium (Kapitel 3.1.2). Im Vergleich zu dem Experiment aus Kapitel 4.4.1 wurde die Einstellung des CO_2 -Reglers so verändert, dass keine Erhöhung von \dot{F}_{CO_2} für 30 min nach einer pH-Stellmittelzugabe stattfand, um unnötige CO_2 -Zugaben in den Nachtphasen zu vermeiden. Der Prozessverlauf ist in Abbildung 4.22 dargestellt.

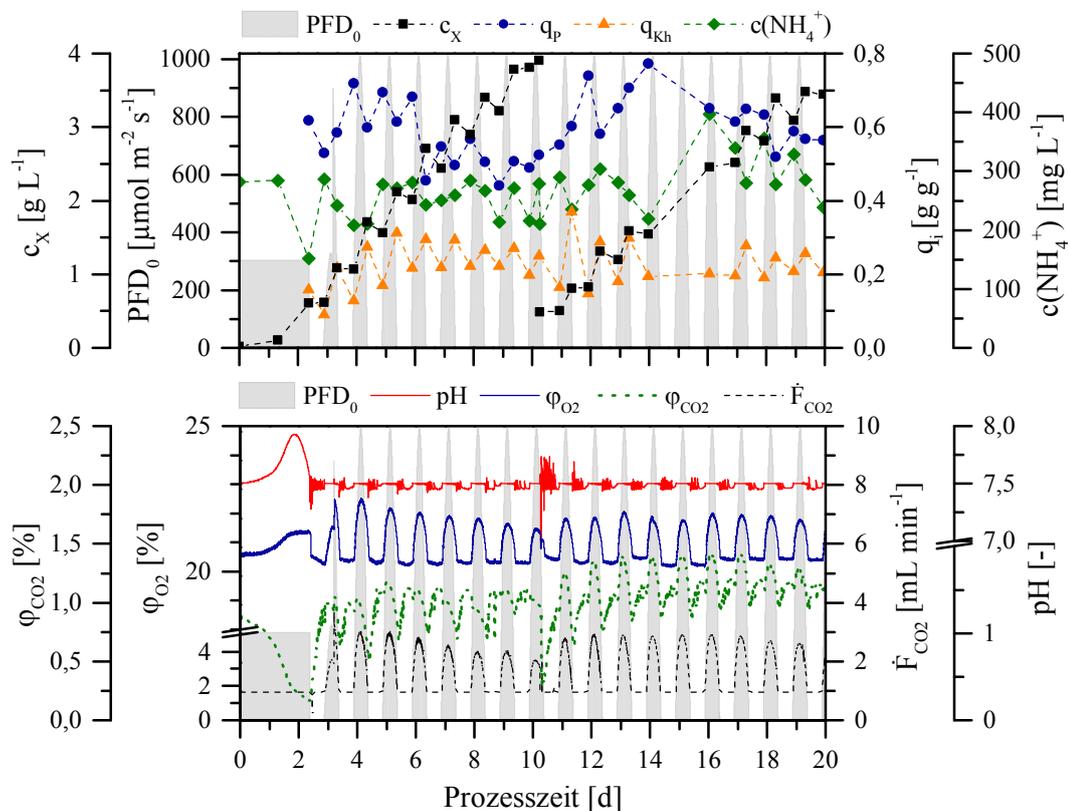


Abbildung 4.22: Prozessverlauf eines repetitiven Tag-Nacht-Chargenprozesses im Rührkesselreaktor als Vorversuch zur Freilandkultivierung, mit der Photonenflussdichte PFD_0 , der Biotrockenmasskonzentration c_x , den Zellquota für Proteine q_p und

Kohlenhydrate q_{kh} , der Ammoniumkonzentration $c(NH_4^+)$ (oben) sowie dem pH-Wert, dem Volumenstrom an zugeführtem CO_2 \dot{F}_{CO_2} , sowie dem O_2 - und CO_2 -Volumenanteil im Abgas φ_{O_2} bzw. φ_{CO_2} (unten).

Nach 2,4 d wurde der Tag-Nacht-Betrieb aktiviert. Bis zu einer Prozesszeit von 10,2 d stieg c_X mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0,44 \text{ d}^{-1}$ bzw. einer Produktivität von $P_X = 0,379 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ auf $c_X = 3,91 \text{ g L}^{-1}$ an. Im Anschluss wurde der repetitive Chargenprozess realisiert durch Entnahme eines Großteils des Reaktorvolumens und Wiederauffüllung mit frischem Medium bis zum Erreichen einer Biomassekonzentration von $c_X = 0,49 \text{ g L}^{-1}$. Bis zum Prozessende nach 20 d wurde mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0,35 \text{ d}^{-1}$ und einer Produktivität von $P_X = 0,305 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ eine Biomassekonzentration von $c_X = 3,45 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. Während den Nachtphasen wurde ein durchschnittlicher Biomasseverlust von 5 % beobachtet, welcher auf die Veratmung von den in der Tagphase angereicherten Kohlenhydrate zurückzuführen ist, wie die Zellquota belegen. Nach 5,4 d verhielt sich q_{kh} annähernd konstant mit durchschnittlichen Anteilen von $q_{kh} = 0,27 \text{ g g}^{-1}$ in den Tagphasen und $q_{kh} = 0,18 \text{ g g}^{-1}$ in den Nachtphasen. Dadurch ergab sich eine Reduzierung des Stärkeanteils von 33 % innerhalb der Dunkelphase. Einen entgegengesetzten Trend zeigt q_p . Der Proteingehalt stieg in den Nachtphasen um durchschnittlich 7 %. Gemittelt über die erste Chargenprozess-Phase bis 10,2 d gilt $q_p = 0,56 \text{ g g}^{-1}$, gemittelt über die zweite Chargenprozess-Phase bis 20 d gilt $q_p = 0,63 \text{ g g}^{-1}$. Am Anfang einer Chargenprozess-Phase war q_p außerdem etwas höher mit Maximalwerten von $q_p = 0,72 \text{ g g}^{-1}$ nach 3,9 d bzw. $q_p = 0,77 \text{ g g}^{-1}$ nach 13,9 d. Die Zellquota der Pigmente sind in Abbildung A12 zu finden. Ähnlich wie der Proteinanteil nahm der Pigmentanteil in den Nachtphasen zu und in den Tagphasen ab. Vor allem innerhalb der ersten Chargenprozess-Phase war ein genereller Rückgang des Pigmentanteils mit Ausnahme von $q_{Car.}$ zu beobachten. Innerhalb 10 d fällt $q_{Chl.a}$ von $33,5 \text{ mg g}^{-1}$ auf $22,1 \text{ mg g}^{-1}$ und $q_{Chl.b}$ von $12,1 \text{ mg g}^{-1}$ auf $8,1 \text{ mg g}^{-1}$. Während der zweiten Chargenprozess-Phase blieben die Pigmentanteile annähernd gleich mit $q_{Chl.a} = 20,2 \text{ mg g}^{-1}$, $q_{Chl.b} = 7,4 \text{ mg g}^{-1}$ und $q_{Car.} = 4,5 \text{ mg g}^{-1}$. Keine Medienkomponente wirkte limitierend. Im Durchschnitt lag $c(NH_4^+)$ bei $268,7 \text{ mg L}^{-1}$, die Konzentrationen von Phosphat und Sulfat betragen $c(PO_4^{3-}) = 34,9 \text{ mg L}^{-1}$ und $c(SO_4^{2-}) = 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ nach 10,2 d bzw. $8,5 \text{ mg L}^{-1}$ und $2,1 \text{ mg L}^{-1}$ nach 20 d. Am Anfang des Prozessverlaufs war ein Anstieg des pH-Wertes von $pH = 7,50$ auf $pH = 7,92$ festzustellen. Ursache war der CO_2 -Verbrauch innerhalb der ersten 2,4 d, was zu einer Reduzierung des CO_2 -Anteils im Abgas von $\varphi_{CO_2} = 0,87 \%$ zu $\varphi_{CO_2} = 0,16 \%$ führte. Mit Beginn der ersten Nachtphase stieg aufgrund der respiratorischen Aktivität der Zellen der CO_2 -Anteil jedoch wieder an und zwar so stark, dass eine Laugenzugabe erforderlich wurde, wie die Schwankungen im pH-Signal schließen lassen. Bis zu Versuchsende verblieb das pH-Signal dank des PI-Reglers auf einem konstanten Niveau von $pH = 7,5 \pm 0,05$ mit Ausnahme größerer Schwankungen beim Medienwechsel nach 10,2 d. Der Sauerstoffgehalt in der Abluft zeigte während den Tagphasen einen parabolischen Verlauf, welcher mit der Photonenflussdichte korrelierte. Das Maximum von $\varphi_{O_2} = 22,43 \%$ wurde nach 4,4 d erreicht. In der Nachtphase sank der Sauerstoffgehalt auf durchschnittlich $\varphi_{O_2} = 20,3 \%$. Ebenso korrelierte \dot{F}_{CO_2} mit dem parabolischen Verlauf der Photonenflussdichte zwischen einem Grundfluss von $\dot{F}_{CO_2} = 0,95 \text{ mL min}^{-1}$ und einem Maximum von \dot{F}_{CO_2}

= 3,68 mL min⁻¹. Die oben erwähnte Anpassung des PI-Reglers sorgte für den erwünschten Effekt und verhinderte eine unnötige Erhöhung des CO₂-Flusses während der Nachtphase. Der CO₂-Gehalt im Abgas wies aufgrund des zugeführten CO₂-Flusses breite Peaks auf. Allerdings war auch hier ein Trend zu erkennen: in der Tagphase sank φ_{CO_2} mit steigender Photonenflussdichte aufgrund der Photosyntheseleistung, in der Nachtphase stieg φ_{CO_2} wegen der Zellatmung an. Dabei wurden minimale bzw. maximale Werte für φ_{CO_2} von 0,49 % bzw. 1,41 %, mit Ausnahme des Medienwechsels nach 10,2 d, gemessen.

4.4.3 Repetitiver Tag-Nacht-Chargenprozess im Pilotmaßstab

Um die Übertragbarkeit der in Kapitel 4.4.2 angewandten Prozessstrategie des repetitiven Chargenprozesses („repeated batch“) auf ein reales Umfeld zu übertragen, wurde eine Freilandkultivierung an der Karlsruhe ALgae Factory (KALF, 49. Breitengrad) durchgeführt. Als Photobioreaktor wurde der Freiland-Plattenreaktor, vgl. Kapitel 3.1.8, mit einem Arbeitsvolumen von 230 L eingesetzt. Kultivierungszeitraum war zwischen dem 06. Juli 2016 bis zum 10. August 2016. Die maximale Tagesintensität der gesamten Photonenflussdichte im PAR-Bereich PAR_{ges} betrug 2498,55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ während des Zenitstands der Sonne. Gemittelt über den gesamten Kultivierungszeitraum von 36 d betrug die Photonenflussdichte 474,94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Der diffuse Anteil beträgt dabei maximal 1218,53 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und im Mittel 211,51 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Weiterhin wurden folgende Prozessbedingungen verwendet: $T_{\text{R}} = 11 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $T_{\text{R}} = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH = 7,5, $p_{\text{CO}_2} = 1 \text{ kPa}$ bis $p_{\text{CO}_2} = 5 \text{ kPa}$, Begasungsrate 2 L min⁻¹ (0,054 vvm), 2,5fach TP-Medium (Kapitel 3.1.2). Nach Einstellung der CO₂-Sättigung wurde eine 2,5 %ige Ammoniak-Lösung (v/v) als pH-Stellmittel zur Vermeidung einer Stickstofflimitierung verwendet. Abbildung 4.23 stellt die Ergebnisse der Prozessführung dar. Mit Ausnahme von Tag 28 und 30 erreichte die Lichtintensität für PAR_{ges} tagsüber mindestens 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nach einer lag-Phase von 7 Tagen stieg c_{X} linear mit einer Produktivität von $P_{\text{X}} = 0,238 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ auf $c_{\text{X}} = 2,81 \text{ g L}^{-1}$. Anschließend sank sie durch die Wiederholung des Chargenprozesses, nach 20,9 d, auf $c_{\text{X}} = 1 \text{ g L}^{-1}$. Danach stieg c_{X} linear an und erreichte zu Prozessende bzw. nach 36 d einen Wert von $c_{\text{X}} = 3,14 \text{ g L}^{-1}$. Die Produktivität im zweiten Chargenprozess betrug $P_{\text{X}} = 0,151 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Im Laufe des ersten Chargenprozesses stieg der Proteinanteil von $q_{\text{p}} = 0,20 \text{ g g}^{-1}$ auf $q_{\text{p}} = 0,61 \pm 0,04 \text{ g g}^{-1}$ und blieb für die restliche Prozesszeit stabil. Der Kohlenhydratanteil q_{kh} verhielt sich gegenläufig und sank von 35 % auf $16 \pm 2 \text{ } \%$. Die Ammoniumkonzentration blieb aufgrund der pH-Stellmittelzugabe auf einem gleichen Niveau und schwankte zwischen $c(\text{NH}_4^+) = 216,6 \text{ mg L}^{-1}$ und $c(\text{NH}_4^+) = 314,4 \text{ mg L}^{-1}$. Der Volumenstrom an zugeführtem CO₂ schwankte zwischen einem Grundfluss von $\dot{V}_{\text{CO}_2} = 0,10 \text{ L min}^{-1}$ bis maximal $\dot{V}_{\text{CO}_2} = 0,36 \text{ L min}^{-1}$ während des Kultivierungszeitraums und verhielt sich dabei analog zu dem parabelförmigen Verlauf von PAR_{ges} bzw. PAR_{diff} . Der pH-Wert lag im Durchschnitt bei pH = 7,41 mit Minima von pH = 6,79 bzw. Maxima von pH = 7,80.

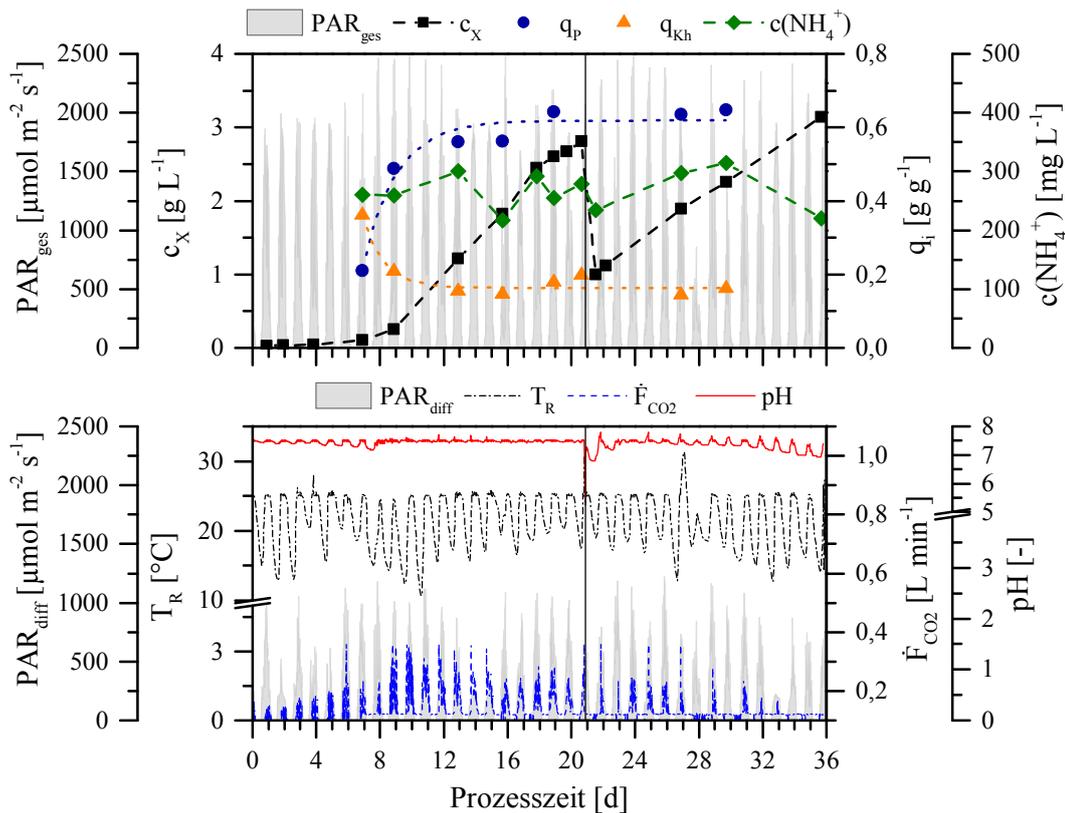


Abbildung 4.23: Freilandkultivierung eines repetitiven Tag-Nacht-Chargenprozesses im Freiland-Plattenreaktor mit der Tagesintensität der gesamten Photonenflussdichte PAR_{ges} , der Biotrockenmassekonzentration c_X , den Zellquota für Proteine q_p und Kohlenhydrate q_{kh} , der Ammoniumkonzentration $c(NH_4^+)$ (oben) sowie dem Anteil an diffuser Photonenflussdichte PAR_{diff} , der Reaktortemperatur T_R , dem pH-Wert und dem Volumenstrom an zugeführtem CO_2 \dot{V}_{CO_2} (unten). Die schwarze vertikale Linie bei 20,9 d markiert den Zeitpunkt des Erntens und Wiederauffüllens mit frischem Medium.

Vor allem während den Nachtphasen in der zweiten Chargenprozess-Phase nach 20,9 d reichte die pH-Stellmittelzugabe nicht aus, um die respiratorische Aktivität der Zellen und somit eine pH-Erniedrigung zu kompensieren. Da der Freiland-Plattenreaktor nur über ein Kühlsystem jedoch nicht über ein Heizelement verfügte, unterlag der Temperaturverlauf den umweltbedingten Schwankungen. Im Mittel betrug die Temperatur $T_R = 21,4$ °C und fiel in den Nachtphasen kaum unter $T_R = 15,0$ °C. Der Minimalwert betrug $10,7$ °C und der Maximalwert $25,0$ °C; der Prozesstag nach 27 d wurde wegen eines Kühlwasserausfalls nicht berücksichtigt. Trotz der prozessbedingten Schwankungen konnte der repetitive Chargenprozess im Tag-Nacht-Zyklus erfolgreich vom Labormaßstab in den Pilotmaßstab übertragen werden. Die Zellquota für Proteine und Kohlenhydrate stellten sich auf annähernd identische Werte ein mit $q_p = 0,61 \pm 0,04$ g g⁻¹ und $q_{kh} = 0,16 \pm 0,02$ g g⁻¹. Im Vergleich dazu betrugen die gemittelten Werte aus Kapitel 4.4.2 für $q_p = 0,63$ g g⁻¹ und $q_{kh} = 0,22$ g g⁻¹. Die Biomasseproduktivität hat sich im Freiland-Plattenreaktor gegenüber dem Rührkesselreaktor jedoch um den Faktor 1,6 für die erste Chargenprozess-Phase und um Faktor 2,0 für die zweite Chargenprozess-Phase verringert.

Nach Versuchsende wurde eine Sammelprobe auf die Aminosäure- und Fettsäureanteile sowie die Anteile der Elemente Stickstoff, Phosphor, Schwefel, Magnesium und Eisen an der Biotrockenmasse analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.11 aufgelistet. Beim Vergleich der Aminosäureanteile von der

ERGEBNISSE

Freilandkultivierung mit den Daten aus der Kultivierung im Maxi-Plattenreaktor, siehe Tabelle 4.9, stimmen die Werte im Durchschnitt zu 90,5 % mit dem lichtgesättigten Betriebspunkt und zu 91,8 % mit dem lichtlimitierten Betriebspunkt überein. Die größte Abweichung tritt bei Glx auf, also den Aminosäuren Glutamin oder Glutaminsäure. Der Glx-Anteil weicht um $10,5 \text{ mg g}^{-1}$ von dem lichtgesättigten und um $16,5 \text{ mg g}^{-1}$ von dem lichtlimitierten Betriebspunkt ab. Beim Vergleich der Fettsäureanteile mit den in Tabelle 4.1 und Tabelle 4.10 angegebenen Anteilen aus den Kultivierungen im Rührkesselreaktor und Maxi-Plattenreaktor fällt auf, dass die unbekannte Fettsäure Cn:i sowie die Stearinsäure (C18:0) fehlen. Dies ist eine mögliche Erklärung des niedrigeren Anteils von insgesamt 6,07 % Fettsäuren im Freiland-Plattenreaktor. Abgesehen davon stimmt das Fettsäureprofil sehr gut mit dem eines stickstoffreichen oder lichtlimitierten Wachstums überein, vgl. Tabelle 4.1 und Tabelle 4.10. Der Anteil ungesättigter Fettsäuren betrug 76,7 %. Eine Elementaranalyse ergab prozentuale Anteile für Stickstoff von $e_{N,X} = 9,47 \%$, Phosphor von $e_{\text{Phosphor},X} = 0,89 \%$, Schwefel von $e_{\text{Schwefel},X} = 0,62 \%$, Magnesium von $e_{Mg} = 0,26 \%$ und Eisen von $e_{Fe} = 0,02 \%$ für *Chlorella vulgaris* unter den verwendeten Prozessbedingungen.

Tabelle 4.11: Aminosäureprofil, Fettsäureprofil und elementare Zusammensetzung von *Chlorella vulgaris* aus der Freilandkultivierung im Pilotmaßstab; *essentielle Aminosäure; **Gew.-% bezogen auf die Biotrockenmasse.

Aminosäure	q_i [mg g ⁻¹]	Aminosäure	q_i [mg g ⁻¹]	Fettsäure	q_i [g g ⁻¹]	Element	e_i [%]**
Ala	47,6	Lys*	27,8	C14:1	0,0023	N	9,4760
Arg	31,3	Met*	12,0	C16:0	0,0141	P	0,8896
Asx	49,7	Phe*	28,4	C16:1	0,0005	S	0,6177
Cys	5,0	Pro	27,2	C18:1	0,0045	Mg	0,2567
Glx	56,4	Ser	26,4	C18:2	0,0116	Fe	0,0187
Gly	31,6	Thr*	24,9	C18:3	0,0276		
His	14,3	Trp*	12,7				
Ile*	16,8	Tyr	18,6				
Leu*	48,1	Val*	26,9				

5 DISKUSSION

5.1 Wachstum photoautotropher Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte und der Substratverfügbarkeit

Mit Hilfe mikrobieller Wachstumskinetiken lässt sich das globale Zellwachstum in Abhängigkeit von einer Einflussgröße äußerst gut beschreiben. Bereits seit über 100 Jahren beschäftigt sich die Wissenschaft mit der Erstellung mathematischer Modelle zur Prognostizierung der komplexen dynamischen Verhaltensweise mikrobieller Systeme [76]. Kinetische Modelle haben das allgemeine Verständnis über wachstumslimitierende Faktoren wesentlich beeinflusst [78,87]. Ergänzende Analysen zur Ermittlung der Zellzusammensetzung erweitern überdies die wissenschaftliche Aussagekraft. Die ermittelten Wachstumskinetiken aus Kapitel 4.1 verdeutlichen, welche Photonenflussdichten und Nährstoffkomponenten eine maximale Wachstumsrate induzieren und welche Veränderungen im Protein-, Kohlenhydrat-, Lipid-, sowie Pigmentgehalt damit einhergehen.

5.1.1 Abhängigkeit von der Photonenflussdichte

Unter den Faktoren, welche die Wachstumsrate photoautotropher Mikroorganismen beeinflussen, zählt die Verfügbarkeit von Licht bzw. Photonen zu dem Haupteinflussfaktor. Die große Problematik bei der Untersuchung der Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit photoautotropher Mikroorganismen von der Lichtverfügbarkeit stellt, wie zuvor in Kapitel 4.2.1 erwähnt, die Lichteindringtiefe bzw. die Lichtabschwächung über den Reaktorquerschnitt dar. In der praxisnahen Photobiotechnologie wird mit globalen Größen wie der auf die Reaktoroberfläche auftreffende Photonenfluss PFD_0 und einer globalen Wachstumsrate μ gerechnet, siehe auch Abbildung 4.2. Streng genommen müssten jedoch abhängig von der jeweiligen Lichteindringtiefe lokale Wachstumsraten berechnet werden, wie beispielsweise von Janssen [89] dargelegt. Die Verwendung einer spezifischen Photonenflussdichte PFD_{spez} , vgl. Abbildung 4.4, ist ein erster und praxisnaher Schritt um, sich einer lokalen und physiologischen Ebene zu nähern, obwohl sich die in Kapitel 4.1.1 erwähnten Schwierigkeiten aufgrund der geringen Biomassekonzentrationen im Turbidostaten, bzw. im Chargenprozess vor Eintritt einer Lichtlimitierung, ergeben. Lokale Wachstumsraten können bislang nur mittels theoretischer Betrachtungen simuliert werden [89]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die spezifische Wachstumsrate von *Chlorella vulgaris* sowohl in Abhängigkeit von PFD_0 (Abbildung 4.2) als auch von PFD_{spez} (Abbildung 4.4) ermittelt. Ferner wurde die spezifische Wachstumsrate von *Synechocystis* sp. PCC6803 in Abhängigkeit von PFD_0 (Abbildung 4.5) untersucht.

In Abhängigkeit von der Photonenflussdichte können sich die Zellen in einem lichtlimitierten, lichtgesättigten oder lichtinhibierten Wachstumszustand befinden oder, mit den Worten von Blackman [76], in

einem minimalen, optimalen und maximalen Zustand. Hier wurde bei *Chlorella vulgaris* der lichtlimitierte Zustand zwischen dem Kompensationspunkt $I_c = 4,9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$, an welchem der Energiebedarf zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels dem Energieangebot aus der photosynthetischen Aktivität entspricht, und $I_k = 135 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ erreicht, vgl. Abbildung 4.4. Zijffers et al. [132] ermittelten für den photoautotroph kultivierten Stamm *Chlorella sorokiniana* einen Kompensationspunkt in der gleichen Größenordnung mit $I_c = 1,9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$.

I_k definiert den Übergang von lichtlimitiertem zu lichtgesättigtem Wachstum, verursacht durch eine limitierende enzymatische Reaktion im Calvin-Zyklus. Die Kapazität der Photonenaufnahme übersteigt die biochemische Kapazität der Kohlenstofffixierung. Der Calvin-Zyklus als lichtunabhängige Reaktion ist nicht mehr in der Lage, die von der Photosynthese generierten NADPH und ATP Moleküle in Form von NADP^+ und ADP mit gleicher Geschwindigkeit zu verbrauchen [133]. Aus diesem Grund verbleibt die Wachstumsrate auch für höhere Photonendichten als I_k bei $\mu_{\text{max}} = 2,46 \text{ d}^{-1}$, vgl. Abbildung 4.4. Überschüssige Energie wird von den Antennenkomplexen in Form von Wärme oder Fluoreszenz emittiert, ein als nicht-photochemisches Quenching bezeichneter Mechanismus [4,26,134,135].

Steigt die Photonendichte jedoch über $I_h = 475 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$, wird der lichtinhibierte Wachstumszustand erreicht und μ nimmt aufgrund der eintretenden Photooxidation, einer Schädigung des Photosyntheseapparats verursacht durch die hohe Strahlungsintensität, ab [4]. Inhibierende Photonendichten sind in der Literatur nur vereinzelt zu finden. Für den Stamm *Chlamydomonas reinhardtii* wurde I_h bei $\text{PFD}_0 = 1700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [136], für *Dunaliella tertiolecta* ab $\text{PFD}_0 = 1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [137] angegeben. Degen et al. [138] ermittelten für μ_{max} in einem Airlift-Plattenreaktor für *Chlorella vulgaris* einen Wert von $\mu_{\text{max}} = 1,92 \text{ d}^{-1}$, welcher bei $\text{PFD}_0 = 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erreicht wurde. Steinbusch [72] erzielte für den gleichen Stamm in Midi-Plattenreaktoren einen Maximalwert von $\mu_{\text{max}} = 2,40 \text{ d}^{-1}$ bei $\text{PFD}_0 = 300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Verglichen mit der Wachstumskinetik aus Abbildung 4.2 stimmen die Ergebnisse gut überein. Auch hier wurde μ_{max} bei $\text{PFD}_0 = 300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestimmt, μ_{max} nimmt aufgrund des homogenen Lichtfelds im Turbidostaten höhere Werte an ($\mu_{\text{max}} = 2,46 \text{ d}^{-1}$).

Neben der Wachstumsrate wurden für *Chlorella vulgaris* die Zellquota für Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Pigmente ermittelt (Abbildung 4.2). Sowohl der Proteingehalt als auch der Pigmentgehalt nehmen mit steigender Photonendichte ab, was auf eine zusammenhängende Synthese beider Zellbestandteile schließen lässt. Für $\text{PFD}_0 \leq 130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beträgt das quantitative Verhältnis von Chlorophyll a zu Gesamtprotein durchschnittlich $q_{\text{Chl.a,P}} = 60,1 \text{ mg g}^{-1}$, ab $\text{PFD}_0 = 196 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sinkt es auf durchschnittlich $q_{\text{Chl.a,P}} = 41,8 \text{ mg g}^{-1}$. Der höhere Proteinanteil bei niedrigen Photonendichten wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch eine vermehrte Bildung von Proteinen der Lichtsammelkomplexe hervorgerufen. Bei geringer Beleuchtungsstärke werden diese gebildet, um möglichst viele Photonen zu absorbieren [139]. Im Gegenzug werden sie bei hohen Lichtintensitäten reduziert um einen

Überschuss an Lichtsammelkomplexen sowie Schädigungen dieser zu vermeiden [140]. Da Pigmente wie Chlorophyll a vor allem in den Lichtsammelkomplexen der Photosysteme vorkommen, wirkt sich die Photonenflussdichte somit direkt auf $q_{\text{Chl.a}}$ bzw. q_{P} aus. Die Abnahme des quantitativen Verhältnisses von Chlorophyll a zu Proteinen sowie die Reduktion der Zellquota q_{P} und $q_{\text{Chl.a}}$ bei steigender PFD_0 bestätigen dies, siehe Abbildung 4.2. Nach Jordan et al. [116] besitzt ein Photosystem I Monomer, inklusive Lichtsammelkomplexe, 96 Chlorophyll a und b Moleküle sowie 22 Carotinoid Moleküle. Guskov et al. [117] geben für ein Photosystem II Monomer, inklusive Lichtsammelkomplexe, stöchiometrische Angaben von 35 Chlorophyll a und b Moleküle sowie 12 Carotinoid Moleküle an.

Die Zellquota $q_{\text{Chl.b}}$ und $q_{\text{Car.}}$ zeigen dieselbe Tendenz wie $q_{\text{Chl.a}}$. Laut Literatur werden Carotinoide unter anderem zum Schutz der Zelle gegen hohe Lichtintensitäten gebildet [44]. Die Carotinoid-Zellquota $q_{\text{Car.}}$ nimmt ab, dies bedeutet, dass unter den verwendeten Versuchsbedingungen bei *Chlorella vulgaris* kein schädigender Effekt auftrat. Aus Abbildung 4.4 geht hervor, dass sich die Zellen unter den Versuchsbedingungen aus Kapitel 4.1.1 im Stadium der Lichtsättigung befanden, ein Anstieg der Carotinoide ist somit erst bei höheren PFD_0 zu erwarten. Die Veränderung des Pigmentgehalts in Abhängigkeit der Lichtintensität ist ein Effekt, welcher in der Literatur als Licht- oder Photoakklimation bezeichnet wird [141,142]. Neben der oben erwähnten Schutzfunktion tragen Carotinoide außerdem dazu bei, Photonen, z.B. im blauen Anteil des Lichts, zu absorbieren und ergänzen somit das Absorptionsspektrum der Zelle [143].

Im Gegensatz zur Pigmentbildung ist die Zellquota für Kohlenhydrate q_{Kh} unabhängig von der Photonenflussdichte. Der Lipidanteil q_{L} hingegen steigt mit höherer PFD_0 an und bleibt für $\text{PFD}_0 \geq 260 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nahezu unverändert, vgl. Abbildung 4.2. Eine steigende Lipidakkumulation mit Eintritt einer Sättigung bei zunehmenden PFD_{spez} wurde ebenfalls von Dillschneider et al. [119] bei *Phaeodactylum tricornerutum* beobachtet. Abbildung 4.3 zeigt weiterhin die spezifische Aufnahmerate von CO_2 in Abhängigkeit von der eingestellten Photonenflussdichte; r_{CO_2} steigt mit zunehmender PFD_0 an und nähert sich einer Sättigung mit durchschnittlich $r_{\text{CO}_2} = 0,25 \text{ h}^{-1}$ für $\text{PFD}_0 \geq 260 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Zelle nähert sich der maximalen Verarbeitungskapazität von Photonen, wie an dem rückläufigen Pigmentanteil ersichtlich wird. Die CO_2 -Fixierung mit Hilfe des Enzyms RuBisCO wirkt zusehends limitierend bzw. geschwindigkeitsbestimmend [4,26,134,135]. Zusammengefasst ergibt sich aus den Daten des Turbidostaten, dass sich für *Chlorella vulgaris* mit steigender Verfügbarkeit von Photonen:

- (i) der Protein- und Pigmentanteil vermindert, möglicherweise aufgrund einer Reduzierung der Lichtsammelkomplexe der Photosysteme [141,142];
- (ii) der Lipidanteil gleichartig erhöht, möglicherweise aufgrund der gesteigerten CO_2 -Aufnahme (Abbildung 4.3) und dem stöchiometrischen Zwang, absorbierte Energie effizient zu nutzen und die Speicherstoffbildung der Bildung von Proteinmaterial vorzuziehen;

- (iii) der Kohlenhydratanteil nahezu unverändert bleibt, der fixierte Kohlenstoff also bevorzugt zur Fettsäureakkumulation verwendet wird.

Daraus resultiert, dass für eine optimale Prozessführung zur Erzielung einer maximalen Wachstumsrate eine Photonenflussdichte oberhalb von I_k , sprich $PFD_0 \geq 200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eingestellt werden sollte. Um den Proteingehalt zu maximieren sollten Photonenflussdichten unterhalb von I_k , sprich $PFD_0 \leq 200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, vorliegen.

Die Abhängigkeit der Wachstumsrate von dem auf die Reaktoroberfläche auftreffenden Photonenfluss für den Stamm *Synechocystis* sp. PCC6803 zeigt Abbildung 4.5. Die maximal erreichte Wachstumsrate lag bei $\mu_{\text{max}} = 1,32 \text{ d}^{-1}$ und stimmt überein mit der von Dauta et al. [144] ermittelten maximalen Wachstumsrate eines Stammes derselben Gattung, *Synechocystis minima*, bei $T_R = 32 \text{ }^\circ\text{C}$ und $PFD_0 = 125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Bland und Angenent [145] kultivierten *Synechocystis* sp. PCC6803 ebenfalls bei verschiedenen Photonenflussdichten und erzielten Wachstumsraten von $\mu_{\text{max}} = 1,2 \text{ d}^{-1}$ bis $\mu_{\text{max}} = 1,44 \text{ d}^{-1}$, wobei der Übergang von lichtlimitiertem zu lichtgesättigtem Wachstum bei $PFD_0 = 200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auftrat. Die Literaturdaten bestätigen die hier erzielte maximale Wachstumsrate für *Synechocystis* sp. PCC6803. Abweichende Prozessbedingungen wie beispielsweise die Kultivierungstemperatur können jedoch Unterschiede bei μ_{max} sowie I_k , also den Eintritt in den lichtgesättigten Wachstumszustand, hervorrufen [72,146]. Die charakteristischen Bereiche des lichtlimitierten und lichtgesättigten Wachstums werden für den Cyanobakterienstamm in Abbildung 4.5 ersichtlich. Auch hier wirken die enzymatische Reaktionen des Calvin-Zyklus limitierend; μ beginnt für $PFD_0 \geq 46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zu stagnieren. Nicht-photochemisches Quenching sorgt ebenfalls für die Abgabe überschüssiger Energie in Form von Wärme [147]. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die aufgenommenen Wachstumskinetiken mit den Verläufen anderer Spezies weitgehend übereinstimmen. Abweichungen in den Verläufen sind durch speziesspezifische Optima oder unterschiedliche Kultivierungsbedingungen erklärbar. Beispielsweise gibt Dauta et al. [144] für den Stamm *Chlorella vulgaris* ein μ_{max} von $1,30 \text{ d}^{-1}$ an, im Vergleich zu dem erreichten Maximum dieser Arbeit ein deutlich niedrigerer Wert. Die Abweichungen lassen sich auf inhomogene Lichtverteilung oder einer unzureichenden CO_2 -Versorgung bei der von Dauta et al. [144] vorgenommenen Kultivierung in Schüttelkolben im Vergleich zu einer Kultivierung im Plattenreaktor oder einem kontinuierlich betriebenen Turbidostaten zurückführen.

5.1.2 Abhängigkeit von der Kohlenstoffdioxid-Verfügbarkeit

Neben der Photonenflussdichte ist die Verfügbarkeit von Kohlenstoffdioxid als alleinige Kohlenstoffquelle für photoautotroph kultivierte Organismen ebenfalls ein Haupteinflussfaktor. CO_2 ist notwendig, um neue Biomasse zu bilden. In dieser Arbeit wurde eine maximale Wachstumsrate von $\mu_{\text{max}} = 2,16 \text{ d}^{-1}$ für CO_2 -Partialdrücke über $p_{\text{CO}_2} = 0,5 \text{ kPa}$, bzw. einem CO_2 -Anteil des eintretenden Luftstroms von $0,5 \text{ } \%$ (v/v), ermittelt, vgl. Kapitel 4.1.1. Somit reicht bereits ein geringer Kohlenstoffdioxidgehalt aus,

um maximales Wachstum zu gewährleisten. Dillschneider [148] beschrieb für *Chlorella vulgaris*, dass ebenfalls ein CO₂-Partialdruck von p_{CO₂} = 0,5 kPa zum Erreichen der maximalen Wachstumsrate genügt, auch wenn μ_{\max} aufgrund des Chargenprozesses mit $\mu_{\max} = 1,35 \text{ d}^{-1}$ niedriger ausfiel. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel diskutiert, sind kinetische Parameter von dem verwendeten Kultivierungssystem und den Prozessbedingungen abhängig. Novak und Brune [149] erreichten im Chargenprozess für *Chlorella* sp. beispielsweise eine maximale Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 1,68 \text{ d}^{-1}$. Nach Lívanský et al. [150] benötigt die Mikroalge *Chlorella* einen minimalen CO₂-Partialdruck von p_{CO₂} = 0,1 kPa in der Flüssigphase für eine ausreichende CO₂-Versorgung. Wie Abbildung 4.2 zeigt, erreicht *Chlorella vulgaris* hier eine Wachstumsrate von $\mu = 1,72 \text{ d}^{-1}$. Auf Grundlage der experimentellen Daten dieser Arbeit wäre ein minimaler Partialdruck von 0,2 kPa CO₂ geeigneter, da hier eine Wachstumsrate von $\mu = 1,92 \text{ d}^{-1}$ erreicht wird. Hohe CO₂-Partialdrücke von p_{CO₂} $\geq 5 \text{ kPa}$ können sich negativ auf die Wachstumsgeschwindigkeit auswirken [148,151]. Aus Abbildung 4.2 wird deutlich, dass bei *Chlorella vulgaris* nur leicht verminderte Wachstumsraten von $\mu = 1,95 \text{ d}^{-1}$ bzw. $\mu = 2,00 \text{ d}^{-1}$ bei Partialdrücken von p_{CO₂} = 3,9 kPa bzw. p_{CO₂} = 4,7 kPa auftreten.

Die Zellzusammensetzung zeigte sich robust gegenüber variierender CO₂-Verfügbarkeit. Niedrige Partialdrücke von p_{CO₂} $\leq 1,68 \text{ kPa}$ haben einen leichten Anstieg des Proteingehalts von durchschnittlich 43,7 % auf 50,4 % zur Folge, der Lipidanteil verhält sich gegenläufig. Vermutlich wirken sich höhere CO₂-Partialdrücke negativ auf die RuBisCO-Synthese aus, da weniger Enzyme benötigt werden, um die gleiche Menge CO₂ zu fixieren. Als Resultat sinkt der Gesamtproteingehalt. Gleichzeitig werden bei geringen CO₂-Partialdrücken mehr RuBisCO-Enzyme benötigt und der Gesamtproteingehalt steigt [44]. Raven [152] näherte einen Massenanteil von RuBisCo zwischen 2 - 23 % pro Gesamtprotein in Phytoplankton in Abhängigkeit der CO₂-Verfügbarkeit an, wobei die meisten Werte zwischen 4 - 10 % liegen. Losh et al. [153] wiesen einen Anteil von 2 - 6 % RuBisCo am Gesamtproteingehalt in acht verschiedenen Mikroalgenspezies mittels Western Blot nach. Der in Abbildung 4.2 ersichtliche Anstieg des Proteingehalts um 6,7 % ist somit plausibel. Die Pigmente steigen für p_{CO₂} $\leq 1,68 \text{ kPa}$ leicht an; am Beispiel der durchschnittlichen Zellquota für Chlorophyll a von q_{Chl.a} = 16,0 mg g⁻¹ auf q_{Chl.a} = 19,3 mg g⁻¹. Das quantitative Verhältnis von Chlorophyll a zu Gesamtprotein beträgt insgesamt q_{Chl.a,P} = 37,8 mg g⁻¹. Der Kohlenhydratanteil zeigte hingegen keine signifikante Änderung bei variierender CO₂-Verfügbarkeit.

Die Ergebnisse zeigen, dass CO₂-Partialdrücke von 0,5 - 1 kPa bei einer Biotrockenmassekonzentration von 0,3 g L⁻¹ ausreichen, um *Chlorella vulgaris* mit genügend Kohlenstoff zu versorgen und eine hohe Wachstumsrate sowie einen hohen Proteinanteil von q_P = 0,50 g g⁻¹ zu gewährleisten, sofern keine weitere Substratlimitierung auftritt.

5.1.3 Abhängigkeit von der Stickstoff-Verfügbarkeit

Die Verfügbarkeit von Stickstoff, bzw. der entsprechenden Medienkomponente Ammonium, besitzt unter den untersuchten Faktoren den stärksten Einfluss auf die Zellzusammensetzung von *Chlorella vulgaris*. Stickstoff ist in viele biochemische Vorgänge involviert wie die Synthese von Aminosäuren oder Nucleinsäuren [154] und gehört in natürlichen Gewässern oft zu den limitierenden Elementen [155]. Die in Abbildung 4.2 gezeigte Wachstumskinetik lässt sich in einen substratlimitierten und substratgesättigten Bereich unterteilen. Der Übergang beider Wachstumszustände findet bei $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 20 \text{ mg L}^{-1}$ statt. Im gesättigten Zustand betrug $\mu_{\text{max}} = 2,14 \text{ d}^{-1}$. Durch lineare Approximation der Datenpunkte im substratlimitierten Bereich lässt sich ferner eine minimale Ammoniumkonzentration von $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 8,4 \text{ mg L}^{-1}$ bestimmen, unterhalb derer kein weiteres Wachstum stattfindet. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass bei Änderungen der Versuchsbedingungen des Turbidostat-Prozesses, wie zum Beispiel eine niedrigere Einstellung der Biotrockenmassekonzentration, das Zellwachstum unterhalb dieser Ammoniumkonzentrationen noch möglich ist.

Wachstumskinetiken und die zugehörigen Modellparameter in Abhängigkeit von Medienkomponenten sind in der Literatur nur vereinzelt auffindbar. Besonders Turbidostat-Prozesse sind trotz ihres Vorteils, ein homogenes Lichtfeld auszubilden, selten beschrieben. Marchetti et al. [156] kultivierten die Mikroalge *Isochrysis affinis galbana* in einem Turbidostaten und untersuchten unter anderem das optimale Stickstoff zu Phosphor Verhältnis, geben jedoch keine Substratkonzentrationen an. Aslan und Kapdan [157] analysierten kinetische Parameter für *Chlorella vulgaris* in Chargenprozessen als Funktion der Startkonzentration von Stickstoff und Phosphor. Stickstoff- bzw. Phosphorkonzentration unterhalb von $31,5 \text{ mg L}^{-1}$ bzw. $10,5 \text{ mg L}^{-1}$ zeigten dabei einen negativen Effekt auf das Zellwachstum. Die Daten aus Abbildung 4.2 ergeben, dass $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}}$ beim Übergang in das substratlimitierte Wachstum in der gleichen Größenordnung liegt.

Die Zellquota für Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Pigmente zeigten für die Ammoniumkonzentration $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} \geq 31,5 \text{ mg L}^{-1}$ nahezu keine Veränderung. Für $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} \leq 31,5 \text{ mg L}^{-1}$ sank q_p jedoch stark, gleichzeitig stiegen q_{Kh} und vor allem q_L an. Diese Beobachtung deckt sich mit Angaben aus der Literatur [33]. Da Stickstoff ein essentieller Bestandteil der Aminosäuren darstellt, steht bei erhöhter Ammoniumkonzentration im Zulauf mehr Stickstoff für den Aufbau von Proteinen zur Verfügung. Unter Stickstofflimitierung werden hingegen Speicherstoffe akkumuliert, welche kein Stickstoff binden, wie z.B. Lipide und Kohlenhydrate [158,159]. Der Verlauf des Pigmentanteils entsprach dem des Proteinanteils. Unterhalb einer Ammoniumkonzentration von $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 31,5 \text{ mg L}^{-1}$ sanken $q_{\text{Chl.a}}$, $q_{\text{Chl.b}}$ und q_{Car} . Das quantitative Verhältnis von Chlorophyll a zu Gesamtprotein betrug $q_{\text{Chl.a,P}} = 45,3 \text{ mg g}^{-1}$ für $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} \geq 31,5 \text{ mg L}^{-1}$ und sank für niedrigere Substratkonzentrationen auf einen Minimalwert

von $q_{\text{Chl.a,p}} = 3,59 \text{ mg g}^{-1}$. Wie bereits in Kapitel 5.1.1 erläutert, korreliert q_p mit $q_{\text{Chl.a}}$ aufgrund der Bildung der Lichtsammelkomplexe der Photosysteme, welche die Pigmente im Proteingerüst binden. Becker [7] gibt für *Chlorella vulgaris* eine Zellzusammensetzung von $q_p = 0,51$ bis $0,58 \text{ g g}^{-1}$, $q_{\text{Kh}} = 0,12$ bis $0,17 \text{ g g}^{-1}$ und $q_L = 0,14$ bis $0,22 \text{ g g}^{-1}$ an. Safi et al. [43] kommt für denselben Stamm auf $q_p = 0,42$ bis $0,58 \text{ g g}^{-1}$, $q_{\text{Kh}} = 0,12$ bis $0,55 \text{ g g}^{-1}$ und $q_L = 0,14$ bis $0,22 \text{ g g}^{-1}$. Basierend auf den Daten der Wachstumskinetik in Abbildung 4.2, wurde eine Spanne von $q_p = 0,30$ bis $0,48 \text{ g g}^{-1}$, $q_{\text{Kh}} = 0,18$ bis $0,30 \text{ g g}^{-1}$ und $q_L = 0,05$ bis $0,40 \text{ g g}^{-1}$ ermittelt. Die experimentell ermittelten Werte liegen somit in der von Becker [7] und Safi et al. [43] angegebenen Größenordnung. Guccione et al. [33] untersuchten neun *Chlorella* Stämme in einem stickstoffreichen und stickstoffarmen Medium. Für *Chlorella vulgaris* erreichten sie im Vergleich zu den in Abbildung 4.2 angegebenen Daten eine gute Übereinstimmung mit $q_p = 0,44 \text{ g g}^{-1}$, $q_{\text{Kh}} = 0,27 \text{ g g}^{-1}$ und $q_L = 0,22 \text{ g g}^{-1}$ unter Stickstoffsättigung und $q_p = 0,25 \text{ g g}^{-1}$, $q_{\text{Kh}} = 0,24 \text{ g g}^{-1}$ und $q_L = 0,46 \text{ g g}^{-1}$ unter Stickstofflimitierung. Die Analyse des Fettsäureprofils, siehe Tabelle 4.1, bestätigt die Literaturangaben, nach denen unter günstigen bzw. nährstoffreichen Wachstumsbedingungen verstärkt mehrfachungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure (C18:2), Alpha-Linolensäure (C18:3) aber auch Hexadecatriensäure (C16:3) gebildet werden, wodurch die produzierte Biomasse geeignet für Ernährungszwecke ist. Im Gegensatz akkumulieren die Zellen unter ungünstigen Wachstumsbedingungen vermehrt gesättigte oder einfachungesättigte Fettsäuren, wodurch die produzierte Biomasse eher für die Biodieselherstellung interessant wird [43,124]. Für $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 31,5$ bis 126 mg L^{-1} machen die mehrfachungesättigten Fettsäuren, inklusive Cn:i, im Mittel $69,8 \pm 0,5 \%$ des Gesamtfettsäureanteils aus. Dieser Anteil sinkt mit abnehmender Stickstoffverfügbarkeit auf bis zu $40,7 \%$ bei $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 8,4 \text{ mg L}^{-1}$. Erneut zeigt sich die hohe Abhängigkeit der Zellzusammensetzung von den gewählten Prozessbedingungen wie zuvor in Kapitel 5.1.1 und 5.1.2 diskutiert. Alle gemessenen und recherchierten Zellzusammensetzungen von *Chlorella vulgaris* sind in Tabelle 4.7 bzw. Tabelle A7 aufgeführt.

Neben den Zellquota wurden in dem Turbidostat-Versuch zur Bestimmung der Wachstumskinetik in Abhängigkeit von der Stickstoffverfügbarkeit die Zellzahl und die spezifische CO_2 -Aufnahmerate ermittelt, siehe Abbildung 4.3. Die sinkende Zellzahl zwischen $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 8,4 - 31,5 \text{ mg L}^{-1}$ bei gleichzeitig gleichbleibender Biomassekonzentration bzw. Turbidität, ist ein Indiz für eine Gewichtszunahme einzelner Zellen mit zunehmender Stickstoffverfügbarkeit. Umgekehrt nehmen der Zelldurchmesser und das Zellgewicht mit abnehmender Stickstoffverfügbarkeit ab. Sánchez-Alvarez et al. [160] sowie Bisova und Zachleder [161] beschreiben, dass *Chlorella*-Spezies unter günstigen Wachstumsbedingungen wie reichlicher Nährstoff- und Lichtverfügbarkeit dazu tendieren, vorwiegend große Zellen auszubilden. Unter nährstoffarmen Bedingungen hingegen bilden sich vorzugsweise kleinere Zellen aus, da diese aufgrund ihres größeren Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen eine effizientere Aufnahme potentieller Nährstoffquellen garantieren [160,161]. Eine Veränderung des Zelldurchmessers wirkt sich ferner auf die Lichtstreuereigenschaften aus. Die veränderte Turbidität oder optische Dichte bei einer

Wellenlänge von 750 nm erfordert möglicherweise eine Neujustierung der PI-Regelparameter des Turbidostaten. Unter Betrachtung der CO₂-Aufnahmerate in Abhängigkeit von $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}}$ in Abbildung 4.3, fällt auf, dass diese analog zu der in Abbildung 4.2 dargestellten Wachstumsrate verläuft. Bis zu einer Ammoniumkonzentration von $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 31,5 \text{ mg L}^{-1}$ nimmt r_{CO_2} zu und endet dann in einer Sättigung von durchschnittlich $r_{\text{CO}_2} = 0,27 \text{ h}^{-1}$. Die zunehmende Verknappung der Stickstoffquelle treibt die Zellen an ihr stöchiometrisches Limit und behindert die Neusynthese von Proteinen, Pigmenten und Nukleinsäuren, vgl. q_p und $q_{\text{Chl.a}}$ in Abbildung 4.2. Pro Zelle stehen somit eine geringere Anzahl an Lichtsammelkomplexen und RuBisCO-Enzymen zur Verfügung, was sich negativ auf die Kohlenstofffixierung auswirkt, vgl. Kapitel 5.1.1.

Insgesamt bewirken niedrige Ammoniumkonzentrationen eine Reduktion der Proteinsynthese. Limitierende Ammoniumkonzentrationen können sogar zur Einstellung der Proteinsynthese führen (vgl. Abbildung 4.11 oder Abbildung 4.13). Stattdessen werden Speicherstoffe wie Kohlenhydrate oder Lipide akkumuliert. Sowohl der Verlauf der Zellquota, der Zellzahl als auch der spezifischen Wachstums- und CO₂-Aufnahmerate legen nahe, dass eine Ammoniumkonzentration unterhalb von $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 31,5 \text{ mg L}^{-1}$ im Zulauf bei einer Biotrockenmassekonzentration von $c_x = 0,3 \text{ g L}^{-1}$ bzw. unterhalb dem Verhältnis $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}}$ zu c_x von $0,105 \text{ g g}^{-1}$ nicht mehr ausreichend ist, um eine schnelles Zellwachstum mit hohem Proteinanteil zu gewährleisten. Stickstofflimitiertes oder nährstofflimitiertes Wachstum induziert ferner eine Reduzierung des Zelldurchmessers.

5.1.4 Abhängigkeit von der Phosphor-Verfügbarkeit

Ähnlich wie Stickstoff wird Phosphor für viele biochemische Vorgänge benötigt, wie zur Synthese von Phospholipiden oder Nukleinsäuren und ist Bestandteil der zellulären Energieträger ATP und NADPH [154]. Abbildung 4.5 zeigt die Abhängigkeit der Wachstumsrate von *Synechocystis* sp. BW86 von der zugeführten Phosphatkonzentration $c(\text{PO}_4^{3-})_{\text{Zulauf}}$. Die maximal erzielte Wachstumsrate von $\mu_{\text{max}} = 1,33 \text{ d}^{-1}$ stimmt gut mit den in Kapitel 5.1.1 angegebenen Literaturwerten und der experimentell ermittelten maximalen Wachstumsrate für *Synechocystis* sp. PCC6803 in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte überein. Weiterhin geht aus Abbildung 4.5 hervor, dass die Phosphatkonzentration bei einer vorherrschenden Biotrockenmassekonzentration $c_x = 0,15 \text{ g L}^{-1}$ mindestens $c(\text{PO}_4^{3-})_{\text{Zulauf}} = 1,33 \text{ mg L}^{-1}$ betragen muss, um das Zellwachstum aufrecht zu erhalten. Literaturstellen, welche den Einfluss von Phosphor auf die spezifische Wachstumsrate photoautotropher Mikroorganismen beschreiben, sind rar. Aslan und Kapdan [157] berichten von einem negativen Effekt auf das Wachstum von *Chlorella vulgaris* für Phosphormengen unterhalb $10,5 \text{ mg L}^{-1}$. Aus der Publikation von Grover [162] ergibt sich außerdem, dass bei elf verschiedenen Mikroalgenpezies die Wachstumsrate für Phosphorkonzentrationen kleiner $c(\text{Phosphor}) = 0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ bzw. $0,015 \text{ mg L}^{-1}$ sinkt. Allerdings fehlen in beiden Literaturstellen Angaben zur verwendeten Biotrockenmassekonzentration, was die

Vergleichbarkeit erschwert. Betrachtet man die beschriebenen Monod-Konstanten für Phosphat zwischen $k_M = 0,28 \text{ mg L}^{-1}$ von *Scenedesmus* sp. [163] und $k_M = 10,5 \text{ mg L}^{-1}$ von *Chlorella vulgaris* [157], so liegt der für den Cyanobakterienstamm *Synechocystis* sp. BW86 ermittelte Wert von $k_M = 1,87 \text{ mg L}^{-1}$, siehe Kapitel 4.1.2, innerhalb des angegebenen Bereichs.

Obwohl die Charakterisierung mikrobiellen Wachstums mit Hilfe der kinetischen Modelle nach Monod [78] oder Blackman [76] schon seit über 100 Jahren zur Methodik im Feld der Biotechnologie und Bioverfahrenstechnik gehört, fehlen vor allem im Bereich der Photobiotechnologie bis heute experimentelle Daten zur Beschreibung der Abhängigkeit der Wachstumsrate von substanzialen Medienkomponenten. Kontinuierlich betriebene Prozesse können helfen, diese Wissenslücke zu schließen [56,164].

5.2 Modellerstellung auf Zell- und Reaktorebene

Das in Kapitel 4.2 behandelte mathematische Modell zur Simulation der zellinternen Stoffwechselläufe in Form spezifischer Bildungsraten unter den im Reaktor vorherrschenden Bedingungen trägt dazu bei, Einflüsse einzelner Prozessgrößen auf das physiologische Verhalten zu identifizieren. Ziel war die Simulation des Wachstumsverhaltens und der Variation makromolekularer Zellbestandteile von *Chlorella vulgaris* unter photoautotrophen Bedingungen. Dabei zeigte der Parameter k_I aus Gleichung 4.21 und somit die Prozessgröße der durchschnittlichen Lichtintensität I_{av} den größten Einfluss auf das Simulationsergebnis, vgl. Kapitel 4.2.5. Die Ergebnisse aus der Modellierung untermauern somit die in Kapitel 5.1.1 diskutierte Herausforderung der Gewährleistung einer optimalen Lichtverteilung und Lichteindringtiefe in Photobioreaktoren. Um die Streuung der Photonen bei gegebener Schichtdicke zu berücksichtigen, wurde ein korrigierter Extinktionskoeffizient nach dem Modell von Suh et al. [64] verwendet, welches den Verlauf des gemessenen Extinktionskoeffizienten hinreichend gut beschreibt, siehe Abbildung 4.7. Jedoch wurde der Mechanismus der Photoakklimation - eine Anpassung des intrazellulären Pigmentgehalts aufgrund der vorherrschenden Lichtintensität - nicht berücksichtigt. In Anbetracht der Tatsache, dass eine Photoakklimation die Neusynthese von Pigmenten und somit Proteine der Lichtsammelkomplexe implizieren würde und eine Stickstofflimitierung bereits nach 4 d vorherrscht, vgl. Abbildung 4.11, ist dieser Mechanismus jedoch vernachlässigbar [12,139,140].

Die Energiebereitstellung in Form von ATP zur Aufrechterhaltung der anabolen sowie katabolen Stoffwechselwege, wurde durch die Implementierung des Prozesses der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien realisiert, vgl. Abbildung 4.8. In Anlehnung an die Zellmodelle von Baroukh et al. [37,41] wurde somit ein realitätsnahes metabolisches Netzwerk kreiert, welches neben der respiratorischen Aktivität die Bildung von Kohlenhydratäquivalenten, Grundbausteine aller Stoffwechselläufe

gänge, durch die photosynthetische Aktivität der Chloroplasten wiedergibt. Glukose wurde als Kohlenhydrat-Produkt der Photosynthese definiert. Dabei ist die Geschwindigkeit der Glukosebildung über eine CO_2 -Aufnahmerate in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte, siehe Abbildung 4.3, mit dem Block „Reaktor“ verknüpft. Eine Verbindung von Massenbilanz und Energiebilanz durch die direkte Kopplung der Lichtabsorption mit der Kohlenstofffixierung birgt gegenüber anderen Modellen einen Vorteil, da experimentelle Messdaten herangezogen werden können statt Umrechnungen literaturbezogener Ausbeutekoeffizienten zu verwenden [127]. Darüber hinaus wurde eine NH_4^+ -Aufnahmerate, basierend auf der Wachstumskinetik aus Kapitel 4.1.1, verwendet. Gleichung 4.21 und Gleichung 4.25 bilden somit die geschwindigkeitsbestimmenden Raten. Ein generelle Überlegenheit von Modellen welche das Wachstums- und Produktbildungsverhalten mit Hilfe von quantitativen Größen beschreiben ist, dass diese eine Ermittlung von unbekanntem Raten bei strategischer Formulierung der Bilanzgrenzen ermöglichen [126]. In einem dynamischen Modell ist die Simulation einer eintretenden Stickstofflimitierung möglich und somit die Präferenz der Zelle, Biomasse in Form von Speicherstoffen zu akkumulieren. Insgesamt werden 16 biomassespezifischen Raten berechnet, vgl. Abbildung 4.9, wodurch die Wachstumsphasen eines Chargenprozesses akkurat dargestellt werden. In anderen Modellen werden ausschließlich Zustände im Fließgleichgewicht simuliert, dynamisches Verhalten der Zellbestandteile wird dabei vernachlässigt [62,165,166]. Die in den Ausbeutekoeffizienten definierten stöchiometrischen Verhältnisse ermöglichen letztendlich die Umrechnung in volumetrische Größen, vgl. Kapitel 4.2.3. Auch wenn die elementare Zellzusammensetzung oder die Ausbeutekoeffizienten Schwankungen unterliegen können ([167], Tabelle A7), zeigen die Simulationsergebnisse und die niedrigen Parameterschätzfehler, dass die Annahme konstanter Ausbeutekoeffizienten bei der Modellbildung zielführend ist. Aus den Ergebnissen geht ebenfalls hervor, dass trotz der Unkenntnis expliziter intrazellulärer Regulationsmechanismen und der getroffenen Vereinfachungen eine erfolgreiche und realitätsgetreue Simulation möglich ist, vgl. Abbildung 4.11.

5.2.1 Startwertvariation, Parameterschätzung und Parameterschätzfehler

Für eine erfolgreiche Simulation ist die Wahl geeigneter Startwerte ausschlaggebend, da experimentelle Daten oft fehlerbehaftet sind [168,169]. Um den Fehler durch die Startwertvariation auf das Simulationsergebnis zu minimieren, wurden die Messpunkte von $c(\text{NH}_4^+)_0$ innerhalb der ersten 24 h des Prozesses gemittelt und als Ammonium-Startkonzentration vorgegeben, siehe Abbildung 4.11. Weiterhin wurde c_X erst mit Beginn der exponentiellen Wachstumsphase, bzw. nach einer Prozesszeit von 24 h, in dem Modell und der Parameterschätzung berücksichtigt. Dennoch wird die Startkonzentration mit der gleichen Streuung bzw. demselben relativen Fehler behaftet wie die restlichen Messdaten, vgl. Kapitel 3.3.7. Welchen Einfluss diese Streuung auf den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration ausübt, ist in Abbildung 5.1 zu sehen. Bereits gering variierende Startkonzentrationen der aktiven Biomasse $c_{XA,0}$, welche alleinig zur Bioakkumulation befähigt ist,

haben große Unterschiede der erzielten Biotrockenmassekonzentration c_X zur Folge. So kann ein gemessener Wert von $c_X = 0,099 \text{ g L}^{-1}$ nach einer Prozesszeit von 29,9 h unter Berücksichtigung eines relativen Messfehlers von 10 % am Ende der Simulationsverlaufs um einen Wert von $c_X = 5,807 \pm 0,436 \text{ g L}^{-1}$ variieren. Die Messwerte der Ammoniumkonzentration verursachen ebenfalls Abweichungen von $\pm 0,213 \text{ g L}^{-1}$ für c_X und $\pm 0,132 \text{ g L}^{-1}$ für c_P bei Simulationsende. In den meisten Modellen werden variable Startwerte der Parameter nicht berücksichtigt [168]. Die Einbeziehung von Messfehlern in Kombination mit einer Parameterschätzung gestattet jedoch die notwendigen Freiheiten zur realitätsnahen Simulation experimenteller Daten. Bei geeigneter Parameterkombination und unter Abwägung der Parameterschätzfehler ist es trotz allem möglich, eine genaue Schätzung unbekannter Parameter sowie genaue Simulationsverläufe zu gewährleisten, vgl. Kapitel 3.3.6 [102,122,123].

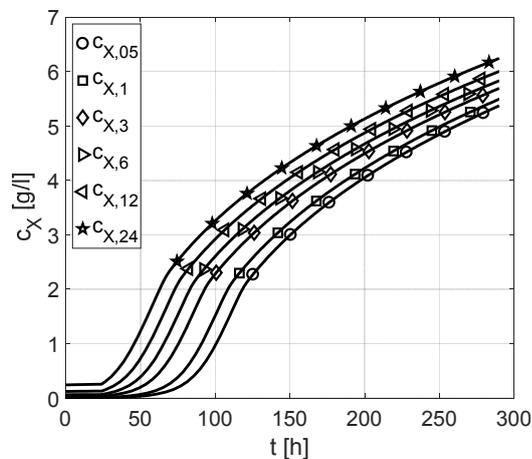


Abbildung 5.1: Biotrockenmassekonzentration c_X über der Prozesszeit t eines Chargenprozesses bei veränderten Startkonzentrationen aktiver Biomasse $c_{X,A,0}$ mit $c_{X,0,05} \rightarrow c_{X,A,0} = 0,005 \text{ g L}^{-1}$, $c_{X,0,1} \rightarrow c_{X,A,0} = 0,01 \text{ g L}^{-1}$, $c_{X,0,3} \rightarrow c_{X,A,0} = 0,03 \text{ g L}^{-1}$, $c_{X,0,6} \rightarrow c_{X,A,0} = 0,06 \text{ g L}^{-1}$, $c_{X,0,12} \rightarrow c_{X,A,0} = 0,12 \text{ g L}^{-1}$, $c_{X,0,24} \rightarrow c_{X,A,0} = 0,24 \text{ g L}^{-1}$.

Nach Majer [122] ist eine relative Streuung der unteren Schranke γ_{lj} kleiner oder gleich 15 % ausreichend, um die Schätzbarkeit des Parameters j zu gewährleisten. Die in Tabelle 4.4 angegebenen Streuungen für Chargenprozess I und II wurden anhand des Skripts MATLAB Code 8.5 (siehe Anhang) berechnet. Obwohl vor allem für Chargenprozess II die Parameter K_z und k_{NH_4} oberhalb der angegebenen Grenze liegen, liegen beide Parametersätze in derselben Größenordnung. In Anbetracht der guten Übereinstimmung mit den experimentellen Daten wird daher von einer ausreichenden Parameterschätzungsgenauigkeit ausgegangen. Ferner stimmt die experimentell ermittelte Monod-Konstante für die von der Ammoniumkonzentration abhängige Wachstumskinetik $k_M = 14,03 \text{ mg L}^{-1}$, siehe Kapitel 4.1.1, gut mit den geschätzten Konstanten aus Chargenprozess I mit $k_{\text{NH}_4} = 7,02 \text{ mg L}^{-1}$ und Chargenprozess II mit $k_{\text{NH}_4} = 10,95 \text{ mg L}^{-1}$ überein. Die experimentell ermittelte Monod-Konstante für die CO_2 -Aufnahmerate r_{CO_2} in Abhängigkeit von PFD_0 liegt mit $k_M = 53,3 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ im Vergleich zu den geschätzten Parametern jedoch höher. Für Chargenprozess I wurde k_I zu $6,74 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, für Chargenprozess II zu $4,34 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ geschätzt. Die Abweichungen werden höchstwahrscheinlich durch Gleichung 4.21

verursacht, nach welcher k_I mit der durchschnittlichen CO_2 -Aufnahmerate $r_{\text{CO}_2, \emptyset}$ bzw. über den skalierten Extinktionskoeffizienten ϵ_{sca} nach dem Modell von Suh et al. [64] mit den Parametern K_c und K_z verknüpft ist. Der Parameter $e_{\text{N,P}}$ nahm in beiden Schätzungen den niedrigsten vorgegebenen Wert von 14 % an. Dies entspricht dem niedrigsten Anteil für *Chlorella vulgaris*, basierend auf den Messdaten aus Tabelle A7. Laut Literatur sind Stickstoffanteile von bis zu 15 % in pflanzlichen Proteinen bzw. Aminosäuren realistisch [170].

Eine Verringerung der Parameterschätzfehler bzw. eine Verbesserung der Parameterschätzung kann im Allgemeinen durch die Erzeugung einer erhöhten Anzahl von Messdaten während der Prozesszeiten, in denen die jeweiligen Parameter eine hohe Sensitivität aufweisen, erreicht werden [122]. Aus Kapitel 4.2.5 geht hervor, dass insbesondere der Zeitpunkt ab dem Stickstoff aufgebraucht wurde relevant ist. Eine höhere Anzahl Messdaten des Parameters c_X könnte ferner die Schätzgenauigkeit für k_I , K_c und K_z , vor allem während der exponentiellen und linearen Wachstumsphase, erhöhen. Die lokalen Maxima und Minima der Sensitivitätsverläufe aus Abbildung 4.12 markieren die Aktivierung anderer Stoffwechselforgänge, die einen anderen Energiebedarf besitzen. Dieser Zeitpunkt ist ebenfalls anhand der spezifischen Bildungsrate ersichtlich, vgl. Abbildung 4.9. Der Parameter $e_{\text{N,P}}$ besitzt meist eine hohe Sensitivität, da er den prozentualen Stickstoffanteil der Proteine und somit die gebildete aktive Biomasse c_{XA} beeinflusst, welche wiederum der wichtigste Faktor zur Berechnung der volumetrischen Konzentrationen im Block „Reaktor“ aus Kapitel 4.2.3 darstellt. Die hohe Sensitivität des Parameters k_I , vor allem zu Prozessbeginn, lässt sich durch seine Auswirkung auf r_{CO_2} begründen, wie weiter oben diskutiert. Der starke Einfluss von k_I und $e_{\text{N,P}}$ wird durch die globale Sensitivitätsanalyse, siehe Abbildung A14, bestätigt. Die Verfügbarkeit von Stickstoff und Licht sind essentiell für einen photoautotrophen Prozess.

Ein Großteil der publizierten Wachstumsmodelle verwendet zur Beschreibung der Lichtverteilung das Modell nach Lambert-Beer [63]. Von c_X abhängige gemessene Extinktionskoeffizienten (siehe Abbildung 4.7) bestätigten die Aussagen von Huesemann et al. [171], nach welcher die Annahme eines konstanten Extinktionskoeffizienten für $0 \leq c_X \leq 3 \text{ g L}^{-1}$ ausreichend ist, für $c_X \geq 3 \text{ g L}^{-1}$ jedoch kein linearer Zusammenhang mehr besteht. Eine realitätsnahe Beschreibung der Lichtverteilung anhand eines korrigierten Extinktionskoeffizienten wurde in der Literatur bereits ausgiebig diskutiert [63,89,172,173]. Die Verwendung von ϵ_{sca} nach dem Modell von Suh et al. [64], vgl. Kapitel 4.2.1, zeigte sich in dieser Arbeit als zielführend. Da die Parameter K_c und K_z nicht messtechnisch bestimmt werden konnten, erfolgte eine Bestimmung mittels Parameterschätzung, vgl. Kapitel 4.2.4, wobei die Startwerte aus der Literatur übernommen wurden [64]. Da die Lichtverteilung und die Lichteindringtiefe sich wesentlich auf die Effizienz eines Photobioreaktors auswirken, werden in der Literatur diverse Ansätze zur Effizienzsteigerung durch optimiertes Reaktordesign diskutiert [14,16,59–61].

Neben der oben diskutierten Startwertvariation und dem erheblichen Einfluss von k_I und $e_{N,P}$ spielt der Energiemetabolismus eine wichtige Rolle. Für Grünalgen finden sich in der Literatur jedoch nur wenige Angaben, welche den Energiebedarf zur Aufrechterhaltung der Zelle bzw. der Maintenancerate $r_{ATP,m}$ beschreiben. Außerdem variieren die Angaben stark und reichen von $1,44 \text{ g}_{ATP} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ für *Chlamydomonas reinhardtii* [31] bis hin zu $2,184 \text{ g}_{ATP} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ [132], $3,346 \text{ g}_{ATP} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ [174] und $7,909 \text{ g}_{ATP} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ für *Chlorella sorokiniana* [42]. Werden die kleinste und die größte Rate mit demselben Parametersatz simuliert, liefert dies eine Abweichung von c_X um 46 % nach einer Prozesszeit von 290 h (Daten nicht aufgetragen). Bei einem hohen Energiebedarf des Erhaltungsstoffwechsels steht dem Metabolismus weniger Glukose für anabole Stoffwechselwege zur Verfügung, woraus eine verminderte Biomassebildungsrate r_X bzw. Biomassekonzentration c_X resultiert. Für das erstellte Modell wurde eine Maintenancerate von $r_{ATP,m} = 2,184 \text{ g}_{ATP} \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ verwendet, da Zijffers et al. [132] sowohl dieselbe Spezies untersucht haben, als auch eine robuste experimentelle Grundlage liefern. Ein niedrigerer Energiebedarf für andere Photonenflussdichten oder Zelldichten ist allerdings nicht auszuschließen [132].

Obwohl das erstellte Modell einen Satzversuch mit *Chlorella vulgaris* und den einhergehenden Änderungen der Zellzusammensetzung schon hinreichend gut darstellen kann, sind der Simulation aufgrund vereinfachender Annahmen Grenzen gesetzt. Soll beispielsweise eine Freilandkultivierung simuliert werden, muss das metabolische Netzwerk die Entwicklung der Stoffflüsse während der Tag- und der Nachtphase berücksichtigen. Ein Ansatz zur Modellbildung für variierende Lichtintensitäten wurde beispielsweise von Knoop et al. [175] oder Baroukh et al. [37] unternommen. Weiterhin sind schwankende Außentemperaturen bei einer Freilandkultivierung zu beachten, vgl. Abbildung 4.23. Eine Erweiterung des Modellcodes, vgl. Tabelle A10, für diesen Anwendungsbereich ist jedoch möglich. Im Rahmen dieser Arbeit unterstützt das Simulationsergebnis aus Kapitel 4.2.4 die Messdaten der Wachstumskinetiken (vgl. Kapitel 4.1) oder der Luminostat-Versuche (vgl. Kapitel 4.3.3), nach denen die Photonenflussdichte, die CO_2 - und die Stickstoffverfügbarkeit die wichtigsten Faktoren zur Manipulation des Wachstums und der makromolekularen Zellbestandteile von *Chlorella vulgaris* darstellen.

5.3 Prozessbedingte Veränderung der Zellzusammensetzung

Die gewonnenen Erkenntnisse aus der Modellbildung und den Wachstumskinetiken wurden genutzt, um Prozessstrategien zu entwickeln, die eine gezielte Beeinflussung der Zellzusammensetzung ermöglichen. Zunächst wurde in Schüttelkolben-Vorversuchen der Einfluss variierender Photonenflussdichten auf die Protein- und Biomassebildung im Chargenprozess untersucht, vgl. Kapitel 4.3.1, sowie die Signifikanz verschiedener Medienkomponenten mittels statistischer Versuchsplanung analysiert, vgl. Kapitel 4.3.2. Anschließend wurden einzelne Einflussfaktoren in kontinuierlichen Prozessen und im Chargenprozess untersucht, vgl. Kapitel 4.3.3 bis 4.3.5.

5.3.1 Schüttelkolbenversuche

In der Versuchsreihe „Schüttelkolben I“ aus Kapitel 4.3.1 konnte im Einklang mit den Ergebnissen der vorherigen Kapitel gezeigt werden, dass eine kontinuierliche bzw. ausreichende Stickstoffversorgung der Organismen erforderlich ist, wenn diese als Proteinquelle zum Einsatz kommen sollen. Weiterhin scheint nach dem vollständigen Verzehr der Stickstoffquelle Ammonium nicht nur die Proteinsynthese, sondern auch die Pigmentsynthese zu stagnieren. Das zusammenhängende Verhältnis von Proteinen und Pigmenten wurde bereits in Kapitel 5.1 festgesetzt. Trotz vorherrschendem Stickstoffmangel nimmt die Biotrockenmassekonzentration weiter zu. Dieses Phänomen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Anreicherung von Speicherstoffen zurückzuführen [119,124]. Außerdem lassen sich folgende die in den vorigen Kapiteln diskutierten Phänomene ableiten, nach denen:

- (i) höhere Photonenflussdichten einen schnelleren Anstieg von c_X , bzw. eine Erhöhung von μ , bewirken,
- (ii) mit Eintritt einer Stickstofflimitierung keine weiteren Proteine gebildet werden und
- (iii) ein Zusammenhang zwischen der Pigmentkonzentration - speziell Chlorophyll a - und der Proteinkonzentration besteht.

Die auf der Basis einer statistischen Versuchsplanung erstellte Versuchsreihe „Schüttelkolben II“ (siehe Kapitel 4.3.2) bestätigt diesen Zusammenhang, vgl. Konzentrationsoptima für q_P und $q_{Chl.a}$ in Abbildung 4.15 und Abbildung A8. Einzige Ausnahme stellt der Ansatz mit $PFD_0 = 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (siehe Abbildung 4.13, oben rechts) dar, bei welchem eine leichte Zunahme der Proteinkonzentration nach Eintritt der Stickstofflimitierung zu beobachten war. In Anbetracht von den anderen Ergebnissen dieser Arbeit bezüglich der Proteinakkumulation und vorhandener Literaturdaten ist hierbei jedoch von einer Messabweichung auszugehen. Die Biomasseproduktivität der Versuchsreihe Schüttelkolben I (siehe Abbildung 4.13) bei $PFD_0 = 50, 100, 200$ und $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beträgt insgesamt $P_X = 0,255, 0,309, 0,427$ und $0,481 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ mit einem spezifischen Proteingehalt bei Versuchsende von $q_P = 0,67, 0,61, 0,42$ und $0,36 \text{ g g}^{-1}$. Der in Kapitel 4.1.1 beschriebene Trend, einer mit der Verminderung der Lichtverfügbarkeit einhergehenden Zunahme des Proteingehalts, wurde somit bestätigt. Der Proteingehalt bei $PFD_0 = 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($q_P = 0,67 \text{ g g}^{-1}$) stimmt gut mit den Chemostat-Daten unter lichtlimitierten Wachstumsbedingungen ($q_P = 0,64 \text{ g g}^{-1}$, siehe Kapitel 4.3.5) und dem, mit dem statistischen Modell berechneten, theoretisch erreichbaren Anteil ($q_P = 0,65 \text{ g g}^{-1}$, siehe Kapitel 4.3.2) überein. Mit hoher Wahrscheinlichkeit führt die zuvor beschriebene Akkumulation von Lichtsammelkomplexen zur Erhöhung des beobachteten Proteingehalts [139,140].

Bereits in Kapitel 5.1 wurde das quantitative Verhältnis von Chlorophyll a zu Gesamtprotein diskutiert. Dabei fiel auf, dass *Chlorella vulgaris* ein ähnliches Verhältnis von $q_{Chl.a,P} = 41,8 \text{ mg g}^{-1}$ für $PFD_0 \geq 196 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, von $q_{Chl.a,P} = 37,8 \text{ mg g}^{-1}$ für verschiedene CO_2 -Partialdrücke und von $q_{Chl.a,P} =$

45,3 mg g⁻¹ für $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} \geq 31,5 \text{ mg L}^{-1}$ aufweist. Nichtlimitierende Wachstumsbedingungen führen somit zu einem ähnlichen Pigmentanteil pro Proteingehalt. Die graphische Auftragung des Gesamtproteingehalts gegen den spezifischen Gehalt an Chlorophyll a und b der Endproben von Versuchsreihe Schüttelkolben II (siehe Kapitel 4.3.2) bestätigt diesen Zusammenhang (vgl. Abbildung A9) mit Anteilen zwischen $q_{\text{Chl.a+b,P}} = 39,38$ bis $96,20 \text{ mg g}^{-1}$ Chlorophyll a und b oder $q_{\text{Chl.a,P}} = 27,59$ bis $72,07 \text{ mg g}^{-1}$ Chlorophyll a pro Gesamtprotein. Maxwell et al. [176] analysierten bei *Chlorella vulgaris* den Proteingehalt der Thylakoidmembranen und geben ein Verhältnis an für Chlorophyll a und b pro Thylakoidmembranprotein von $q_{\text{Chl.a+b,P(Thylakoid)}} = 119,05 \text{ mg g}^{-1}$ bei $\text{PFD}_0 = 150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bzw. $q_{\text{Chl.a+b,P(Thylakoid)}} = 221,24 \text{ mg g}^{-1}$ bei $\text{PFD}_0 = 2200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und $27 \text{ }^\circ\text{C}$. Da der Photosyntheseapparat 30 - 50 % [177] des Gesamtproteingehalts der Zelle ausmacht, werden die in dieser Arbeit ermittelten Verhältnisse durch die Literaturangaben bestätigt. Die zusammenhängende, lichtabhängige Expression von Pigmenten und Proteinen wurde im späteren Verlauf der Prozessentwicklung genutzt, um eine Akkumulation der Photosysteme und Lichtsammelkomplexe zu induzieren, vgl. Kapitel 4.3.5.

Weiterhin wurde in der Versuchsreihe Schüttelkolben II im Teilfaktorplan (Fractional Factorial Design) für die Medienkomponente Ammoniumchlorid die größte Signifikanz ermittelt. Stickstoff stellt ein elementarer Bestandteil von Aminosäuren bzw. funktionaler Biomasse dar [178] und zeigte bei der aufgenommenen Wachstumskinetik den größten Einfluss auf die Zellzusammensetzung (siehe Kapitel 4.1.1), vor allem unter substratlimitierten Bedingungen. Die hohe Signifikanz der Medienkomponente Ammoniumchlorid ist daher realistisch. Die Komponenten Magnesiumsulfat und Eisensulfat zeigten bei alleiniger Betrachtung einen geringen Einfluss mit einem p-Wert $> 0,1$ (siehe Tabelle 4.5). Wurde jedoch eine Kombination aus Magnesiumsulfat und Eisensulfat beurteilt, zeigte sich einen positiver und signifikanter Einfluss auf den Protein- und Pigmentgehalt. Höchstwahrscheinlich ist dies auf der essentiellen Rolle beider Komponenten als Cofaktor des Photosyntheseapparats zurückzuführen [179]. Die Medienkomponente Phosphat lag mit einem p-Wert von 0,0243 nahe der Signifikanzgrenze (p-Wert $< 0,0099$), vgl. Tabelle 4.5. Auf eine Anpassung dieser Komponente wurde allerdings verzichtet, da die verwendete Konzentration von $c(\text{PO}_4^{3-}) = 0,324 \text{ g L}^{-1}$ im 2fach TP Medium laut des statistischen Modells bereits hohe Proteinanteile begünstigte. Eine Phosphatlimitierung würde sich nicht nur negativ auf die Nukleotidsynthese, sondern auch auf die Synthese und Regenerierung der Substrate im Calvin-Zyklus auswirken, was eine Reduktion der CO₂-Fixierung zur Folge hätte [180]. Natriumchlorid wurde als insignifikant eingestuft, trotz Abwesenheit des Faktors konnten hohe Proteinanteile erzielt werden. Somit wurden die Angaben von Kong et al. [181] widerlegt, nach denen eine Natriumchlorid-Konzentration von $c_{\text{NaCl}} = 3,02 \text{ g L}^{-1}$ als optimal für die Biomasseproduktion von *Chlorella vulgaris* eingestuft wurde. Eine vertiefende Untersuchung der Faktoren FeSO₄, MgSO₄ und NH₄Cl mittels „Response Surface Methodology“ ermöglichte, die resultierenden Protein- und Pigmentanteile unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu 100 % zu beschreiben, siehe Abbildung 4.15. Kong et al. [181] bestimmten für einen

mixotroph kultivierten *Chlorella vulgaris* Stamm die optimale MgSO_4 -Konzentration zu $1,33 \text{ g L}^{-1}$ für den Zielparameter Biomassekonzentration und bestätigen damit die gefundenen Werte. Wolf et al. [182] ermittelten für das Element Magnesium ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum photoautotroph kultivierter Mikroorganismen. Chen et al. [183] stellten fest, dass eine Eisenkonzentrationen zwischen $0,005 - 0,01 \text{ g L}^{-1}$ einen Einfluss auf die Aminosäurezusammensetzung der Zelle hat. Demnach führt eine Erhöhung der Eisenkonzentration zum Anstieg des Gehalts essentieller Aminosäuren von 52 % auf 70 % bei einem Proteingehalt zwischen $q_p = 49,1 - 53,4 \%$. In dieser Arbeit wurde diese Fragestellung nicht untersucht, allerdings zeigte die Höhe der Eisensulfatkonzentration einen signifikanten Einfluss auf den Gesamtgehalt an Proteinen und Chlorophyll a. Dies lässt sich mit der Rolle von Eisen als Cofaktor innerhalb des Photosyntheseapparats erklären [44,179]. Die Vorhersageformel des Optimierungsdesigns liefert eine Ammoniumchlorid-Konzentration von $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 3,88 \text{ g L}^{-1}$, um einen maximalen Proteinanteil von $q_p = 0,65 \text{ g g}^{-1}$ zu erzielen; dies entspricht einer Konzentration reinen Stickstoffs von $c(\text{N}) = 1,016 \text{ g L}^{-1}$. Bilanovic et al. [184] ermittelten eine optimale Stickstoffkonzentration $c(\text{N})$ zwischen $285 - 427 \text{ mg L}^{-1}$ bezogen auf eine Biotrockenmassekonzentration von $c_x = 2 \text{ g L}^{-1}$. Unter Berücksichtigung der mehr als doppelt so hohen erzielten Biotrockenmassekonzentration von bis zu $c_x = 5,3 \text{ g L}^{-1}$ in dem Optimierungsdesign (siehe Kapitel 4.3.2) liegen die Optima basierend auf den Daten von Bilanovic et al. [184] mit maximal $e_{N,X} = 0,214 \text{ g g}^{-1}$ in demselben Bereich wie der auf den Daten dieser Arbeit basierende Wert von $e_{N,X} = 0,192 \text{ g g}^{-1}$. Höhere Ammoniumchlorid-Konzentrationen von bis zu $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 5 \text{ g L}^{-1}$ zeigten einen negativen Einfluss auf den Proteingehalt, siehe Abbildung 4.15. Der inhibierende Effekt hoher Ammoniumkonzentrationen auf das Zellwachstum von Mikroalgen wurde in der Literatur schon vielfach beschrieben, die Abspaltung eines Protons von NH_4^+ führt zum toxischen und zellschädigenden NH_3 [185]. Die statistische Versuchsplanung konnte erfolgreich eingesetzt werden, um die Signifikanz der Medienkomponenten Ammoniumchlorid, Magnesiumsulfat und Eisensulfat auf die Proteinbildung und die Pigmentbildung zu ermitteln. Die Ergebnisse der statistischen Modelle bestätigen die in der Literatur angegebenen Werte und stimmen mit den in dieser Arbeit experimentell ermittelten Daten überein. Der Proteingehalt sowie der Pigmentgehalt von *Chlorella vulgaris* scheinen somit miteinander verknüpft zu sein und stehen unter einem ähnlichen Einfluss von NH_4Cl , $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ und $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$.

5.3.2 Versuche im Midi- und Maxi-Plattenreaktor

In den kontinuierlichen Prozessen im Luminostat Betrieb (siehe Kapitel 4.3.3) konnte durch Zugabe eines stickstoffreichen bzw. -armen Mediums im Zulauf eine reproduzierbare Beeinflussung hinsichtlich der makromolekularen Zellzusammensetzung demonstriert werden. Die für den Stamm *Chlorella vulgaris* entwickelte Prozessstrategie konnte erfolgreich auf die Stämme *Nannochloropsis limnetica*, *Phaeodactylum tricoratum* sowie *Synechocystis* sp. BW86 übertragen werden. Dabei variierten die

spezifischen Quota der makromolekularen Zellbestandteile um die in Tabelle 4.7 bzw. Tabelle A7 angegebenen Bereiche, wobei, in Einklang mit anderen Veröffentlichungen [33,119,124], eine Anreicherung von Speicherstoffen in Form von Kohlenhydraten und Lipiden unter Stickstofflimitierung beobachtet wurde. So sank die Proteinzellquota von *Chlorella vulgaris* von $q_P = 0,48 \pm 0,04 \text{ g g}^{-1}$ auf $q_P = 0,25 \pm 0,11 \text{ g g}^{-1}$ bei steigendem Kohlenhydrat- und Lipidanteil bis zu $q_{Kh} = 0,28 \text{ g g}^{-1}$ und $q_L = 0,39 \text{ g g}^{-1}$. Ikaran et al. [186] zeigten ebenfalls eine abnehmende Zellquota für Proteine von $q_P = 0,45 \text{ g g}^{-1}$ auf $q_P = 0,16 \text{ g g}^{-1}$ bei Stickstoffmangel. Guccione et al. [33] berichteten von einer Reduktion von $q_P = 0,41 \pm 0,04 \text{ g g}^{-1}$ auf $q_P = 0,18 \pm 0,04 \text{ g g}^{-1}$. Der Proteingehalt von *Nannochloropsis limnetica* betrug $q_P = 0,52 \text{ g g}^{-1}$ und sank auf $q_P = 0,20 \text{ g g}^{-1}$. Freire et al. [187] bestimmten ähnliche Anteile für q_P zwischen $0,30 - 0,47 \text{ g g}^{-1}$. Chrismadha und Borowitzka [188] geben für *Phaeodactylum tricornutum* maximale Werte in aschefreier Biomasse von $q_P = 0,70 \text{ g g}^{-1}$ mit Kohlenhydrat- und Lipidanteilen von $q_{Kh} = 0,15 \text{ g g}^{-1}$ und $q_L = 0,20 \text{ g g}^{-1}$ an. Die im Luminostat-Betrieb gemessenen Anteile von q_P , q_{Kh} und q_L liegen in derselben Größenordnung. Die von Dillschneider et al. [119] erzielten Lipidanteile im Chargenprozess von bis zu $q_L = 0,52 \text{ g g}^{-1}$ bei Stickstoffmangel konnten in dieser Arbeit allerdings nicht erreicht werden. Aus Abbildung 4.17 geht ein maximaler Anteil von $q_L = 0,34 \pm 0,06 \text{ g g}^{-1}$ hervor. Möglicherweise wirkt sich die kontinuierliche Betriebsweise mit der kürzeren Verweilzeit der Zellen im Reaktor negativ auf die Lipidakkumulation aus. Die erzielten Zellquota q_P und q_L für *Synechocystis* sp. BW86 stimmen mit den von Hays und Ducat [189] publizierten Werten für die Zellbestandteile von Cyanobakterien überein. Diese erreichen unter idealen Wachstumsbedingungen Proteinanteile zwischen $q_P = 0,40 \text{ g g}^{-1}$ und $q_P = 0,79 \text{ g g}^{-1}$ sowie Lipidanteile zwischen $q_L = 0,05 \text{ g g}^{-1}$ und $q_L = 0,10 \text{ g g}^{-1}$. Die angegebenen Kohlenhydratanteile zwischen $q_{Kh} = 0,10 \text{ g g}^{-1}$ und $q_{Kh} = 0,30 \text{ g g}^{-1}$ wurden mit Anteilen von bis zu $q_{Kh} = 0,63 \text{ g g}^{-1}$ jedoch um mehr als das Doppelte überschritten. Literaturdaten über den Kohlenhydratanteil von *Synechocystis* sp. unter stickstofflimitierenden Bedingungen stehen jedoch nicht zur Verfügung. Da die Pigmente Bestandteil der Lichtsammelkomplexe sind, welche hauptsächlich aus funktionellen Proteinen bestehen (siehe Kapitel 5.1.1), folgen die spezifischen Pigmentanteile dem Verlauf von q_P , vgl. Abbildung 4.16. Veränderungen in der Pigmentzusammensetzung werden auch aus den Absorptionsspektren ganzer Zellen (siehe Abbildung A10) ersichtlich. Bei stickstofflimitierenden Bedingungen sind die Peaks weniger ausgeprägt; die Verkleinerung des charakteristischen Peaks bei einer Wellenlänge von 680 nm lässt auf eine Abnahme der Chlorophylle schließen. Es wird vermutet, dass Chlorophylle zum Recycling des vorhandenen Stickstoffs abgebaut werden [190]. Die erzielte maximale Wachstumsrate für *Chlorella vulgaris* von $\mu_{max} = 2,1 \text{ d}^{-1}$ stimmt gut mit den über die Wachstumskinetik ermittelten Daten überein (vgl. Abbildung 4.2). Bei *Phaeodactylum tricornutum* betrug $\mu_{max} = 0,68 \text{ d}^{-1}$ und ist annähernd identisch mit der von Dillschneider et al. [127] publizierten maximalen Wachstumsrate. Weiterhin steht die maximal erreichte Wachstumsrate für *Nannochloropsis limnetica* mit $\mu_{max} = 0,82 \text{ d}^{-1}$ in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Fisher et al. [191] mit $\mu_{max} =$

0,89 d⁻¹ bei PFD₀ = 650 μmol m⁻² s⁻¹. Lediglich die maximale Wachstumsrate von *Synechocystis* sp. BW86 liegt mit μ_{max} = 0,67 d⁻¹ unterhalb der für den Wildstamm bestimmten Rate von μ_{max} = 1,33 d⁻¹ (vgl. Kapitel 4.1.2 und Kapitel 5.1). Die Mutation ist höchstwahrscheinlich für eine verminderte Wachstumsrate verantwortlich, in Kapitel 4.3.4 wurde gegenüber dem Wildstamm bereits eine verminderte Biomasseakkumulation und eine verminderte PCE bei sonst gleichen Wachstumsbedingungen festgestellt. Tredici [4] bestimmte einen Maximalwert für die Konversion absorbierter Energie bei 700 nm in chemische Energie (Glukose) von PCE = 12,4 %. Norsker et al. [13] ermittelten eine PCE von 3 % für Rohrreaktoren und 5 % für Plattenreaktoren. Ferner wird eine theoretisch mögliches Maximum von PCE = 26,7 % postuliert im Falle einer idealisierten Mikroalge ohne Effizienzverluste [70]. Schlagermann et al. [32] nennen einen Maximalwert von PCE = 12,4 %. Sämtliche untersuchten Stämme (siehe Kapitel 4.3.3) liegen innerhalb dieser Bereiche, wobei unter der vorgelegten Prozessumgebung *Chlorella vulgaris* als effizientester Nutzer der eintreffenden Photonen identifiziert wurde. Auffällig ist, dass alle Stämme mit Eintritt der Stickstofflimitierung einen Anstieg von c_x verzeichneten (vgl. Abbildung 4.16). Ferner wurde eine mit der Biotrockenmassenkonzentration einhergehende Erhöhung der Zellzahl beobachtet (siehe Kapitel 4.3.3). Beispielsweise verzeichnete *Chlorella vulgaris* eine Verdoppelung von c_x und eine fünffach erhöhte Zellzahl unter stickstofflimitierenden Bedingungen (Daten nicht für alle Stämme angegeben und aufgetragen). Wie in Kapitel 5.1.3 diskutiert, ist dies zum einen ein Indiz für eine Gewichtsreduktion der Zellen, zum anderen birgt die vermehrte Bildung von Tochterzellen aufgrund des höheren Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen den Vorteil, Nährstoffe schneller aufnehmen zu können [160,161]. Da unter Stickstoffmangel Speicherstoffe akkumuliert werden, welche im Allgemeinen nicht an der Absorption von Photonen beteiligt sind, verbleibt im Luminostat-Betrieb die Transmission trotz einer Zunahme von c_x nahezu konstant (siehe Abbildung 4.16). Die erhöhte Zellzahl und Speicherstoffanteile wirken sich nicht auf die Menge absorbierter Photonen aus. Dieses Phänomen tritt bei dem Turbidostat-Prozess nicht auf, da bei dieser Prozessstrategie nach der Trübung geregelt wird, statt nach den transmittierten Photonen im sichtbaren Bereich des Lichts. Eine Akkumulation von inaktiver Biomasse unter stickstofflimitierenden Bedingungen würde eine Änderung der Trübung hervorrufen, was zu einem vermehrten Auswaschen der Zellen führt. Aus diesem Grund ist im Turbidostat-Prozess eine Änderung der Zellzahl, jedoch keine Änderung von c_x messbar (vgl. Abbildung 4.3). Anhaltende Stickstofflimitierungen haben eine Inhibierung des Zellwachstums und der Zellteilung zur Folge [192,193], wie in Abbildung 4.17 bei Prozessende ersichtlich. Mikroskopisch konnte die Akkumulation von Speicherstoffen durch die Ausbildung von Granula beobachtet werden (siehe Abbildung A11), wobei für *Phaeodactylum tricornerutum* das von Martino et al. [194] beschriebene Phänomen bestätigt werden konnte, nachdem die Zellen unter Stickstofflimitierung vermehrt die resistente ovale Morphologie mit höherer Zelloberfläche ausbilden.

Die Beeinflussbarkeit der Cyanophycin-Anreicherung in *Synechocystis* sp. wurde mittels Chargenprozessen und verschiedenen Startkonzentrationen an Phosphat untersucht (siehe Kapitel 4.3.4). Im Vergleich zu dem kontinuierlichen Prozess (siehe Kapitel 4.3.3) wurde eine geringere PCE zwischen 5,5 - 7,3 % detektiert. Touloupakis et al. [130] erzielten PCEs zwischen 7,7 - 11,9 % mit *Synechocystis* sp. PCC6803 im kontinuierlichen Betrieb, welche annähernd den Werten der maximal erzielten PCE in dem Turbidostat-Prozess dieser Arbeit entsprechen (siehe Tabelle 4.7). In kontinuierlichen Prozessen scheinen höhere PCE Werte erzielbar zu sein, höchstwahrscheinlich aufgrund der besseren Lichtverteilung und der Reduktion von Dunkelzonen (vgl. Abbildung 3.1). Der in Abbildung 4.18 dargestellte Beispielprozess zeigt, dass *Synechocystis* sp. in der Lage ist, trotz Verbrauch der Phosphorquelle das Wachstum fortzusetzen. Es ist davon auszugehen, dass Polyphosphate innerhalb der ersten 24 h als Speicher angereichert wurden, welche den Organismus bis zum Eintritt der stationären Phase mit Phosphat versorgten [195]. Weiterhin ist ein zellinterner Abbau der Phycobilisomen denkbar, da ein Ausbleichen der Kultur von einer blaugrünen zu einer gelblichen Färbung beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Ein Effekt, welcher für das Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 unter stickstoff-, schwefel-, und phosphorlimitierten Bedingungen beschrieben wurde [196]. Die PCE Werte aus Tabelle 4.8 zeigen, dass die Zellen einen gewissen Phosphor-Mangel tolerieren und dabei keinem Stress ausgesetzt sind. Erst für $c_{P,0} \leq 1,09 \text{ mg L}^{-1}$ ist ein Rückgang der PCE zu beobachten und somit ein negativer Einfluss auf den Metabolismus festzustellen. Ein zunehmender Phosphatmangel zwingt die Zelle die Nukleotidsynthese einzustellen. Die Zellteilung kann nicht weiter erfolgen (siehe Abbildung 4.18). Der darauffolgende Anstieg nach einer Prozesszeit von 9 d von $c_X = 1,00$ auf $c_X = 1,10 \text{ g L}^{-1}$ indiziert, dass die verbleibenden Nährstoffe zur Formierung von Proteinen oder Speicherstoffen genutzt werden. Obwohl der Zusammenhang von Phosphorverfügbarkeit und Cyanophycin-Akkumulation bereits in anderen Arbeiten untersucht wurde, fehlten bisher quantitative Informationen über die passende Phosphatkonzentration, zellinterne Phosphoranteile und zugehörige PCE Werte [20,108,197]. Elbahloul et al. [108] bezeichnen die Phosphatlimitierung als effektivste Methode zur Induktion der Cyanophycin-Akkumulation in *Acinetobacter calcoaceticus*. Bei geringen Phosphatmengen von $c(\text{PO}_4^{3-}) = 42 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ bzw. $c(\text{PO}_4^{3-}) = 1,30 \text{ mg L}^{-1}$ traten erhöhte Cyanophycinanteile auf. Diese Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie die in Tabelle 4.8 gelisteten. Zwar kann die Produktion von Cyanophycin auch mittels heterotrophen Bakterien, genetisch modifizierten Hefen oder Pflanzen realisiert werden, welche ein Cyanophycin-Synthetase-Gen (CphA) besitzen, allerdings unterscheidet sich das so produzierte Cyanophycin in der Polymerlänge, der Aminosäurezusammensetzung und der Löslichkeit [47]. Guerrero et al. [198] berichteten über einen genetisch modifizierten *Synechocystis* sp. PCC6803 Stamm, welcher eine genetische Stabilität von über sechs Monaten aufwies. Obwohl der hier eingesetzte Produktionsstamm *Synechocystis* sp. BW86 lediglich eine Punktmutation besitzt [20], kann nicht von einer ähnlichen genetischen Stabilität ausgegangen werden. Die genetische Stabilität dieses Stammes ist daher in zukünftigen

Arbeiten zu verifizieren. Die Resultate dieser Arbeit bestätigen, dass eine auf phosphatlimitierten Wachstumsbedingungen basierende Produktion natürlichen Cyanophycins eine erfolgreiche Prozessstrategie darstellt. Da der verwendete Midi-Plattenreaktor eine geometrische Analogie zu größeren Produktionssystemen aufweist, ist die Möglichkeit der Maßstabsvergrößerung gegeben.

Um die in Kapitel 4.3.5 beschriebene und in Kapitel 5.1.1 diskutierte Zunahme des Proteinanteils unter lichtlimitierten Wachstumsbedingungen in einem Fermentationsprozess zu generieren, wurde in dem Maxiplattenreaktor ein kombinierter Luminostat- und Chemostat-Prozess durchgeführt. Aufgrund des verzögerten Starts des Luminostat-Prozesses erfuhren die Zellen eine Stickstofflimitierung. Dies führte zu den beschriebenen reduzierten Protein- und Pigmentgehalten sowie einer Speicherstoff-Akkumulation (vgl. Abbildung 4.20). Die Neuplatzierung der Transmission-Messvorrichtung ermöglichte die korrekte Funktionsweise des PI-Reglers, was einen stabilen Luminostat-Betrieb mit einem durchschnittlichen Proteingehalt der Biomasse von 51 % über eine Prozesszeit von mehr als 4 d zuließ. Gegenüber dem Luminostat-Prozess im Midi-Plattenreaktor (siehe Kapitel 4.3.3) wurde eine um nahezu 20 % reduzierte Wachstumsrate festgestellt. Dies könnte mit einer inhomogeneren Durchmischung durch die Begasungsnadeln im Vergleich zur PTFE-Membran zusammenhängen (siehe auch Lehr [199]), oder durch den stellenweise inhomogenen Plattenabstand der Polycarbonat-Scheiben hervorgerufen werden. Ursache hierfür ist der hydrostatische Druck, welcher zu unterschiedlichen Schichtdicken bzw. Auswölbungen führt und somit eine ungleichmäßige Lichtverteilung zur Folge hat. Die Zellquota für Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Pigmente sind hingegen mit den im Luminostat-Betrieb im Midi-Plattenreaktor gemessenen Werten vergleichbar. Eine nachfolgende manuelle Reduktion von \dot{F}_{Zulauf} führte zu der Einstellung einer konstanten Stoff- und Ionenkonzentration und diente dem Wechsel zum Chemostat-Betrieb, welcher dann stabil über 5 d realisiert werden konnte. Der Anstieg von c_X bei gleichbleibender PFD_0 rief einen lichtlimitierten Wachstumszustand hervor, wodurch q_P auf durchschnittlich $0,64 \text{ g g}^{-1}$ anstieg. Die ergänzende Analyse der Aminosäurezusammensetzung (siehe Tabelle 4.9) bestätigte die bereits diskutierte Eigenschaft photoautotropher Mikroorganismen, mehr Lichtsammelkomplexe zu bilden und so in dem damit zusammenhängenden Photosyntheseapparats einfallende Photonen effizienter zu verarbeiten [139,140]. Von den 18 untersuchten Aminosäuren des Stammes *Chlorella vulgaris* stimmten 12 mit ihrer prozentualen Zunahme zu über 80 % mit deren jeweiligen Anteil im Proteinkomplex der Photosysteme I und II, welche ebenfalls die Proteine der Lichtsammelkomplexe enthalten, überein. Nur 7 der 18 Aminosäuren zeigten mit ihrem prozentualen Zuwachs eine Übereinstimmung zu über 80 % mit dem Vergleichsenzym RuBisCO. In Anbetracht der annähernd identischen molekularen Zusammensetzung aller Proteine und Enzyme, wie von Torabizadeh [200] ausgeführt, wurde somit ein Hinweis erbracht, dass die Zunahme des Proteingehalts beim Wechsel von lichtgesättigten zu lichtlimitierten Wachstumsbedingungen möglicherweise einer verstärkten Expression von Photosystem I und II

zuzuschreiben ist. Die Fettsäureanalyse ergab für beide Betriebspunkte einen durchschnittlichen Gesamtgehalt von nahezu $q_L = 0,11 \text{ g g}^{-1}$ (siehe Tabelle 4.10) welcher die in Kapitel 3.3.2 berechneten Lipidanteile zwischen $q_L = 0,04 \text{ g g}^{-1}$ und $q_L = 0,17 \text{ g g}^{-1}$ bestätigt.

Insgesamt wurde gezeigt, dass die makromolekulare Zellzusammensetzung durch Veränderung der Substratzufuhr und der zu Verfügung stehenden Photonen gezielt beeinflussbar ist. Die häufig zu findende Argumentation in der Photobiotechnologie, eine Mikroalge aufgrund ihres vermeintlich hohen Protein- oder Lipidanteils auszuwählen, um so optimale Erträge der jeweiligen Stoffklasse zu erzielen, konnte damit entkräftet werden. Vielmehr ist das stammspezifische Aminosäure- und Fettsäureprofil bzw. ein spezifisches metabolisches Produkt für die Stammauswahl entscheidend, da die makromolekularen Anteile prozesstechnisch variiert werden können. Eine prozessbedingte Veränderung der Zellzusammensetzung kann allerdings reduzierte Wachstumsraten und PCE-Werte zur Folge haben. Dies konnte bei der Übertragung der kontinuierlichen Prozessstrategie auf den 8 L-Maßstab zur Maximierung des Proteingehalts erfolgreich gezeigt werden. Metabolische Kosten sind daher zu berücksichtigen.

5.4 Übertragbarkeit von Prozessstrategien in den Pilotmaßstab

Zur Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse in den Pilotmaßstab wurde eine Kultivierung im Freiland-Plattenreaktor durchgeführt, siehe Kapitel 4.4.3. Um die Prozessführung den wechselnden Lichtverhältnissen im Freien anzupassen, wurde zuvor ein CO_2 -Regler etabliert, welcher den CO_2 -Fluss in Abhängigkeit vom pH-Wert regelt, um die photosynthetische und respiratorische Aktivität der Zellen zu berücksichtigen (siehe Kapitel 4.4.1). Tamburic et al. [201] beschrieben bereits den großen Einfluss der metabolischen Aktivität von Mikroorganismen auf den pH-Wert und die Relevanz einer geregelten CO_2 -Zugabe bei wechselnden Lichtverhältnissen zur Reduzierung der Betriebskosten und zur Vermeidung einer Kohlenstofflimitierung in den Tagphasen. Gegenüber einer konstanten CO_2 -Begasungsrate wurden durch den PI-Regler 64 % CO_2 eingespart, bezogen auf den maximalen Fluss von $\dot{F}_{\text{CO}_2} = 5,5 \text{ mL min}^{-1}$ zur Vermeidung von Limitierungserscheinungen über einer Prozesszeit von 6 d. Der durchschnittliche CO_2 -Gehalt während der Tagphase betrug $\varphi_{\text{CO}_2} = 1,25 \%$ ($p_{\text{CO}_2} = 1,27 \text{ kPa}$) und unterschritt nie $\varphi_{\text{CO}_2} = 0,5 \%$ ($p_{\text{CO}_2} = 0,5 \text{ kPa}$), wodurch CO_2 gesättigtes Wachstum gewährleistet wurde (vgl. Abbildung 4.2 oder Dillschneider [148]). Komplexere Ansätze zur pH-Regelung in Form von modellprädiktiven Reglern werden zwar in der Literatur beschrieben [202], finden in der Praxis aufgrund des hohen Aufwands einer modelltheoretischen Erfassung und Implementierung jedoch nur selten Verwendung. Hinsichtlich der geringen Abweichungen des pH Signals in Abbildung 4.21 erwies sich die gewählte Regelung als zielführend. Mikroalgen wie *Chlorella vulgaris* tolerieren darüber hinaus einen breiten pH Bereich zwischen $6 \leq \text{pH} \leq 8$ (siehe Kapitel 4.1.1) oder höher [203,204], bevor ein Rückgang der Wachstumsrate eintritt. Rachlin und Grosso [205] ermittelten einen ähnlichen Bereich für *Chlorella*

vulgaris mit einem pH-Bereich zwischen 6,2 - 8,3. Da in diesem Bereich hauptsächlich Hydrogencarbonat als Carbonatspezies vorliegt, haben Mikroalgen und Cyanobakterien aktive Aufnahmemechanismen für HCO_3^- entwickelt, sogenannte Carbon Concentrating Mechanisms (CCMs) [206,207]. Hauptgrund für die Robustheit von Mikroalgen gegenüber einer sauren oder alkalischen Umgebung ist die Fähigkeit der aktiven Exkretion überschüssiger H^+ oder OH^- Ionen. Dadurch wird ein neutraler pH Wert im Cytoplasma aufrecht erhalten [208]. Weiterhin wurde ein Vorversuch des Tag-Nacht-Betriebs im Labormaßstab untersucht, wobei eine Kombination aus PI-Regler für die Kohlenstoffdioxid-Zufuhr und einer Ammoniaklösung als pH-Stellmittel verwendet wurde (siehe Kapitel 4.4.2). Steinbusch [72] setzte diese Strategie bereits erfolgreich zur Vermeidung einer Stickstofflimitierung ein. Mit einer Ammoniumkonzentration von durchschnittlich $c(\text{NH}_4^+) = 268,7 \text{ mg L}^{-1}$ im Laborversuch bzw. 216,6 - 314,4 mg L^{-1} $c(\text{NH}_4^+)$ im Freilandversuch zeigte sich diese Art der Substratzufuhr als sinnvoll. Die Zellquota für Proteine und Kohlenhydrate (siehe Abbildung 4.22) zeigen den von Lacour et al. [38], Foy und Smith [209] oder Torzillo [40] beschriebenen Verlauf für Kultivierungen im Tag-Nacht-Zyklus. In der Tagphase steigt q_{Kh} aufgrund der Photosyntheseleistung an, in der Nachtphase sinkt q_{Kh} aufgrund der Zellatmung. Die Protein-Zellquota q_p zeigte vor allem zu Beginn des Prozesses einen gegenläufigen Trend und stimmt mit dem Verlauf des Chlorophyllanteils überein (siehe Abbildung A12). Nach einer Prozesszeit von 8 d ist ein Trend für q_p nur schwer ersichtlich. Möglicherweise ist die verwendete OD_{750} -BTM-Korrelation für die wechselnden Bedingungen einer Tag-Nacht-Kultivierung und der damit schwankenden Biomassezusammensetzung fehleranfällig. Dadurch können Abweichungen der spezifischen Anteile entstehen. Eine Studie, die sich mit dem Biomasseverlust von Mikroalgen während der Nachtphase in Labor- und Freilandexperimenten beschäftigte, berichtet von einem Gesamtverlust von c_x zwischen 2 - 10 % während einer Dunkelphase von 12 h [39]. Der repetitive Tag-Nacht-Chargenprozess mit *Chlorella vulgaris* bestätigt diese Angaben (siehe Kapitel 4.4.2); in den Nachtphasen reduzierte sich c_x um 2,9 - 10,0 %. Dabei hängt die Menge des nächtlichen Biomasseverlustes, ähnlich wie die makromolekulare Zellzusammensetzung (siehe Kapitel 5.1) von den Wachstumsbedingungen ab [40]. Die Ursache des Biomasseverlustes geht mit respiratorischen Prozessen zur Energiebereitstellung und Aufrechterhaltung des Stoffwechsels einher [38,39]. Aus dem entwickelten Zellmodell dieser Arbeit (siehe Kapitel 4.2.2) geht die Energiebereitstellung in Form von ATP aus der oxidativen Phosphorylierung hervor, basierend auf der metabolischen Aktivität des Mitochondriums [37,41]. Der Volumenstrom an zugeführtem CO_2 sowie die Volumenanteile von O_2 und CO_2 im Abgas demonstrieren das Zusammenspiel photosynthetischer und respiratorischer Aktivitäten der Zellen während der Tag- und Nachtphase. Dies wird auch von anderen Autoren beschrieben [201]. Insgesamt erwies sich die pH gesteuerte Kohlenstoffdioxidzufuhr mit einem Grundfluss von $\dot{F}_{\text{CO}_2} = 1 \text{ ml min}^{-1}$ in Kombination mit der Ammoniaklösung als pH Stellmittel als erfolgreiche Strategie und resultierte über eine Prozesszeit von 20 d in gleichförmigen und stabilen Verläufe für die Größen pH, φ_{O_2} , φ_{CO_2} und \dot{F}_{CO_2} (siehe Abbildung 4.22).

Eine Übertragung des repetitiven Tag-Nacht-Chargenprozesses vom Labor- in den Pilotmaßstab wurde erfolgreich durchgeführt (vgl. Kapitel 4.4.2 und 4.4.3). Durch die Verwendung einer Ammoniaklösung als pH-Stellmittel war eine ausreichende Stickstoffversorgung sichergestellt. Im Pilotmaßstab wurde ein Proteinanteil von bis zu $q_p = 0,65 \text{ g g}^{-1}$ erzielt. Im Labormaßstab konnten maximale Anteile von bis zu $q_p = 0,63 \text{ g g}^{-1}$ erreicht werden. Eine Wiederholung des Chargenprozesses durch Entnahme eines Großteils der Kulturbrühe und Wiederauffüllung mit frischem Medium zeigte sich selbst in dem unsterilen Freilandexperiment als durchführbar. Allerdings war die Produktivität von $P_x = 0,238 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ im Chargenprozess und $P_x = 0,151 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ im repetitiven Chargenprozess gegenüber dem Laborversuch um 1,3fach und 2,0fach niedriger. Mögliche Ursachen hierfür könnten die vorherrschenden Temperaturschwankungen [61], eine verminderte Anzahl eindringender Photonen aufgrund der Biofilmbildung auf der Innenseite der Polyethylen-Tüte (Daten nicht gezeigt) oder eine Kontamination durch Fremdorganismen sein. Da Pflanzenzellen zur Akklimation an variierende Temperaturen befähigt sind [146], ist die Biofilmbildung höchstwahrscheinlich die Hauptursache für die verminderte Produktivität. Eine Kontaminationsgefahr ist aufgrund fehlender organischer Kohlenstoffquellen im Medium (siehe Tabelle A1) zwar reduziert, aufgrund einer Exkretion organischer Moleküle durch die Mikroalgen, abgestorbene Mikroalgenzellen die als organische Kohlenstoffquelle genutzt werden können oder mikroalgenfressende Parasiten allerdings nicht auszuschließen [210,211]. Der Anteil an bakteriellen Fremdorganismen wurde qualitativ mit Hilfe lichtmikroskopischer Aufnahmen untersucht und als gering eingestuft. Die erreichte Produktivität von $0,238 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ innerhalb einer Prozesszeit von 21 d ist mit zuvor publizierten Angaben für Freiland-Photobioreaktoren vergleichbar [61,72].

Die in Kapitel 4.4.1 und 4.4.2 beschriebenen Vorversuche fanden im Rührkesselreaktor statt. Obwohl der Rührkesselreaktor aufgrund der Möglichkeit zur Ausbildung eines homogenen Lichtfeldes definierte Wachstumsbedingungen gewährleistet und somit ein interessantes Instrument für wissenschaftliche Untersuchungen darstellt, ist ein solches System zur Kultivierung photoautotropher Mikroorganismen aufgrund der im Vergleich zum Plattenreaktor hohen Schichtdicke und der somit geringen Lichtverfügbarkeit nur bedingt geeignet (siehe Abbildung 3.1). So stehen bei $\text{PFD}_0 = 300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ für Biomassekonzentrationen von $c_x \geq 2,75 \text{ g L}^{-1}$ nach 2 cm Eindringtiefe so gut wie keine Photonen mehr zur Verfügung, da sämtliche Photonen bereits absorbiert wurden. Der Midi- und Maxi-Plattenreaktor mit Schichtdicken von 2 cm (vgl. Kapitel 3.1.6 und 3.1.7) sind für höhere Biomassekonzentrationen geeigneter. Mit dem Freiland-Plattenreaktor wurde ein weit verbreitetes Reaktorsystem ausgewählt [61,72,212], das aufgrund der Bauweise jedoch eine verhältnismäßig große Schichtdicke von 5 cm besitzt (siehe Kapitel 3.1.8). Neue Systeme mit dünneren Schichtdicken werden bereits angestrebt [213,214]. Im Rahmen dieser Arbeit stellte der verwendete Reaktortyp (siehe Kapitel 3.1.8) wegen der Vergleichbarkeit mit vorangegangenen Publikationen aber eine sinnvolle Wahl dar. Verglichen mit einem kontinuierlichen Prozess bietet der repetitive Chargenprozess eine alternative Strategie, um längere

Betriebszeiten zu ermöglichen bei gleichzeitiger Einsparung der Peripherie, wie beispielsweise Sensoren zur Messung der Transmission oder Turbidität sowie Zulaufpumpen und Medienflaschen, und stellt somit eine vielversprechende Prozessstrategie zur ökonomischen Produktion von Mikroalgenbiomasse dar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe verschiedener Prozessstrategien die makromolekulare Zellzusammensetzung photoautotropher Mikroorganismen während der Kultivierung erfolgreich manipuliert werden. Im Zentrum der Untersuchungen stand dabei, wie sich unterschiedliche Kultivierungsparameter, mit Hauptaugenmerk auf die Photonenflussdichte und die Substratkonzentration, im Labor- und Pilotmaßstab auswirken. Als Modellorganismus diente die Mikroalge *Chlorella vulgaris*. An diesem Stamm wurde der Einfluss der Licht-, Kohlenstoffdioxid- und Stickstoffverfügbarkeit auf das Wachstum und die Zellzusammensetzung unter idealisierten Wachstumsbedingungen in einem Rührkesselreaktor näher untersucht (siehe Kapitel 4.1.1). Es gelang, nicht nur die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit von *Chlorella vulgaris* in Abhängigkeit von einem limitierenden Substrat, sondern zusätzlich die Auswirkung des Substrates auf die stöchiometrische Grundzusammensetzung zu bestimmen. Im Bereich niedriger Biotrockenmassekonzentrationen von $c_X = 0,3 \text{ g L}^{-1}$ sind für eine optimale Prozessführung mit einer Wachstumsrate $\mu \geq 2 \text{ d}^{-1}$ eine minimale Photonenflussdichte von $\text{PFD}_0 = 200 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, ein CO_2 -Partialdruck von 0,5 kPa - bzw. ein CO_2 -Anteil des eintretenden Luftstroms von 0,5 % (v/v) - und eine Ammoniumkonzentration von mindestens $c(\text{NH}_4^+)_{\text{Zulauf}} = 20 \text{ mg L}^{-1}$ nötig. Für diesen Betriebspunkt ergibt sich eine Zellzusammensetzung mit einem Gesamtproteingehalt zwischen $q_P = 0,4$ und $0,5 \text{ g g}^{-1}$, einem Kohlenhydratgehalt zwischen $q_{\text{Kh}} = 0,2$ und $0,3 \text{ g g}^{-1}$ sowie einem Lipidgehalt zwischen $q_L = 0,1$ und $0,2 \text{ g g}^{-1}$. Ist eine höhere Proteinausbeute erwünscht, sollte die in Kapitel 4.3.5 beschriebene Strategie einer substratgesättigten Kultivierung bei gleichzeitiger Lichtlimitierung angewendet werden. Wird eine höhere Kohlenhydrat- oder Lipidausbeute verlangt, ist die in Kapitel 4.3.3 ausgeführte Strategie einer stickstofflimitierten Kultivierung zielführend. Der eigens zur Untersuchung von stickstoffgesättigtem und -limitiertem Wachstum etablierte kontinuierliche Luminostat-Prozess für *Chlorella vulgaris* konnte erfolgreich auf die Mikroalge *Nannochloropsis limnetica*, die Kieselalge *Phaeodactylum tricoratum* sowie das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. übertragen werden. Bei allen Stämmen führte, übereinstimmend mit publizierten Ergebnissen [33,148], ein Stickstoffmangel zu einer Speicherstoffakkumulation und eine ausreichende Stickstoffversorgung zu einer Proteinakkumulation. Die Übertragbarkeit des entwickelten Prozesses kann daher als bestätigt gelten.

Die Ergebnisse der Wachstumskinetik in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte und der Stickstoffverfügbarkeit für den Stamm *Chlorella vulgaris* sowie das aus Abbildung 2.2 abgeleitete metabolische Netzwerk wurden zur Erstellung eines strukturierten Modells genutzt, um photoautotrophes Wachstum zu simulieren. Das generierte Modell ist in der Lage, zellinterne Veränderungen der Zellzusammensetzung in einem Chargenprozess nach Eintritt einer Stickstofflimitierung mit Hilfe spezifischer Raten zu

beschreiben. Insgesamt wurden 16 spezifische Raten zur Darstellung der anabolen und katabolen Stoffwechselwege berechnet. Die bei den Simulationen erhaltenen Wachstumsverläufe stimmen sehr gut mit experimentell gewonnenen Daten überein. Im Mittel liegt die relative Streuung der geschätzten Parameterwerte unterhalb der unteren Schranke von 15 %. Das in Kapitel 2.1.2 bzw. 4.2.2 postulierte Zellmodell wird durch das Simulationsergebnis und die gemessenen Wachstumskinetiken (vgl. Kapitel 4.1) sowie durch die Ergebnisse der Luminostat-Versuche (vgl. Kapitel 4.3.5) unterstützt. Die makromolekulare Zellzusammensetzung wird maßgeblich von der Photonenflussdichte, der CO₂-Verfügbarkeit und der Stickstoffverfügbarkeit beeinflusst.

Die oben erwähnte Zunahme des Proteinanteils unter lichtlimitierten Wachstumsbedingungen konnte auf einen Anstieg der Anteile der Proteinkomplexe der Photosysteme zurückgeführt werden. Von 18 untersuchten Aminosäuren stimmen 12 Aminosäuren in ihrer prozentualen Zunahme zu über 80 % mit deren jeweiligen Anteil in den Proteinkomplexen der Photosysteme I und II überein. Die Erkenntnisse bestätigen Literaturangaben, nach welchen lichtlimitiertes Wachstum zu einer erhöhten Expression von Lichtsammelkomplexen führt [139,140]. Als Reaktorsystem wurde ein 8 L Plattenreaktor im kontinuierlichen Luminostat-Betrieb eingesetzt, siehe Kapitel 4.3.5. Ergänzend konnte, mit Hilfe von statistischer Versuchsplanung und -auswertung, ein Zusammenhang von Protein- und Chlorophyll-Zellquota nachgewiesen werden. Da die Pigmente der Lichtsammelkomplexe ebenfalls unter lichtlimitierten Bedingungen verstärkt exprimiert werden (vgl. Kapitel 5.1.1), ist die Aussage nachvollziehbar, dass unter lichtlimitierten Bedingungen der Proteingehalt der Zelle ansteigt. Die Medienkomponenten Ammoniumchlorid, Magnesiumsulfat und Eisensulfat zeigten einen signifikanten Einfluss auf den Protein- und Pigmentgehalt. Unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen wurde für *Chlorella vulgaris* als Maximum ein Proteinanteil von $q_P = 0,65 \text{ g g}^{-1}$ erreicht.

Zur genaueren Charakterisierung des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. wurde die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Licht- und Phosphatverfügbarkeit unter idealisierten Wachstumsbedingungen untersucht (siehe Kapitel 4.1.2). Es zeigte sich, dass eine minimale Photonenflussdichte von $PFD_0 = 46 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und eine Phosphatkonzentration von mindestens $c(\text{PO}_4^{3-})_{\text{Zulauf}} = 4,16 \text{ mg L}^{-1}$ eingestellt werden sollten, um unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine hohe Wachstumsrate von $\mu \geq 1,3 \text{ d}^{-1}$ zu garantieren. Eine quantitative Charakterisierung der Bedingungen, welche eine Akkumulation des Biopolymers Cyanophycin von bis zu $q_{CP} = 0,4 \text{ g g}^{-1}$ begünstigen, wurde mit Hilfe von Chargenprozessen in Plattenreaktoren verwirklicht. Vorausgehende Arbeiten konnten - wenn auch nur qualitativ - zeigen, dass *Synechocystis* sp. zur Anreicherung dieses Biopolymers unter Phosphatlimitierung fähig ist [20]. Neben dem spezifischen Phosphoranteil von $q_{P,X} < 4 \text{ mg g}^{-1}$, welcher eine erhöhte Cyanophycinsynthese induzierte, konnte der minimal notwendige Phosphoranteil von $q_{P,X} < 1 \text{ mg g}^{-1}$ bestimmt werden, bei welchem das stöchiometrische Limit erreicht wird und die Zellen das

Wachstum einstellen. Da die Zellen trotz phosphatlimitierten Wachstums bis $q_{p,x} > 1 \text{ mg g}^{-1}$ eine gleichbleibende PCE erreichten, kann außerdem davon ausgegangen werden, dass phosphatlimitiertes Wachstum keinen Stresszustand für *Synechocystis* sp. darstellt.

Um die Erkenntnisse aus dem Labormaßstab in den Pilotmaßstab zu übertragen, wurde eine Kultivierung in einem 230 L Freiland-Plattenreaktor durchgeführt. Als Prozessvariante wurde ein im Vergleich zu kontinuierlichen Prozessen ökonomisch sinnvollerer repetitiver Chargenprozess gewählt. Die wechselnden Bedingungen der Tag- und Nachtphasen und die damit verbundenen photosynthetischen und respiratorischen Zellaktivitäten stellen bei Freilandkultivierungen eine besondere Herausforderung dar. Die eintretenden pH Änderungen erforderten die Regelung des CO₂-Eintrags durch einen PI-Regler. Wie in vorausgegangenen Arbeiten [72] wurde durch die Kombination eines PI-Reglers mit einer Ammoniaklösung als pH Stellmittel außerdem eine Stickstofflimitierung erfolgreich vermieden. Mit dieser Strategie wurde bei *Chlorella vulgaris* ein Proteinanteil von bis zu $q_p = 0,63 \text{ g g}^{-1}$ im Labormaßstab (Kapitel 4.4.2) bzw. $q_p = 0,65 \text{ g g}^{-1}$ im Pilotmaßstab (Kapitel 4.4.3) erzielt. Über die Prozesszeit konnte ein zyklischer Verlauf der Zellzusammensetzung - bedingt durch die Tag- und Nachtphasen - beobachtet werden. In den Nachtphasen sank die Biotrockenmassekonzentration c_x um bis zu 10,0 % aufgrund respiratorischer Prozesse zur Energiebereitstellung [38,39].

Zusammengenommen wurden verschiedene Strategien entwickelt und verifiziert, die eine Manipulation der Synthese biologischer Makromoleküle durch photoautotrophe Mikroorganismen ermöglichen. Die Produktausbeute kann aktiv beeinflusst werden. Der Anteil essentieller Aminosäuren oder gesättigter Fettsäuren kann im Bereich stöchiometrischer Minima und Maxima verschoben werden; dies kommt den Wünschen der Futter- und Nahrungsmittelindustrie bezüglich einer gezielten Produktion physiologisch wertvoller Stoffgruppen entgegen. Kostengünstig wirkt sich die Möglichkeit einer Freilandkultivierung aus. Eine präzise Bestimmung von Wachstumskinetiken in Abhängigkeit von limitierenden Substraten kann einen essentiellen Beitrag für die Prozessentwicklung liefern, sofern produktrelevante zellinterne Regelkreise entsprechend berücksichtigt werden. Mess- und regelungstechnische Verfahren ermöglichen außerdem eine Automatisierung von Prozessen. Die quantitative Verfügbarkeit von Nährstoffen und Energielieferanten bestimmt sämtliche metabolischen Vorgänge in der Zelle und wirkt sich direkt auf die Wachstumsrate aus. Eine gezielte Prozessauslegung erfordert daher eine allumfassende quantitative Betrachtung der Abläufe in- und außerhalb einer Zelle.

7 AUSBLICK

Eine Erhöhung des Gesamtwirkungsgrads photoautotropher Produktionsprozesse könnte zukünftig durch maßgeschneiderte Prozessführungsstrategien, aber auch mit Hilfe optimierter Reaktorkonzepte realisiert werden [68,69,213–215]. Um die Produktausbeute eines Fermentationsprozesses zu erhöhen, ist es notwendig, die Stoffwechselforgänge photoautotropher Mikroorganismen genau zu kennen. Bis heute fehlen ausreichende experimentelle Daten. Obwohl es möglich ist, in kontinuierlich betriebenen Kulturen im quasistationären Zustand kinetische Wachstumsdaten und die jeweilige Zellzusammensetzung optimal zu bestimmen, wird dieses nur sehr selten durchgeführt. Oft fehlt es an mess- und regelungstechnischem Hintergrundwissen zur Automatisierung von Prozessen und dem dazugehörigen technischen Equipment. Ein Trend hin zu einer kontinuierlichen Prozessführung ist erkennbar [56,102]. Deshalb ist es nötig, die Untersuchungen in diesem Bereich voranzutreiben.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit sind ein Beispiel, wie essentiell kinetische Daten für die Entwicklung zukünftiger Prozessführungen sind. Der maximal erreichte Proteinanteil bei *Chlorella vulgaris* betrug $q_p = 0,65 \text{ g g}^{-1}$ und liegt sehr nahe an dem in der Literatur angegebenen Maximalwert von $q_p = 0,68 \text{ g g}^{-1}$ [216]. Demnach wurde die maximale Proteinausbeute nahezu erzielt. Eine Steigerung der Proteinbildung wäre nur noch durch eine genetische Modifizierung der Mikroalge möglich. Bei einem genetisch veränderten Stamm von *Chlamydomonas reinhardtii* wurde beispielsweise die rekombinante Proteinbildung so manipuliert, dass eine extrazelluläre Proteinsekretion stattfindet [217]. Dies erleichtert die Produktaufbereitung erheblich. Die Produktausbeute des Biopolymers Cyanophycin in *Synechocystis* sp. lässt sich noch steigern. So führt jeweils eine Limitierung von Phosphat oder auch von Sulfat und von Kalium oder die Zugabe von Chloramphenicol ebenfalls zu einer Cyanophycin-Akkumulation [20,108,218]. In Kombination mit einer maßgeschneiderten produktorientierten Prozessführung und einem passenden Reaktordesign birgt dies das Potential, den Protein- und Cyanophycingehalt zu steigern. Die Aufnahme weiterer Wachstumskinetiken und weitere Erkenntnisse über die makromolekulare Zellzusammensetzung könnten helfen, diesem Ziel näher zu kommen. Mit dem Konzept der Bioraffinerie [18], bei welchem eine ganzheitliche Betrachtung des Produktionsprozesses erfolgt, sollte zusätzlich eine höhere Wertschöpfung erzielbar sein.

Obwohl die Mikroalge *Chlorella vulgaris* alle essentiellen Aminosäuren enthält und damit ein hohes Potential besitzt, konventionelle Proteinquellen wie Sojabohnen zu ersetzen, stellt ein in der Regel notwendiger Zellaufschluss ein ökonomisches Hindernis dar. Dazu ist es zwingend nötig, schonende und rentable Extraktionsverfahren zu erschließen. Der positive Effekt von Mikroalgen als Futter- und Nahrungsmittelzusatz ist bereits bekannt [8,219]. Erkenntnisse zu zukünftigen Produktionsverfahren, um photoautotropher Mikroorganismen als Ressource einer nachhaltigen und biobasierten Wirtschaft zu

nutzen, können insbesondere durch modellgestützte Verfahren zur Beschreibung des Wachstums dieser Organismen gewonnen werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden stellen einen Anfang für weiterführende Vorgehensweisen dar.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J.N. Rosenberg, G.A. Oyler, L. Wilkinson, M.J. Betenbaugh, *Current Opinion in Biotechnology*, A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution, 2008, 19 (5), 430–436.
- [2] S. Albrecht, M. Gottschick, M. Schorling, S. Stirn, *GAIA-Ecological Perspectives for Science and Society*, Bioökonomie am Scheideweg Industrialisierung von Biomasse oder nachhaltige Produktion?, 2012, 21 (1), 33–37.
- [3] B. El-Chichakli, J. von Braun, C. Lang, D. Barben, J. Philp, *Nature*, Five cornerstones of a global bioeconomy, 2016, 535 (7611), 221–223.
- [4] M.R. Tredici, *Biofuels*, Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution, 2010, 1 (1), 143–162.
- [5] United Nations, *Concise Report on the World Population Situation in 2014*, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2014 (ST/ESA/SER.A/354).
- [6] H. Kroes, B. Kuepper, *Mapping the soy supply chain in Europe: A research paper prepared for WNF*, available at www.profundo.nl.
- [7] E.W. Becker, *Biotechnology Advances*, Micro-algae as a source of protein, 2007, 25 (2), 207–210.
- [8] E.W. Becker, *Microalgae for Human and Animal Nutrition*, in: Amos Richmond, Qiang Hu (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture*, John Wiley & Sons, Ltd, 2013, pp. 461–503.
- [9] S.M. Tibbetts, C.G. Whitney, M.J. MacPherson, S. Bhatti, A.H. Banskota, R. Stefanova, P.J. McGinn, *Algal Research*, Biochemical characterization of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for animal feed applications, 2015, 11, 435–447.
- [10] C. Posten, G. Schaub, *Journal of Biotechnology*, Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels--a process view, 2009, 142 (1), 64–69.
- [11] T.L. Chacón-Lee, G.E. González-Mariño, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Microalgae for “Healthy” Foods-Possibilities and Challenges, 2010, 9 (6), 655–675.
- [12] J.U. Grobbelaar, *Photosynthesis Research*, Microalgal biomass production: challenges and realities, 2010, 106 (1-2), 135–144.
- [13] N.-H. Norsker, M.J. Barbosa, M.H. Vermeë, R.H. Wijffels, *Biotechnology Advances*, Microalgal production - A close look at the economics, 2011, 29 (1), 24–27.
- [14] L. Wondraczek, M. Batentschuk, M.A. Schmidt, R. Borchardt, S. Scheiner, B. Seemann, P. Schweizer, C.J. Brabec, *Nature Communications*, Solar spectral conversion for improving the photosynthetic activity in algae reactors, 2013, 4.

- [15] A. Trautmann, B. Watzer, A. Wilde, K. Forchhammer, C. Posten, Algal Research, Effect of phosphate availability on cyanophycin accumulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and the production strain BW86, 2016, 20, 189–196.
- [16] C. Posten, Engineering in Life Sciences, Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae, 2009, 9 (3), 165–177.
- [17] D.E. Robertson, S.A. Jacobson, F. Morgan, D. Berry, G.M. Church, N.B. Afeyan, Photosynthesis Research, A new dawn for industrial photosynthesis, 2011, 107 (3), 269–277.
- [18] M. Fresewinkel, R. Rosello, C. Wilhelm, O. Kruse, B. Hankamer, C. Posten, Engineering in Life Sciences, Integration in microalgal bioprocess development, 2014, 14 (6), 560–573.
- [19] A. Schmid, J.S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, Nature, Industrial biocatalysis today and tomorrow, 2001, 409 (6817), 258–268.
- [20] B. Watzer, A. Engelbrecht, W. Hauf, M. Stahl, I. Maldener, K. Forchhammer, Microbial Cell Factories, Metabolic pathway engineering using the central signal processor PII, 2015, 14 (1), 192.
- [21] G. Renger, T. Renger, Photosynthesis Research, Photosystem II: The machinery of photosynthetic water splitting, 2008, 98 (1-3), 53–80.
- [22] R.E. Blankenship, Molecular Mechanisms of Photosynthesis, 2nd Edition, John Wiley & Sons, 2014.
- [23] F. Haraux, Y. de Kouchkovsky, Photosynthesis Research, Energy coupling and ATP synthase, 1998, 57.
- [24] G. Finazzi, G. Forti, Photosynthesis Research, Metabolic Flexibility of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* as Revealed by the Link between State Transitions and Cyclic Electron Flow, 2004, 82 (3), 327.
- [25] S. Eberhard, G. Finazzi, F.-A. Wollman, Annual Review of Genetics, The Dynamics of Photosynthesis, 2008, 42 (1), 463–515.
- [26] T. Quaas, S. Berteotti, M. Ballottari, K. Flieger, R. Bassi, C. Wilhelm, R. Goss, Plant Physiology meets Biodiversity, Non-photochemical quenching and xanthophyll cycle activities in six green algal species suggest mechanistic differences in the process of excess energy dissipation, 2015, 172, 92–103.
- [27] J.W. Kadereit, C. Körner, B. Kost, U. Sonnewald, Strasburger - Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften, 37th ed., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014.
- [28] N.R. Boyle, J.A. Morgan, BMC Systems Biology, Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*, 2009, 3, 4.
- [29] G.L. Zubay, Biochemistry, Wm. C. Brown, Dubuque, IA, 1998.

- [30] C. Buschmann, K. Grumbach, *Physiologie der Photosynthese*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1985.
- [31] A.M.J. Kliphuis, A.J. Klok, D.E. Martens, P.P. Lamers, M. Janssen, R.H. Wijffels, *Journal of Applied Phycology*, Metabolic modeling of *Chlamydomonas reinhardtii*: energy requirements for photoautotrophic growth and maintenance, 2012, 24 (2), 253–266.
- [32] P. Schlagermann, G. Göttlicher, R. Dillschneider, R. Rosello-Sastre, C. Posten, *Journal of Combustion*, Composition of algal oil and its potential as biofuel, 2012, Article ID 285185 (2012), 14.
- [33] A. Guccione, L. Rodolfi, N. Bassi, M.R. Tredici, *Biotechnology for Biofuels*, *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor, 2014, 7, 84.
- [34] Chmiel Horst (Ed.), *Bioprozesstechnik*, 3rd ed., Springer Spektrum, Heidelberg, 2011.
- [35] J.A. Raven, J. Beardall, *Carbohydrate Metabolism and Respiration in Algae*, in: A.W.D. Larkum, S.E. Douglas, J.A. Raven (Eds.), *Photosynthesis in Algae*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2003, pp. 205–224.
- [36] X. Johnson, J. Alric, *Eukaryotic Cell*, Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch, 2013, 12 (6), 776–793.
- [37] C. Baroukh, R. Munoz-Tamayo, J.-P. Steyer, O. Bernard, *PloS one*, DRUM: a new framework for metabolic modeling under non-balanced growth. Application to the carbon metabolism of unicellular microalgae, 2014, 9 (8), e104499.
- [38] T. Lacour, A. Sciandra, A. Talec, P. Mayzaud, O. Bernard, *Journal of Phycology*, Diel Variations of Carbohydrates and Neutral Lipids in Nitrogen-Sufficient and Nitrogen-Starved Cyclostat Cultures of *Isochrysis* sp., 2012, 48 (4), 966–975.
- [39] J.U. Grobbelaar, C.J. Soeder, *Journal of Plankton Research*, Respiration losses in planktonic green algae cultivated in raceway ponds, 1985, 7 (4), 497–506.
- [40] G. Torzillo, A. Sacchi, R. Materassi, A. Richmond, *Journal of Applied Phycology*, Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors, 1991, 3 (2), 103–109.
- [41] C. Baroukh, R. Munoz-Tamayo, J.-P. Steyer, O. Bernard, *Metabolic Engineering*, A state of the art of metabolic networks of unicellular microalgae and cyanobacteria for biofuel production, 2015, 30, 49–60.
- [42] C. Yang, Q. Hua, K. Shimizu, *Biochemical Engineering Journal*, Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions, 2000, 6 (2), 87–102.

- [43] C. Safi, B. Zebib, O. Merah, P.-Y. Pontalier, C. Vaca-Garcia, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review, 2014, 35, 265–278.
- [44] A. Richmond, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, John Wiley & Sons, 2008.
- [45] Q. Hu, M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, A. Darzins, *The Plant Journal For Cell and Molecular Biology*, Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, 2008, 54 (4), 621–639.
- [46] R.D. Simon, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Cyanophycin granules from the blue-green alga *Anabaena cylindrica*: a reserve material consisting of copolymers of aspartic acid and arginine, 1971 (68.2), 265–267.
- [47] K. Ziegler, R. Deutzmann, W. Lockau, *Zeitschrift für Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences*, Cyanophycin synthetase-like enzymes of non-cyanobacterial eubacteria: Characterization of the polymer produced by a recombinant synthetase of *Desulfitobacterium hafniense*, 2002, 57 (5-6), 522–529.
- [48] R.D. Simon, *Journal of Bacteriology*, Measurement of the Cyanophycin Granule Polypeptide Contained in the Blue-Green Alga *Anabaena cylindrica*, 1973, 114 (3), 1213–1216.
- [49] M.M. Allen, Hutchinson Frann, P.J. Weathers, *Journal of Bacteriology*, Cyanophycin granule polypeptide formation and degradation in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308, 1980 (141.2), 687–693.
- [50] D.P. Stephan, H.G. Ruppel, E.K. Pistorius, *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, Interrelation between cyanophycin synthesis, L-arginine catabolism and photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, 2000, 55 (11-12), 927–942.
- [51] A.H. Mackerras, de Chazal, N. M., G.D. Smith, *Journal of General Microbiology*, Transient accumulations of cyanophycin in *Anabaena cylindrica* and *Synechocystis* 6308, 1990, 136 (10), 2057–2065.
- [52] T. Hai, F.B. Oppermann-Sanio, A. Steinbüchel, *FEMS Microbiology Letters*, Purification and characterization of cyanophycin and cyanophycin synthetase from the thermophilic *Synechococcus* sp. MA19, 1999, 181 (2), 229–236.
- [53] G. Emig, E. Klemm, *Technische Chemie: Einführung in die chemische Reaktionstechnik*, 5th ed., Springer, Berlin, 2005.
- [54] R. Takors, *Kommentierte Formelsammlung Bioverfahrenstechnik*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014.
- [55] V.C. Hass, R. Pörtner, *Praxis der Bioprozesstechnik: Mit virtuellem Praktikum*, 2nd ed., Spektrum, Heidelberg, 2011.

- [56] B.D. Fernandes, A. Mota, J.A. Teixeira, A.A. Vicente, *Biotechnology Advances*, Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: Approaches, applications and future trends, 2015, 33 (6 Pt 2), 1228–1245.
- [57] J. Legrand (Ed.), *Advances in Chemical Engineering Photobioreaction Engineering*, Academic Press, 2016.
- [58] J. Pruvost, J.-F. Cornet, J. Legrand, *Chemical Engineering Science*, Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: An energetically consistent analysis, 2008, 63 (14), 3679–3694.
- [59] P. Bergmann, W. Trösch, *Algal Research*, Repeated fed-batch cultivation of *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 in flat-panel airlift photobioreactors with static mixers for improved light utilization: Influence of nitrate, carbon supply and photobioreactor design, 2016, 17, 79–86.
- [60] M. Cuaresma, M. Janssen, C. Vilchez, R.H. Wijffels, *Bioresource Technology*, Horizontal or vertical photobioreactors? How to improve microalgae photosynthetic efficiency, 2011, 102 (8), 5129–5137.
- [61] J. Wolf, E. Stephens, S. Steinbusch, J. Yarnold, I.L. Ross, C. Steinweg, A. Doebbe, C. Krolovitsch, S. Müller, G. Jakob, O. Kruse, C. Posten, B. Hankamer, *Algal Research*, Multifactorial comparison of photobioreactor geometries in parallel microalgae cultivations, 2016, 15, 187–201.
- [62] O. Bernard, *Journal of Process Control*, Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO₂ mitigation and biofuel production, 2011, 21 (10), 1378–1389.
- [63] M. Huesemann, B. Crowe, P. Waller, A. Chavis, S. Hobbs, S. Edmundson, M. Wigmosta, *Algal Research*, A validated model to predict microalgae growth in outdoor pond cultures subjected to fluctuating light intensities and water temperatures, 2016, 13, 195–206.
- [64] I.S. Suh, S.B. Lee, *Biotechnology and Bioengineering*, A light distribution model for an internally radiating photobioreactor, 2003, 82 (2), 180–189.
- [65] Y. Chisti, *Biotechnology Advances*, Biodiesel from microalgae, 2007, 25 (3), 294–306.
- [66] E. Sierra, F.G. Acién, J.M. Fernández, J.L. García, C. González, E. Molina, *Chemical Engineering Journal*, Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae, 2008, 138 (1-3), 136–147.
- [67] D.O. Hall, Fernández, F. G. Acién, E.C. Guerrero, K.K. Rao, Grima, E. Molina, *Biotechnology and Bioengineering*, Outdoor helical tubular photobioreactors for microalgal production: modeling of fluid-dynamics and mass transfer and assessment of biomass productivity, 2003, 82 (1), 62–73.

- [68] W. Blanken, M. Janssen, M. Cuaresma, Z. Libor, T. Bhajji, R.H. Wijffels, *Biotechnology and Bioengineering*, Biofilm growth of *Chlorella sorokiniana* in a rotating biological contactor based photobioreactor, 2014, 111 (12), 2436–2445.
- [69] F. Berner, K. Heimann, M. Sheehan, *Journal of Applied Phycology*, Microalgal biofilms for biomass production, 2015, 27 (5), 1793–1804.
- [70] K.M. Weyer, D.R. Bush, A. Darzins, B.D. Willson, *BioEnergy Research*, Theoretical Maximum Algal Oil Production, 2010, 3 (2), 204–213.
- [71] R. Bosma, J.H. de Vree, P.M. Slegers, M. Janssen, R.H. Wijffels, M.J. Barbosa, *Algal Research*, Design and construction of the microalgal pilot facility AlgaePARC, 2014, 6, 160–169.
- [72] Sven R. Steinbusch, Einfluss von Licht und Temperatur auf die Kultivierung von Mikroalgen - Auslegung und Betrieb von Freiland-Pilotanlagen zur Bestimmung prozessrelevanter Kinetiken. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2015.
- [73] C.G. Sinclair, B. Kristiansen, J.D. Bu'Lock, *Fermentationsprozesse: Kinetik und Modelling*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1993.
- [74] K. Schügerl, K.-H. Bellgardt (Eds.), *Bioreaction Engineering: Modeling and Control*, Springer Berlin, Berlin, 2013.
- [75] K.-H. Wolf, *Kinetik in der Bioverfahrenstechnik*, Behr's Verlag, Hamburg, 1991.
- [76] F.F. Blackman, *Annals of Botany*, Optima and limiting factors, 1905, os-19 (2), 281–296.
- [77] L. Michaelis, M.L. Menten, *Biochemische Zeitschrift*, Die Kinetik der Invertinwirkung, 1913, 49 (333-369), 352.
- [78] J. Monod, *Annual Review of Microbiology*, The growth of bacterial cultures, 1949, 3, 371–394.
- [79] S.J. Pirt, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, The maintenance energy of bacteria in growing cultures, 1965, 163 (991), 224–231.
- [80] A.G. Marr, E.H. Nilson, D.J. Clark, *Annals of the New York Academy of Sciences*, The maintenance requirement of *Escherichia coli*, 1963, 102 (3), 536–548.
- [81] N. van Uden, *Archives of Microbiology*, Transport-limited growth in the chemostat and its competitive inhibition; A theoretical treatment, 1967, 58 (2), 145–154.
- [82] K.L. Schulze, R.S. Lipe, *Archives of Microbiology*, Relationship between substrate concentration, growth rate, and respiration rate of *Escherichia coli* in continuous culture, 1964, 48 (1), 1–20.
- [83] R.J. Wallace, W.H. Holms, *FEMS Microbiology Letters*, Maintenance coefficients and rates of turnover of cell material in *Escherichia coli* ML308 at different growth temperatures, 1986, 37 (3), 317–320.
- [84] T.E. Shehata, A.G. Marr, *Journal of Bacteriology*, Effect of nutrient concentration on the growth of *Escherichia coli*, 1971, 107 (1), 210–216.

- [85] J.B.S. Haldane, Reprint by MIT, Cambridge, Enzymes. 1930, 1965,
- [86] S. Aiba, Growth kinetics of photosynthetic microorganisms, in: Microbial Reactions, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1982, pp. 85–156.
- [87] E. Lee, M. Jalalizadeh, Q. Zhang, Algal Research, Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review, 2015, 497–512.
- [88] J.F. Andrews, Biotechnol. Bioeng., A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates, 1968, 10 (6), 707–723.
- [89] M. Janssen, Chapter Four - Microalgal Photosynthesis and Growth in Mass Culture, in: J. Legrand (Ed.), Advances in Chemical Engineering Photobioreaction Engineering, Academic Press, 2016, pp. 185–256.
- [90] N.S. Panikov, Microbial growth kinetics, Chapman & Hall, London, 1995.
- [91] B. Dejaegher, Y.V. Heyden, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications, 2011, 56 (2), 141–158.
- [92] K. Siebertz, D. van Bebber, T. Hochkirchen, Statistische Versuchsplanung: Design of Experiments (DoE), Springer, Dordrecht, 2010.
- [93] P. Goos, B. Jones, Optimal design of experiments: A case study approach, Wiley, Hoboken, N.J., 2011.
- [94] D.B. Hibbert, Journal of Chromatography B, Experimental design in chromatography: A tutorial review, 2012, 910 (Supplement C), 2–13.
- [95] Gorman and Levine, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Cytochrome F and Plastocyanin: Their Sequence in the Photosynthetic Electron Transport Chain of *Chlamydomonas Reinhardi*, 1965 (54), 1665–1669.
- [96] S.H. Hutner, L. Provasoli, A. Schatz, C.P. Haskins, Proceedings of the American Philosophical Society, Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms, 1950, 94 (2), 152–170.
- [97] J.E. Mann, J. Myers, Journal of Phycology, On pigments, growth, and photosynthesis of *Phaeodactylum tricornutum*, 1968, 4 (4), 349–355.
- [98] R. Rippka, J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman, R.Y. Stanier, Journal of General Microbiology, Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria, 1979, 111 (1), 1–61.
- [99] M. Sobotka, A. Prokop, I.J. Dunn, A. Einsele, Review of Methods for the Measurement of Oxygen Transfer in Microbial Systems, in: G.T. Tsao, M.C. Flickinger, R.K. Finn, I.J. Dunn (Eds.), Annual reports on fermentation process, Academic Press, New York, New York, 1982, pp. 127–210.

- [100] P. Talbot, Gortares, M. P., Lencki, R. W., de la Noüe, J., *Biotechnology and Bioengineering*, Absorption of CO₂ in algal mass culture systems: A different characterization approach, 1991, 37 (9), 834–842.
- [101] W. Armstrong, *Advances in Botanical Research*, Aeration in Higher Plants, 1980, 7, 225–332.
- [102] M. Fresewinkel, Effizienzsteigerung mikroalgenbasierter Energiegewinnung durch Prozessintegration – Prozessauslegung und Modellierung der Glycolatproduktion und Konstruktion eines Biofilmreaktors. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2016.
- [103] A.R. Wellburn, *Journal of Plant Physiology*, The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution, 1994, 144 (3), 307–313.
- [104] E.W. Yemm, A.J. Willis, *Biochemical Journal*, The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone, 1954, 57 (3), 508–514.
- [105] A. Meiser, U. Schmid-Staiger, W. Trösch, *Journal of Applied Phycology*, Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornerutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor, 2004, 16 (3), 215–225.
- [106] G. Lepage, C.C. Roy, *Journal of Lipid Research*, Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification, 1984, 25 (12), 1391–1396.
- [107] I. Strug, C. Utzat, A. Cappione, S. Gutierrez, R. Amara, J. Lento, F. Capito, R. Skudas, E. Chernokalskaya, T. Nadler, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Development of a Univariate Membrane-Based Mid-Infrared Method for Protein Quantitation and Total Lipid Content Analysis of Biological Samples, 2014, 2014, 657079.
- [108] Y. Elbahloul, M. Krehenbrink, Reichelt Rodolf, A. Steinbüchel, *Applied and Environmental Microbiology*, Physiological conditions conducive to high cyanophycin content in biomass of *Acinetobacter calcoaceticus* strain ADP1, 2005 (71.2), 858–866.
- [109] L. Messineo, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Modification of the Sakaguchi reaction: Spectrophotometric determination of arginine in proteins without previous hydrolysis, 1966, 117 (3), 534–540.
- [110] S. Sakaguchi, *The Journal of Biochemistry*, Über eine neue Farbenreaktion von Protein und Arginin., 1925, 5 (1), 25–31.
- [111] M. Rodehutsord, M. Kapocius, R. Timmler, A. Dieckmann, *British Poultry Science*, Linear regression approach to study amino acid digestibility in broiler chickens, 2004, 45 (1), 85–92.
- [112] M. Rodehutsord, C. Ruckert, H.P. Maurer, H. Schenkel, W. Schipprack, K.E. Bach Knudsen, M. Schollenberger, M. Laux, M. Eklund, W. Siegert, R. Mosenthin, *Archives of Animal Nutrition*, Variation in chemical composition and physical characteristics of cereal grains from different genotypes, 2016, 70 (2), 87–107.

- [113] C. Naumann, R. Bassler, Die chemische Untersuchung von Futtermitteln, 3rd ed., VDLUFA-Verlag, Darmstadt, 2012.
- [114] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, Nucleic acids research, The protein data bank, 2000, 28 (1), 235–242.
- [115] The UniProt Consortium, Nucleic acids research, UniProt: the universal protein knowledgebase, 2017, 45 (D1), D158-D169.
- [116] P. Jordan, P. Fromme, H.T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krausz, Nature, Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, 2001, 411 (6840), 909–917.
- [117] A. Guskov, J. Kern, A. Gabdulkhakov, M. Broser, A. Zouni, W. Saenger, Nature Structural & Molecular Biology, Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, 2009, 16 (3), 334–342.
- [118] P. Artimo, M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi, E. de Castro, S. Duvaud, V. Flegel, A. Fortier, E. Gasteiger, A. Grosdidier, C. Hernandez, V. Ioannidis, D. Kuznetsov, R. Liechti, S. Moretti, K. Mostaguir, N. Redaschi, G. Rossier, I. Xenarios, H. Stockinger, Nucleic acids research, ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, 2012, 40 (Web Server issue), W597-603.
- [119] R. Dillschneider, C. Steinweg, R. Rosello-Sastre, C. Posten, Bioresource Technology, Biofuels from microalgae: Photoconversion efficiency during lipid accumulation, 2013, 142, 647–654.
- [120] J. Lunze, Regelungstechnik 1: Systemtheoretische Grundlagen, Analyse und Entwurf einschleifiger Regelungen, 10th ed., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014.
- [121] H. Unbehauen, Regelungstechnik I: Klassische Verfahren zur Analyse und Synthese linearer kontinuierlicher Regelsysteme, Fuzzy-Regelsysteme, 10th ed., Vieweg+Teubner Verlag; Imprint, Wiesbaden, 2000.
- [122] C.P. Majer, Parameterschätzung, Versuchsplanung und Trajektorienoptimierung für verfahrenstechnische Prozesse, VDI Verlag, Dusseldorf, 1998.
- [123] C. Posten, A. Munack, Proceedings of the American Control Conference, On-line application of parameter estimation accuracy to biotechnical processes, 1990, 2181–2186.
- [124] A.L. Stephenson, J.S. Dennis, C.J. Howe, S.A. Scott, A.G. Smith, Biofuels, Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks, 2014, 1 (1), 47–58.
- [125] A. Jacobi, C. Steinweg, R.R. Sastre, C. Posten, Engineering in Life Sciences, Advanced photobioreactor LED illumination system: Scale-down approach to study microalgal growth kinetics, 2012, 12 (6), 621–630.

- [126] C. Posten, U. Rinas, Control Strategies for High-Cell Density Cultivation of *Escherichia coli*, in: K. Schügerl, K.-H. Bellgardt (Eds.), *Bioreaction Engineering: Modeling and Control*, Springer Berlin, Berlin, 2013, pp. 374–390.
- [127] R. Dillschneider, C. Posten, *Energies*, A Linear Programming Approach for Modeling and Simulation of Growth and Lipid Accumulation of *Phaeodactylum tricornutum*, 2013, 6 (10), 5333–5356.
- [128] J.A. Raven, *New Phytologist*, The Energetics of Freshwater Algae; Energy Requirements for Biosynthesis and Volume Regulation, 1982, 92 (1), 1–20.
- [129] A.M. Illman, A.H. Scragg, S.W. Shales, *Enzyme and Microbial Technology*, Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium, 2000, 27 (8), 631–635.
- [130] E. Touloupakis, B. Cicchi, G. Torzillo, *Biotechnology for Biofuels*, A bioenergetic assessment of photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 in continuous cultures, 2015, 8, 133.
- [131] G.F. Wu, Q.Y. Wu, Z.Y. Shen, *Bioresource Technology*, Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, 2001, 76 (2), 85–90.
- [132] J.-W.F. Zijffers, K.J. Schippers, K. Zheng, M. Janssen, J. Tramper, R.H. Wijffels, *Marine Biotechnology* (New York, N.y.), Maximum Photosynthetic Yield of Green Microalgae in Photobioreactors, 2010, 12 (6), 708–718.
- [133] X.-G. Zhu, S.P. Long, D.R. Ort, *Current Opinion in Biotechnology*, What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass?, 2008, 19 (2), 153–159.
- [134] R. Goss, T. Jakob, *Photosynthesis Research*, Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae, 2010, 106 (1), 103–122.
- [135] J.C. Goldman, *Water Research*, Outdoor algal mass cultures—II. Photosynthetic yield limitations, 1979, 13 (2), 119–136.
- [136] F. Lehr, M. Morweiser, R. Rosello Sastre, O. Kruse, C. Posten, *Journal of Biotechnology*, Process development for hydrogen production with *Chlamydomonas reinhardtii* based on growth and product formation kinetics, 2012, 162 (1), 89–96.
- [137] M.J. Barbosa, M. Janssen, N. Ham, J. Tramper, R.H. Wijffels, *Biotechnology and Bioengineering*, Microalgae cultivation in air-lift reactors: modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency, 2003, 82 (2), 170–179.
- [138] J. Degen, A. Uebele, A. Retze, U. Schmid-Staiger, W. Trösch, *Journal of Biotechnology*, A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect: *Biochemical Engineering: Trends and Potentials*, 2001, 92 (2), 89–94.

- [139] O. Kruse, J. Rupprecht, J.H. Mussnug, G.C. Dismukes, B. Hankamer, *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, *Photosynthesis: a blueprint for solar energy capture and biohydrogen production technologies*, 2005, 4 (12), 957–970.
- [140] D.G. Durnford, J.A. Price, S.M. McKim, M.L. Sarchfield, *Physiologia Plantarum*, Light-harvesting complex gene expression is controlled by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms during photoacclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*, 2003, 118 (2), 193–205.
- [141] R.J. Geider, H.L. MacIntyre, T.M. Kana, *Marine Ecology Progress Series*, Dynamic model of phytoplankton growth and acclimation: Responses of the balanced growth rate and the chlorophyll a:carbon ratio to light, nutrient-limitation and temperature, 1997, 148 (1-3), 187–200.
- [142] R.J. Geider, H.L. MacIntyre, T.M. Kana, *Limnology and Oceanography*, A dynamic regulatory model of phytoplanktonic acclimation to light, nutrients, and temperature, 1998, 43 (4), 679–694.
- [143] S. Kosourov, G. Murukesan, J. Jokela, Y. Allahverdiyeva, *Plant and Cell Physiology*, Carotenoid Biosynthesis in *Calothrix* sp. 336/3: Composition of Carotenoids on Full Medium, During Diazotrophic Growth and After Long-Term H₂ Photoproduction, 2016, 57 (11), 2269–2282.
- [144] A. Dauta, J. Devaux, F. Piquemal, L. Boumnic, *Hydrobiologia*, Growth rate of four freshwater algae in relation to light and temperature, 1990, 207 (1), 221–226.
- [145] E. Bland, L.T. Angenent, *Bioresource Technology*, Pigment-targeted light wavelength and intensity promotes efficient photoautotrophic growth of Cyanobacteria, 2016, 216, 579–586.
- [146] W. Yamori, K. Hikosaka, D.A. Way, *Photosynthesis Research*, Temperature response of photosynthesis in C₃, C₄, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation, 2014, 119 (1-2), 101–117.
- [147] Govindjee, Carotenoids in Photosynthesis: An Historical Perspective, in: H.A. Frank, A.J. Young, G. Britton, R.J. Cogdell (Eds.), *The Photochemistry of Carotenoids*, Springer Netherlands, Dordrecht, 1999, pp. 1–19.
- [148] R. Dillschneider, *Die Effizienz der Kultivierung von Mikroalgen zur Biodieselgewinnung - Prozessentwicklung auf der Grundlage von Energiebilanzierung, Simulation und Integration modellprädiktiver Regelungskonzepte*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2014.
- [149] J.T. Novak, D.E. Brune, *Water Research*, Inorganic carbon limited growth kinetics of some freshwater algae, 1985, 19 (2), 215–225.
- [150] K. Lívanský, J. Doucha, *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, Influence of solar irradiance, culture temperature and CO₂ supply on daily course of O₂ evolution by *Chlorella* mass cultures in outdoor open thin-layer culture units, 1998, 89, 137–149.

- [151] H.J. Silva, S.J. Pirt, *Microbiology*, Carbon Dioxide Inhibition of Photosynthetic Growth of *Chlorella*, 1984, 130 (11), 2833–2838.
- [152] J.A. Raven, *Plant Cell Environ*, Physiology of inorganic C acquisition and implications for resource use efficiency by marine phytoplankton: Relation to increased CO₂ and temperature, 1991, 14 (8), 779–794.
- [153] J.L. Losh, J.N. Young, F.M.M. Morel, *New Phytologist*, Rubisco is a small fraction of total protein in marine phytoplankton, 2013, 198 (1), 52–58.
- [154] R. Geider, J. La Roche, *European Journal of Phycology*, Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis, 2002, 37 (1), 1–17.
- [155] A.-K. Bergström, A. Jonsson, M. Jansson, *Aquatic Biology*, Phytoplankton responses to nitrogen and phosphorus enrichment in unproductive Swedish lakes along a gradient of atmospheric nitrogen deposition, 2008, 4 (1), 55–64.
- [156] J. Marchetti, G. Bougaran, L. Le Dean, C. Mégrier, E. Lukomska, R. Kaas, E. Olivo, R. Baron, R. Robert, J.P. Cadoret, *Aquaculture*, Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries, 2012, 326–329, 106–115.
- [157] S. Aslan, I.K. Kapdan, *Ecological Engineering*, Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae, 2006, 28 (1), 64–70.
- [158] M.J. Griffiths, R.P. van Hille, S.T.L. Harrison, *Applied Microbiology and Biotechnology*, The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell composition in *Chlorella vulgaris*, 2014, 98 (5), 2345–2356.
- [159] M. Piorreck, K.-H. Baasch, P. Pohl, *Phytochemistry*, Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes, 1984, 23 (2), 207–216.
- [160] E.L. Sánchez-Alvarez, G. González-Ledezma, J.A. Bolaños Prats, J.L. Stephano-Hornedo, M. Hildebrand, *Algal Research*, Evaluating *Marinichlorella kaistiae* KAS603 cell size variation, growth and TAG accumulation resulting from rapid adaptation to highly diverse trophic and salinity cultivation regimes, 2017, 25, 12–24.
- [161] K. Bisova, V. Zachleder, *Journal of Experimental Botany*, Cell-cycle regulation in green algae dividing by multiple fission, 2014, 65 (10), 2585–2602.
- [162] J.P. Grover, *Limnology and Oceanography*, Phosphorus-dependent growth kinetics of 11 species of freshwater algae, 1989, 34 (2), 341–348.
- [163] L. Xin, H. Hong-ying, G. Ke, S. Ying-xue, *Bioresource Technology*, Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp, 2010, 101 (14), 5494–5500.

- [164] I. Málek, J. Hospodka, *Folia Microbiologica*, Continuous Cultivation of Microorganisms A Review, 1960, 5 (2), 120–139.
- [165] J. Pruvost, G. van Vooren, B. Le Gouic, A. Couzinet-Mossion, J. Legrand, *Bioresource Technology*, Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application, 2011, 102 (1), 150–158.
- [166] Grima, E. Molina, Camacho, F. García, Pérez, J. A. Sánchez, Sevilla, J. M. Fernández, Fernández, F. G. Ación, Gómez, A. Contreras, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture, 1994, 61 (2), 167–173.
- [167] Mandalam and Palsson, *Biotechnology and Bioengineering*, Elemental Balancing of Biomass and Medium Composition Enhances Growth Capacity in High-Density *Chlorella vulgaris* Cultures, 1998, 59 (5), 605–611.
- [168] G.R. Mirams, P. Pathmanathan, R.A. Gray, P. Challenor, R.H. Clayton, *The Journal of Physiology*, Uncertainty and variability in computational and mathematical models of cardiac physiology, 2016, 594 (23), 6833–6847.
- [169] D. Zhang, Chanona, Ehecatl Antonio Del-Rio, V.S. Vassiliadis, B. Tamburic, *Biotechnology and Bioengineering*, Analysis of green algal growth via dynamic model simulation and process optimization, 2015, 112 (10), 2025–2039.
- [170] H.-H. Yeoh, Y.-C. Wee, *Food Chemistry*, Leaf protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for 90 plant species, 1994, 49 (3), 245–250.
- [171] M.H. Huesemann, J. van Wageningen, T. Miller, A. Chavis, S. Hobbs, B. Crowe, *Biotechnology and Bioengineering*, A screening model to predict microalgae biomass growth in photobioreactors and raceway ponds, 2013, 110 (6), 1583–1594.
- [172] A. Jacobi, Optimierung der Lichtverteilung in Photobioreaktoren: Potentiale „Antennen-reduzierter“ Mikroalgen-Mutanten als biologischer Ansatz und transparenter Schwammstrukturen als technisches Konzept. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2012.
- [173] J.-F. Cornet, C.G. Dussap, J.-B. Gros, C. Binois, C. Lasseur, *Chemical Engineering Science*, A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors, 1995, 50 (9), 1489–1500.
- [174] S.J. Pirt, Y.-K. Lee, A. Richmond, M.W. Pirt, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, The photosynthetic efficiency of *Chlorella* biomass growth with reference to solar energy utilisation, 1980, 30 (1), 25–34.
- [175] H. Knoop, M. Gründel, Y. Zilliges, R. Lehmann, S. Hoffmann, W. Lockau, R. Steuer, C.V. Rao, *PLoS Comput Biol*, Flux Balance Analysis of Cyanobacterial Metabolism: The Metabolic Network of *Synechocystis* sp. PCC 6803, 2013, 9 (6), e1003081.

- [176] D.P. Maxwell, S. Falk, N.P.A. Huner, *Plant Physiology*, Photosystem II Excitation Pressure and Development of Resistance to Photoinhibition (I. Light-Harvesting Complex II Abundance and Zeaxanthin Content in *Chlorella vulgaris*), 1995, 107 (3), 687–694.
- [177] S. Arrivault, M. Guenther, A. Ivakov, R. Feil, D. Vosloh, J.T. van Dongen, R. Sulpice, M. Stitt, *The Plant Journal For Cell and Molecular Biology*, Use of reverse-phase liquid chromatography, linked to tandem mass spectrometry, to profile the Calvin cycle and other metabolic intermediates in *Arabidopsis* rosettes at different carbon dioxide concentrations, 2009, 59 (5), 826–839.
- [178] M. Piorreck, K.-H. Baasch, P. Pohl, *Phytochemistry*, Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids, and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes, 1983, 1984 (Vol. 23, No. 2), 207–216.
- [179] T. Shi, Y. Sun, P.G. Falkowski, *Environmental Microbiology*, Effects of iron limitation on the expression of metabolic genes in the marine cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* IMS101, 2007, 9 (12), 2945–2956.
- [180] L. Barsanti, P. Gualtieri, *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*, CRC press, (2014).
- [181] W.-B. Kong, S.-F. Hua, H. Cao, Y.-W. Mu, H. Yang, H. Song, C.-G. Xia, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, Optimization of mixotrophic medium components for biomass production and biochemical composition biosynthesis by *Chlorella vulgaris* using response surface methodology, 2012, 43 (3), 360–367.
- [182] J. Wolf, I.L. Ross, K.A. Radzun, G. Jakob, E. Stephens, B. Hankamer, *Algal Research*, High-throughput screen for high performance microalgae strain selection and integrated media design, 2015, 11, 313–325.
- [183] C.-Y. Chen, P.-J. Lee, C.H. Tan, Y.-C. Lo, C.-C. Huang, P.L. Show, C.-H. Lin, J.-S. Chang, *Biotechnology Journal*, Improving protein production of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E by photobioreactor design and cultivation strategies, 2015, 10 (6), 905–914.
- [184] D. Bilanovic, A. Andargatchew, T. Kroeger, G. Shelef, *Energy Conversion and Management*, Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations – Response surface methodology analysis, 2009, 50 (2), 262–267.
- [185] Y. Collos, P.J. Harrison, *Marine Pollution Bulletin*, Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae, 2014, 80 (1), 8–23.
- [186] Z. Ikaran, S. Suárez-Alvarez, I. Urreta, S. Castañón, *Algal Research*, The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *chlorella vulgaris* var L3, 2015, 10 (Supplement C), 134–144.

- [187] I. Freire, A. Cortina-Burgueño, P. Grille, M.A. Arizcun, E. Abellán, M. Segura, F.W. Sousa, A. Otero, Aquaculture, *Nannochloropsis limnetica*: A freshwater microalga for marine aquaculture, 2016, 459 (Supplement C), 124–130.
- [188] T. Chrismadha, M.A. Borowitzka, Journal of Applied Phycology, Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricorutum* grown in a tubular photobioreactor, 1994, 6 (1), 67–74.
- [189] S.G. Hays, D.C. Ducat, Photosynthesis Research, Engineering cyanobacteria as photosynthetic feedstock factories, 2015, 123 (3), 285–295.
- [190] Y. Li, M. Horsman, B. Wang, N. Wu, C.Q. Lan, Applied Microbiology and Biotechnology, Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*, 2008, 81 (4), 629–636.
- [191] T. Fisher, J. Minnaard, Z. Dubinsky, Journal of Plankton Research, Photoacclimation in the marine alga *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyte): A kinetic study, 1996, 18 (10), 1797–1818.
- [192] P. Přibyl, V. Cepák, V. Zachleder, Journal of Applied Phycology, Production of lipids and formation and mobilization of lipid bodies in *Chlorella vulgaris*, 2013, 25 (2), 545–553.
- [193] G. Breuer, P.P. Lamers, D.E. Martens, R.B. Draaisma, R.H. Wijffels, Bioresource Technology, The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains, 2012, 124 (Supplement C), 217–226.
- [194] A.D. Martino, A. Meichenin, J. Shi, K. Pan, C. Bowler, Journal of Phycology, Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) accessions, 2007, 43 (5), 992–1009.
- [195] A. Kornberg, N.N. Rao, D. Ault-Riché, Annual Review of Biochemistry, Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions, 1999, 68, 89–125.
- [196] J.L. Collier, A.R. Grossman, The EMBO Journal, A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria, 1994, 13 (5), 1039–1047.
- [197] S.E. Stevens, D.A.M. Paone, Plant Physiology, Accumulation of cyanophycin granules as a result of phosphate limitation in *Agmenellum quadruplicatum*, 1981, 67 (4), 716–719.
- [198] F. Guerrero, V. Carbonell, M. Cossu, D. Correddu, P.R. Jones, PloS one, Ethylene synthesis and regulated expression of recombinant protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803, 2012, 7 (11), e50470.
- [199] F. Lehr, Wasserstoff-Erzeugung mit Mikroalgen - Prozessintensivierung durch integrierte Verfahrensentwicklung. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2012.
- [200] H. Torabizadeh, World Academy of Science, Engineering and Technology, All proteins have a basic molecular formula, 2011, 78.

- [201] B. Tamburic, C.R. Evenhuis, D.J. Suggett, A.W.D. Larkum, J.A. Raven, P.J. Ralph, *ChemSusChem*, Gas Transfer Controls Carbon Limitation During Biomass Production by Marine Microalgae, 2015, 8 (16), 2727–2736.
- [202] M. Berenguel, F. Rodríguez, F.G. Acién, J.L. García, *Journal of Process Control*, Model predictive control of pH in tubular photobioreactors, 2004, 14 (4), 377–387.
- [203] A.W. Mayo, *Water Environment Research*, Effects of Temperature and pH on the Kinetic Growth of Unialga *Chlorella vulgaris* Cultures Containing Bacteria, 1997, 69 (1), 64–72.
- [204] T.D. Brock, *Science*, Lower pH Limit for the Existence of Blue-Green Algae: Evolutionary and Ecological Implications, 1973, 179 (4072), 480–483.
- [205] J.W. Rachlin, A. Grosso, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, The effects of pH on the growth of *Chlorella vulgaris* and its interactions with cadmium toxicity, 1991, 20 (4), 505–508.
- [206] M.R. Badger, *Journal of Experimental Botany*, CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution, 2003, 54 (383), 609–622.
- [207] M. Giordano, J. Beardall, J.A. Raven, *Annual review of plant biology*, CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution, 2005, 56, 99–131.
- [208] J.A. Raven, F.A. Smith, *Canadian Journal of Botany*, Significance of hydrogen ion transport in plant cells, 1974, 52 (5), 1035–1048.
- [209] R.H. Foy, R.V. Smith, *British Phycological Journal*, The role of carbohydrate accumulation in the growth of planktonic *Oscillatoria* species, 2007, 15 (2), 139–150.
- [210] J.A. Hellebust, *Limnology and Oceanography*, Excretion of Some Organic Compounds by Marine Phytoplankton, 1965, 10 (2), 192–206.
- [211] M.M. Loera-Quezada, M.A. Leyva-González, G. Velázquez-Juárez, L. Sanchez-Calderón, M. Do Nascimento, D. López-Arredondo, L. Herrera-Estrella, *Plant Biotechnol J*, A novel genetic engineering platform for the effective management of biological contaminants for the production of microalgae, 2016, 14 (10), 2066–2076.
- [212] F.G. Acién Fernández, J.M. Fernández Sevilla, E. Molina Grima, *Rev Environ Sci Biotechnol*, Photobioreactors for the production of microalgae, 2013, 12 (2), 131–151.
- [213] J. Pruvost, F. Le Borgne, A. Artu, J. Legrand, *Algal Research*, Development of a thin-film solar photobioreactor with high biomass volumetric productivity (AlgoFilm©) based on process intensification principles, 2017, 21, 120–137.
- [214] I. Dogaris, M. Welch, A. Meiser, L. Walmsley, G. Philippidis, *Bioresource Technology*, A novel horizontal photobioreactor for high-density cultivation of microalgae, 2015, 198, 316–324.

- [215] C. Posten, A. Jacobi, C. Steinweg, F. Lehr, R. Rosello (Karlsruher Institut Für Technologie (KIT)) EP2388310 A1, 2011.
- [216] C. Posten, S. Feng Chen, Microalgae biotechnology, Springer, Cham, 2016.
- [217] K.J. Lauersen, H. Berger, J.H. Mussnug, O. Kruse, Journal of Biotechnology, Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*, 2013, 167 (2), 101–110.
- [218] R.D. Simon, Archiv für Mikrobiologie, The effect of chloramphenicol on the production of cyanophycin granule polypeptide in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*, 1973, 92 (2), 115–122.
- [219] GICON Großmann Ingenieur Consult GmbH, Mikroalgen als Futtermittel: Einsatz von GICON®-Photobioreaktor führt zu Produktionssteigerung bei Hühnern. 1/2016, in: GICONcret.

ANHANG

A1 Studentische Abschlussarbeiten

Lucas Jakob: Etablierung eines PI-Reglers zur Kultivierung phototropher Organismen in Photobioreaktoren, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorthesis 2014

Maximilian Wyrwoll: Medienuntersuchung und Medienoptimierung zur Steigerung der Proteinbildung von *Chlorella vulgaris* für die Kultivierung in Photobioreaktoren, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorthesis 2015

Lara Stelmaszyk: Kultivierung von *Synechocystis* unter Phosphatlimitierung in 11-Photobioreaktoren zur Steigerung der Cyanophycin-Synthese, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorthesis 2015

Christian Sickinger: Erstellung eines Modells zur Simulierung des Wachstums und der Proteinbildung von *Chlorella vulgaris* bei photoautotropher Kultivierung, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorthesis 2015

Eva Heymann: Optimierung der Cyanophycinproduktion in *Synechocystis* durch Variation der Phosphatkonzentration und der Photonenflussdichte, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorthesis 2015

Orsolya Hamusics: Cultivation of *Synechocystis* for enhanced process understanding and process development for the production of Cyanophycin, Budapest University of Technology and Economics, Masterthesis 2016

Kirsten Ullmann: Entwicklung eines Prozesses zur Gewinnung von Proteinen aus *Chlorella vulgaris* unter photoautotrophen Bedingungen, Technische Universität Braunschweig, Masterthesis 2016

Caren Heyer: Kultivierung von Mikroalgen im Labor- und Pilotmaßstab zur Produktion von Proteinen in Photobioreaktoren, Karlsruher Institut für Technologie, Masterthesis 2016

Jonathan Petersen: Construction of a MATLAB/Simulink model to simulate growth and protein formation in *Chlorella vulgaris*, Karlsruhe Institute of Technology, Bachelorthesis 2016

Ingrida Melková: Kultivierung von Mikroalgen in Photobioreaktoren zur Produktion von Proteinen im Labor- und Pilotmaßstab, Karlsruher Institut für Technologie, Masterthesis 2017

Sören Barthel: Modellierung des Wachstums und der makromolekularen Zellstöchiometrie von *Chlorella vulgaris* in einem photoautotrophen Fermentationsprozess, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorthesis 2017

A2 Material und Methoden

A2.1 Medien

Tabelle A1: Zusammensetzung der verwendeten „TP“ Medien für *Chlorella vulgaris* basierend auf dem TAP Medium von Gorman und Levin [95] und Hutner [96]. Der pH Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

Lösung	Komponente	Konzentration im Medium [g L ⁻¹]		
		1xTP	2,5xTP	TP _{mod.}
P-Lösung	K ₂ HPO ₄	0,108	0,270	0,288
	KH ₂ PO ₄	0,054	0,135	0,144
Hutner's Trace	EDTA-Na ₂	0,100	0,250	0,200
	H ₃ BO ₃	0,023	0,057	0,046
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,044	0,110	0,088
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,010	0,026	0,020
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,010	0,025	0,020
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,003	0,008	0,006
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,003	0,008	0,006
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	0,002	0,006	0,004
TP Salze	NH ₄ Cl	0,375	0,938	3,400
	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	0,155
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,100	0,250	0,288
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,050	0,125	0,050

Tabelle A2: Zusammensetzung der verwendeten Medien für *Phaeodactylum tricorutum* basierend auf dem M&M Medium nach Mann und Myers [97]. Der pH Wert wurde auf 7,7 eingestellt.

Lösung	Komponente	Konzentration im Medium [g L ⁻¹]	
		M&M	M&M -N
Medium	NaCl	27,00	27,69
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,60	0,60
	KCl	0,60	0,60
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,40	0,40
	NaNO ₃	1,00	-
	K ₂ HPO ₄	0,15	0,15
	Na ₂ SiO ₃ x 5 H ₂ O	0,03	0,03
Spurenelemente	EDTA-Na ₂	0,03	0,03
	H ₃ BO ₃	0,006	0,006
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,002	0,002

ANHANG

$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,002202	0,002202
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,00033	0,00033
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,000007	0,000007
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,000002	0,000002

Tabelle A3: Zusammensetzung der verwendeten Medien für *Nannochloropsis limnetica* und *Synechocystis* sp. basierend auf dem BG-11 Medium nach Rippka et al. [98]. Der pH Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

Lösung	Komponente	Konzentration im Medium [g L^{-1}]		
		BG ¹¹ ₀	BG ¹¹ 5xP	BG ¹¹ 5xP -N
Medium	NaNO_3	1,5	1,5	-
	NaCl	-	-	1,0314
	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$	0,04	0,2	0,2
	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,075	0,075	0,075
	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,036	0,036	0,036
	Citronensäure	0,006	0,006	0,006
	Eisen(III)-Citrat	0,006	0,006	0,006
	EDTA- Na_2	0,001	0,001	0,001
	Na_2CO_3	0,04	0,04	0,04
	Spurenelemente	H_3BO_3	0,00286	0,00286
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$		0,00181	0,00181	0,00181
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$		0,00022	0,00022	0,00022
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$		0,00039	0,00039	0,00039
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$		0,000079	0,000079	0,000079
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$		0,000078	0,000078	0,000078

A2.2 Korrelation von optischer Dichte und der Biomassekonzentration

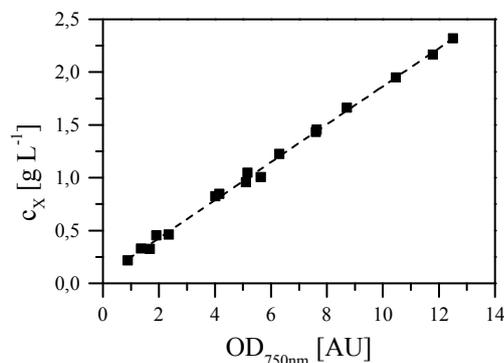


Abbildung A1: Korrelation zwischen optischer Dichte bei einer Wellenlänge von 750 nm $\text{OD}_{750\text{nm}}$, (Lambda 35, Perkin Elmer) und der gravimetrisch ermittelten Biomassekonzentration c_x für *Synechocystis* sp. PCC6803 mit $y = 0,179 \cdot x$ und $R^2 = 0,997$.

A2.3 Kalibrierung der LED-Module des Rührkesselreaktors

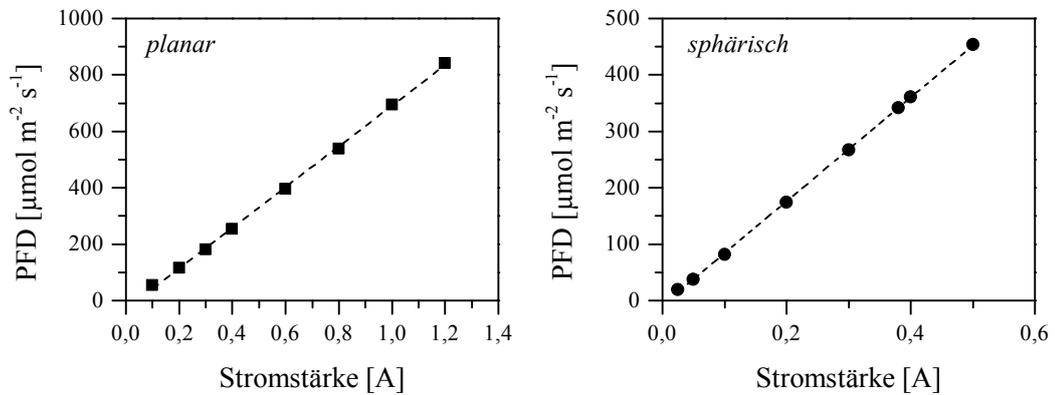


Abbildung A2: Kalibrierung der LED-Module des Rührkesselreaktors mit dem planaren Sensor (LI-250, LI-Cor, USA) hinter dem Glaszylinder mit $y = 720,54 \cdot x - 29,89$ und $R^2 = 0,999$ (links) sowie dem sphärischen Sensor (QSL-2101, Biospherical Instruments) in einer *Chlorella vulgaris* Kultursuspension ($c_x = 0,3 \text{ g L}^{-1}$) mit $y = 920,35 \cdot x - 8,01$ und $R^2 = 0,999$ (rechts).

A2.4 RI-Fließbilder Plattenreaktoren

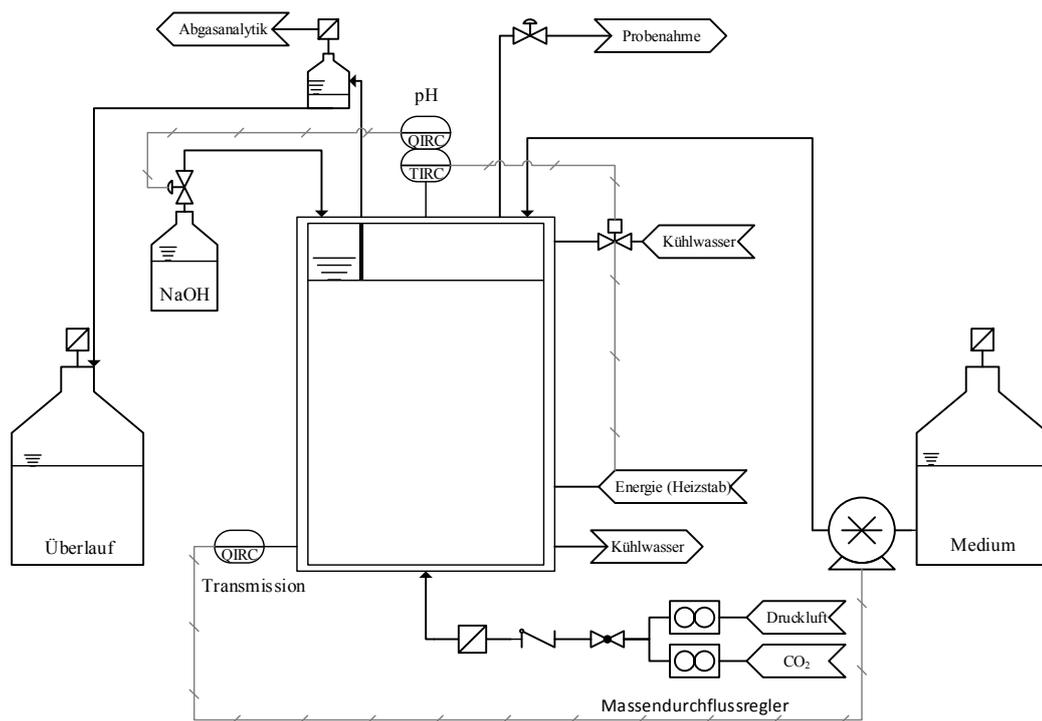


Abbildung A3: RI-Fließbild des Versuchsaufbaus im Midi-Plattenreaktor bei kontinuierlicher Prozessführung (Luminostat). Der mit CO_2 angereicherte Luftstrom wird über Massendurchflussregler geregelt und gelangt durch ein Ventil, ein Rückschlagventil und einen Sterilfilter in den Reaktor. Die Temperierung erfolgt durch einen Kühlkreislauf und ein Heizelement. Die pH-Regelung erfolgt durch Laugenzugabe. Ein Steigrohr sorgt für einen konstanten Füllstand; überschüssige Kulturbrühe wird mittels Überdruck durch den Ablauf über die Abluftflasche in eine Sammelflasche (Überlauf) gefördert. Der Medienzulauf wird anhand der Transmission geregelt.

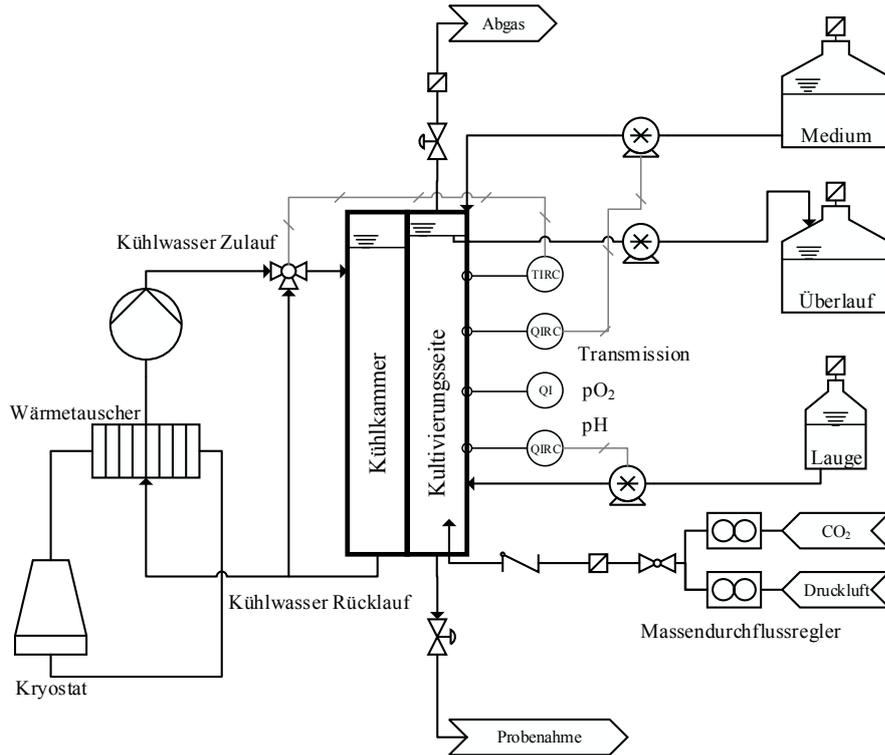


Abbildung A4: RI-Fließbild des Versuchsaufbaus im Maxi-Plattenreaktor in kontinuierlicher Prozessführung (Luminostat). Der mit CO₂ angereicherte Luftstrom wird über Massendurchflussregler geregelt und gelangt durch ein Ventil, ein Rückschlagventil und einen Sterilfilter in den Reaktor. Die Temperierung erfolgt durch einen Kühlkreislauf und die pH Regelung durch Laugenzugabe. Ein Steigrohr sorgt für einen konstanten Füllstand durch Abpumpen der Kulturbrühe mit einer konstanten Pumprate in den Sammelbehälter (Überlauf). Der Medienzulauf wird anhand der Transmission geregelt.

A2.5 Sprungantworten PI-Regler

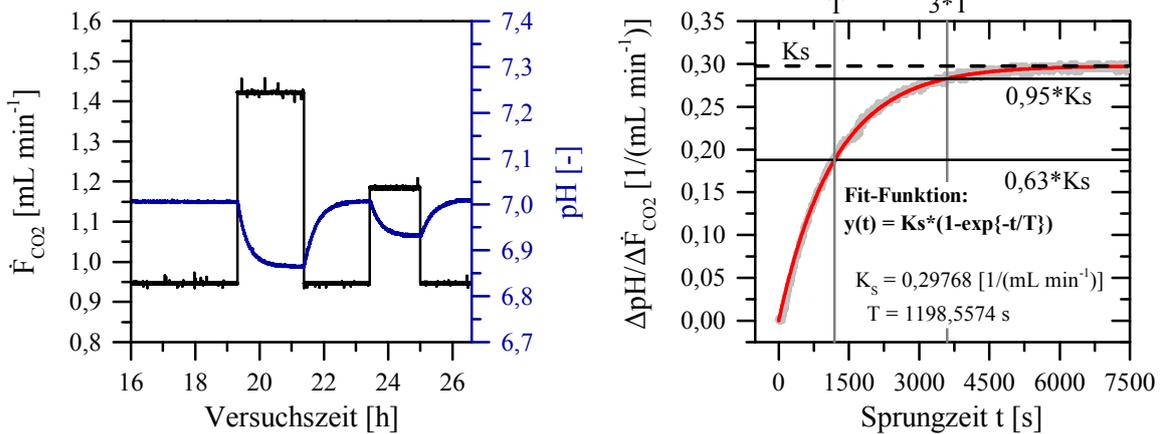


Abbildung A5: Sprungversuche in deionisiertem Wasser einer Stellwertänderung des CO₂-Volumenstroms \dot{F}_{Zulauf} und den Verlauf des pH-Signals im Rührkesselreaktor (links) sowie eine Approximation der Sprungantwort des Sprungs zwischen 19,3 h und 20,3 h mit der Modellgleichung eines PT₁-Glieds, $R^2 = 0,9975$, inklusive Kontrolle der Approximation mittels 63% und 95% Methode (rechts).

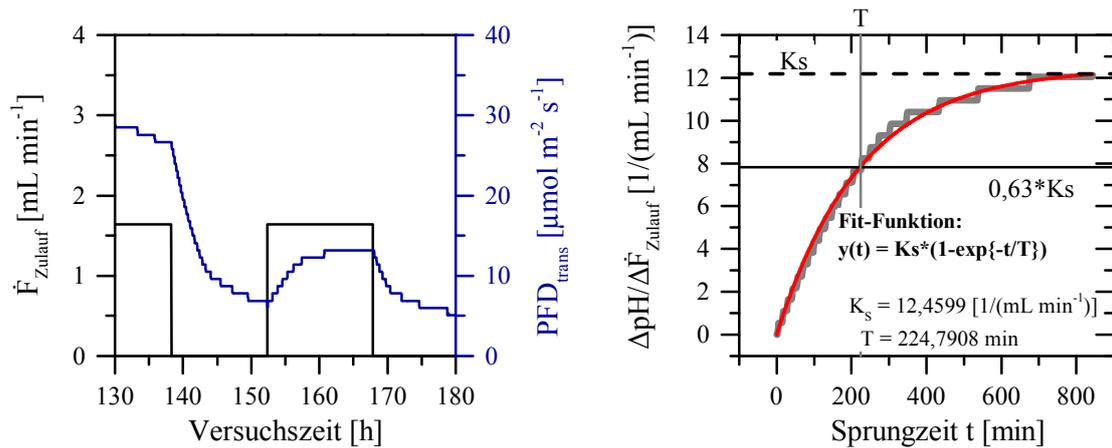


Abbildung A6: Sprungversuche mit *Chlorella vulgaris* in dem Midi-Plattenreaktor mit einer Stellwertänderung der Pumprate an zugeführtem Medium \dot{F}_{Zulauf} und dem Verlauf der Transmission $\text{PFD}_{\text{trans}}$ (links) sowie eine Approximation der Sprungantwort des Sprungs zwischen 138 h und 152 h mit der Modellgleichung eines PT₁-Glieds, $R^2 = 0,9951$, inklusive Kontrolle der Approximation mittels 63% Methode (rechts).

A2.6 Cyanophycin-Extraktion und -Quantifizierung

Extraktion

(i) Zellaufschluss

- 15 mL Kulturlösung für 15 min bei 11000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Zugabe von 1 mL Aceton, resuspendieren mittels Vortexer
- Inkubation im Thermoschüttler für 30 min bei 900 rpm und 25°C

(ii) Abtrennung von Zellbestandteilen und Proteinen

- Zentrifugieren für 15 min bei 11000 rpm und 4°C, Überstand verwerfen
- Pellet in 1 mL Aceton resuspendieren, zentrifugieren (s.o.), Überstand verwerfen
- Pellet in 1,2 ml 0,1 M HCl resuspendieren, auf Thermoschüttler für 1 h bei 900 rpm und 60 °C inkubieren
- Zentrifugieren für 10 min bei 11000 rpm und 4°C, Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen

(iii) Cyanophycin-Fällung

- 720 μL Tris/HCl, pH 8,0, zugeben, pH-Wert überprüfen (pH 7 - 8)
- Ggf. pH-Wert mit 0,1 M NaOH oder 0,1 M HCl korrigieren
- Inkubation für 40 min bis 24 h bei 4°C, anschließend zentrifugieren für 15 min bei 11000 rpm und 4°C
- Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen, ggf. Cyanophycin-Fällung mit Überstand wiederholen
- Zur Quantifizierung das Cyanophycin-Pellet in 3x 166 μL 0,1 M HCl lösen und zentrifugieren (s.o.)

Quantifizierung

(i) Reagenzien

- Lösung A 300 mg KI (Kaliumiodid) in 100 mL deion. H₂O
- Lösung B* 100 mL 5 M KOH
+ 2 g Natriumkaliumtartrat
+ 0,1 g 2,4-Dichloro-1-Naphthol

- + 180 mL Ethanol absolut
- Kalibrierlösung B 10 mL 5 M KOH
 + 0,01 g 2,4-dichloro-1-naphthol
 + 18 mL absolute Ethanol
- Lösung C 3% NaOCl (v/v) herstellen aus 12% NaOCl, verdünnt mit deion. H₂O (1:4)

(ii) Herstellung der Reagenz „Lösung B kalibriert“

- Verdünnungsreihe einer 4 - 6 %igen NaOCl Lösung herstellen: 1:1, 1:1,25, 1:1,66, 1:2, 1:2,5, 1:5, 1:7,5, 1:10, 1:12,5, 1:15
- 250 µL jeder Verdünnungsstufe zu 750 µL Kalibrierlösung B geben und bei einer optischen Dichte von 400 nm vermessen, vgl. Abbildung A7
- Lösung B kalibriert herstellen**:
 750 µL Lösung B
 + 250 µL der verdünnten 4 - 6 %igen NaOCl Lösung mit maximaler

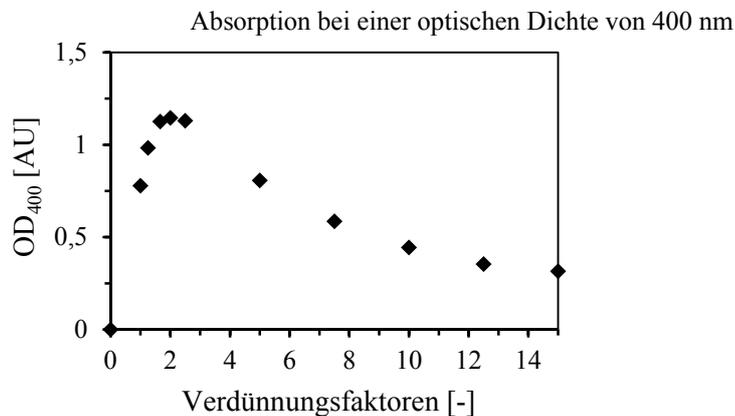


Abbildung A7: Optische Dichten bei einer Wellenlänge von 400 nm (OD₄₀₀) der verdünnten 4 - 6 %igen NaOCl Lösung zur Ermittlung der optimalen NaOCl-Konzentration.

(ii) Eichgerade & Quantifizierung

- 100 mL einer L-Arginin Stocklösung herstellen: 100 mg L-Arginin auf 100 mL deion. H₂O
- Verdünnungsreihe herstellen: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10, 1:16, 1:20, 1:40
- 166 µL von jeder Verdünnungsstufe bzw. Cyanophycin-Probe in neues Reaktionsgefäß überführen
- 166 µL von Lösung A und 1000 µL von „Lösung B kalibriert“ hinzugeben
- Für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren
- 50 µL Lösung C hinzugeben, Gemisch in Küvetten überführen und für genau 10 min inkubieren
- Bei einer optischen Dichte von 520 nm vermessen

* Herstellung Lösung B: Feststoffe vorlegen, Wägeschälchen mit KOH ausspülen, restliches KOH zugeben und rühren bis Feststoffe nahezu gelöst, Ethanol zugeben und rühren bis Feststoffe in Lösung; wenn Lösung B nach längerer Standzeit rote Schlieren aufweist muss diese neu hergestellt werden

** "Lösung B kalibriert" muss nach Zugabe der verdünnten NaOCl Lösung von einer rötlichen zurück zu einer gelblichen Färbung, Wartezeit 15 min

A2.7 Design of Experiments

Tabelle A4: Untersuchte Faktoren für das Fractional Factorial Design mit Codierung der Faktorlevel in g L⁻¹.

Faktor	Codierung: Faktorlevel [g L ⁻¹]		
	+	-	0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,8	0,2	0,5
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05	0,01	0,03
PO ₄ ³⁻	0,486	0,162	0,324
NH ₄ Cl	1,5	0,75	1,125
NaCl	7,5	0	3,75

Tabelle A5: Versuchsmatrix des für das Fractional Factorial Design mit 5 Faktoren und 2 Center Points.

Versuchsnummer	Faktoren und Faktorlevel				
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	PO ₄ ³⁻	NH ₄ Cl	NaCl
1	0	0	0	0	0
2	-	-	+	+	-
3	+	+	-	-	-
4	-	-	-	-	+
5	-	+	+	-	+
6	-	+	-	+	-
7	+	+	+	+	+
8	+	-	+	-	-
9	+	-	-	+	+
10	0	0	0	0	0

Tabelle A6: Versuchsmatrix des RSM-Designs basierend auf den als signifikant eingestuftem Mengenelementen des Fractional Factorial Designs, mit zugehörigen Konzentrationen in g L⁻¹.

Versuchsnummer	Faktorkonzentration [g L ⁻¹]		
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	NH ₄ Cl
1	0,5	0,06825	5
2	1,2	0,03	3,1
3	1,2	0,055	5
4	0,85	0,055	1,2
5	0,85	0,03	1,2
6	0,85	0,08	3,974
7	0,5	0,08	1,2
8	0,85	0,055	3,1
9	1,2	0,08	1,2
10	0,85	0,055	3,1
11	0,5	0,03	3,1
12	0,85	0,03	5

A3 Ergebnisse

A3.1 Beeinflussung einzelner Zellbestandteile

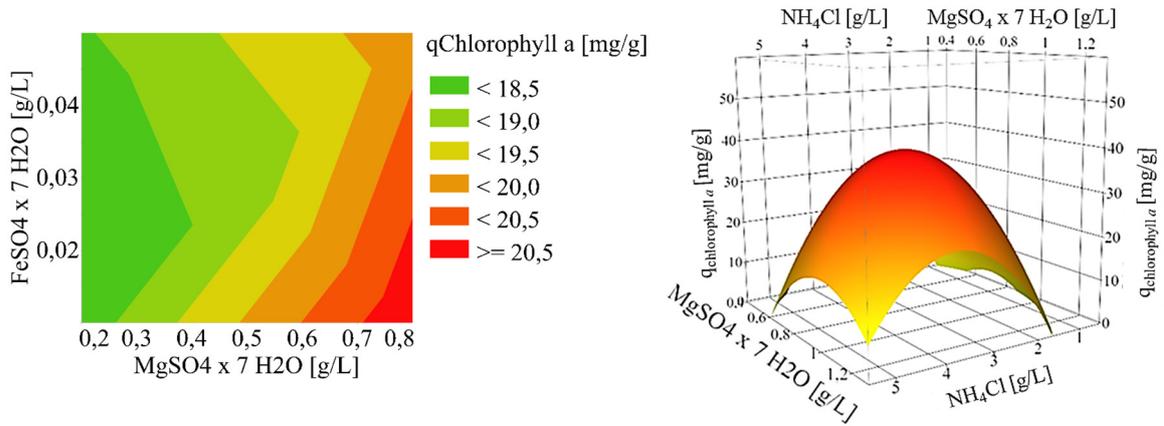


Abbildung A8: Konturplot des Fractional Factorial Screening Designs der Parameter FeSO_4 und MgSO_4 (links) und 3D-Plot des Optimierungsdesigns der Parameter NH_4Cl und MgSO_4 (rechts) mit deren Einfluss auf die Zellquota für Chlorophyll a aus Kapitel 4.3.2.

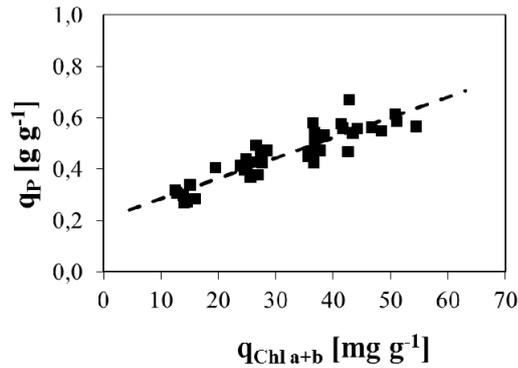


Abbildung A9: Gesamtprotein-gehalt gegenüber dem spezifischen Chlorophyll a und b Gehalt der Endproben von Versuchsreihe Schüttelkolben II für *Chlorella vulgaris* aus Kapitel 4.3.2; Steigung = $0,0079 \text{ g mg}^{-1}$; $R^2 = 0,826$.

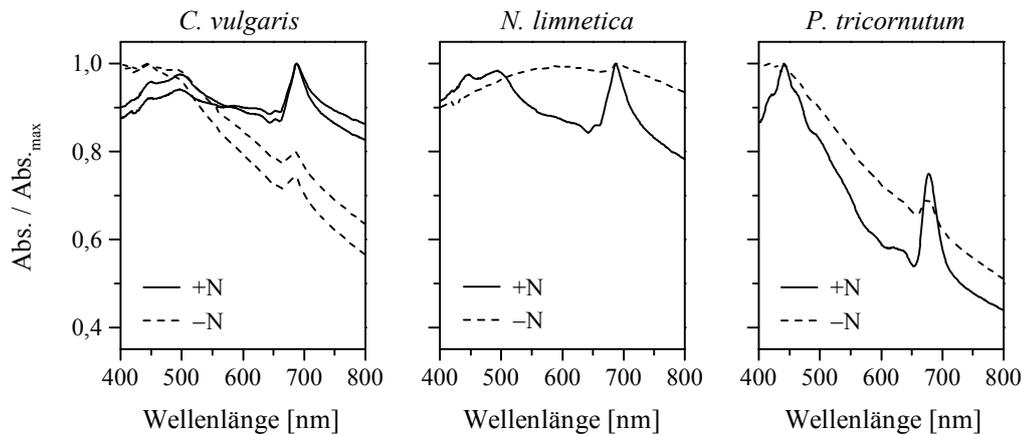


Abbildung A10: Normierte Absorptionsspektren der Versuche aus Kapitel 4.3.3 von *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis limnetica* und *Phaeodactylum tricornerum* im kontinuierlich betriebenen Midi-Plattenreaktors unter stickstoffgesättigtem Wachstum (+N) und stickstofflimitiertem Wachstum (-N).

ANHANG

Tabelle A7: Gemittelte Größen der Midiplatten-Kultivierungen im Luminostat-Betrieb für *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis limnetica*, *Phaeodactylum tricornutum* und *Synechocystis* sp. BW86 aus Kapitel 4.3.3 bei stickstoffgesättigtem (+N) und stickstofflimitiertem (-N) Wachstum; n.a. = nicht auswertbar.

Größe	Einheit	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Nannochloropsis limnetica</i>		<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		<i>Synechocystis</i> sp. BW86	
		+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N
$\mu_{\max/\min}$	[d ⁻¹]	2,1	0,26	0,82	0,04	0,68	0,05	0,67	0,01
BTM	[g L ⁻¹]	1,14	2,24	0,93	1,87	0,45	0,85	0,37	0,82
Zellzahl	[10 ¹⁰ Zellen L ⁻¹]	4,89	24,3	4,60	11,3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
q _P	[g g ⁻¹]	0,50	0,24	0,55	0,22	0,63	0,19	0,74	0,30
q _{Kh}	[g g ⁻¹]	0,21	0,28	0,24	0,51	0,30	0,36	0,14	0,63
q _L	[g g ⁻¹]	0,22	0,39	0,13	0,24	0,10	0,34	< 0,1	< 0,1
q _{Chl.a}	[mg g ⁻¹]	20,1	4,59	20,1	3,83	22,2	4,1	n.a.	n.a.
q _{Chl.b}	[mg g ⁻¹]	7,58	2,54	7,91	1,51	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
q _{Car.}	[mg g ⁻¹]	4,17	1,95	4,40	1,57	9,28	2,74	n.a.	n.a.
e _{N,X}	[g g ⁻¹]	0,08	n.a.	0,08	n.a.	0,12	n.a.	n.a.	n.a.
Y _{X,N}	[g g ⁻¹]	12,37	n.a.	11,98	n.a.	8,05	n.a.	n.a.	n.a.
P _X	[g L ⁻¹ d ⁻¹]	2,23	n.a.	0,744	n.a.	0,204	n.a.	n.a.	n.a.
PCE	[%]	16,5	n.a.	5,6	n.a.	8,8	n.a.	11,2	n.a.

Tabelle A8: Gemittelte Größen der Maxiplatten-Kultivierung für *Chlorella vulgaris* aus Kapitel 4.3.5 bei lichtgesättigtem Wachstum (Luminostat) und lichtlimitiertem Wachstum (Chemostat).

Größe	Einheit	Luminostat	Chemostat
μ_{\max}	[d ⁻¹]	1,71	0,23
BTM	[g L ⁻¹]	1,37	4,9
q _P	[g g ⁻¹]	0,51	0,64
q _{Kh}	[g g ⁻¹]	0,20	0,14
q _L	[g g ⁻¹]	0,16	0,12
q _{Chl.a}	[mg g ⁻¹]	21,8	35,3
q _{Chl.b}	[mg g ⁻¹]	6,77	11,8
q _{Car.}	[mg g ⁻¹]	4,37	5,94
e _{N,X}	[g g ⁻¹]	0,088	0,099
Y _{X,N}	[g g ⁻¹]	0,114	0,100
P _X	[g L ⁻¹ d ⁻¹]	2,34	1,13
PCE	[%]	8,39	2,96

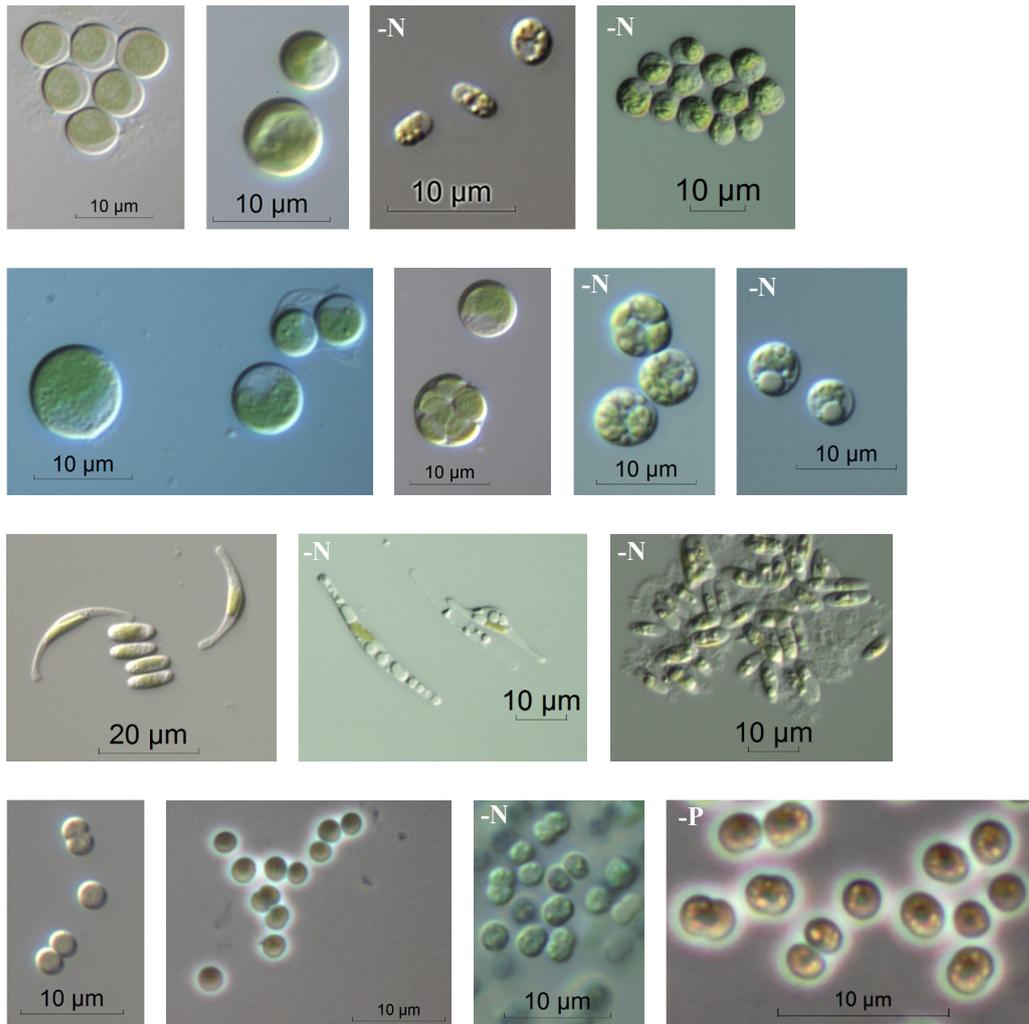


Abbildung A11: Mikroskopaufnahmen von *Chlorella vulgaris* (1. Zeile), *Nannochloropsis limnetica* (2. Zeile), *Phaeodactylum tricornutum* (3. Zeile) und *Synechocystis* sp. BW86 (4. Zeile). Aufnahme im Differentialinterferenzkontrast bei 1000facher oder 400facher Vergrößerung. Unter Stickstofflimitierung (-N) bzw. Phosphatlimitierung (-P) bilden die Zellen Granula aus.

A3.2 Maßstabsvergrößerung

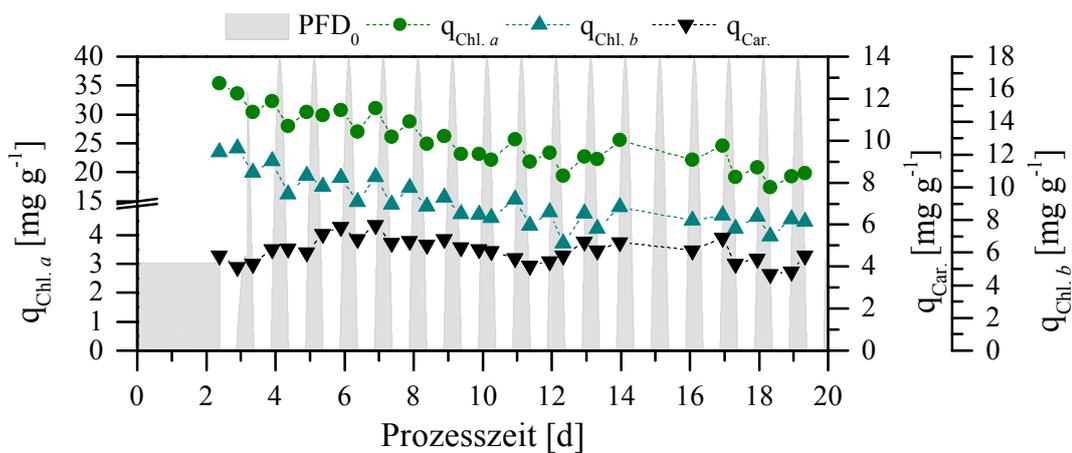


Abbildung A12: Prozessverlauf eines repetitiven Tag-Nacht-Chargenprozesses im Rührkesselreaktor als Vorversuch zur Freilandkultivierung, mit der Photonenflussdichte PFD_0 sowie den Zellquota für Chlorophyll a $q_{Chl.a}$, Chlorophyll b $q_{Chl.b}$ und Carotinoide $q_{Car.}$.

A3.3 Photoautotrophes Wachstumsmodell

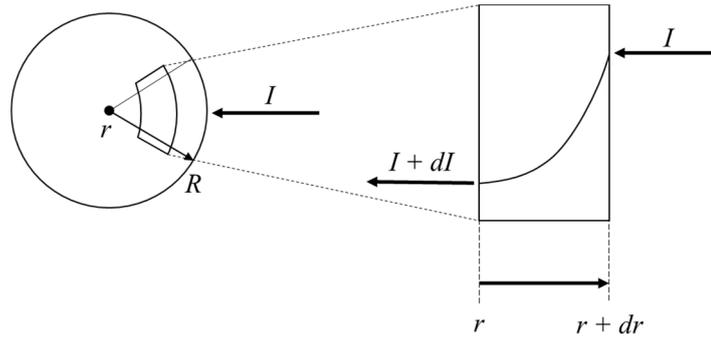


Abbildung A13: Schematische Darstellung der Lichtverteilung innerhalb eines infinitesimal kleinen Elements im Rührkesselreaktor (rechts). Links in der Abbildung ist die Sicht von oben auf den zylindrischen Reaktor dargestellt mit r = Innenradius und R = Außenradius sowie der Lichtintensität I . Innerhalb des betrachteten Bereichs (rechts in der Abbildung) ändert sich der Innenradius um $r + dr$ und die Lichtintensität tritt mit $I + dI$ wieder aus.

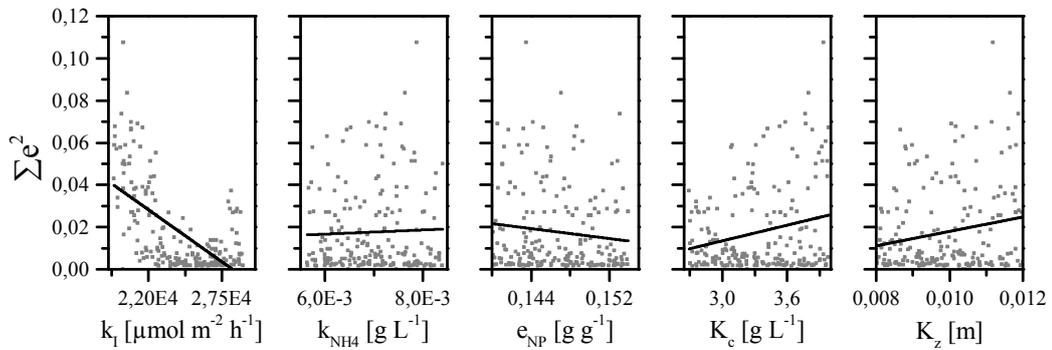


Abbildung A14: Globale Sensitivitätsanalyse mit Simulink. Dargestellt sind „Scatter Plots“ aller Parameter aus der Parameterschätzung in Bezug auf die Biomassekonzentration c_x . Aufgetragen sind jeweils die Summe der quadratischen Abweichungen über die gewählten Parameterwerte der Simulationsdurchläufe. Ein linearer Fit der Daten dient zur Visualisierung eines Trends.

Tabelle A9: Übersicht aller verwendeten Parameter des photoautotrophen Wachstumsmodells inklusive Parameterwert und -einheit.

Parameter	Wert	Einheit	Beschreibung
I_0	1080000	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$	Lichtintensität Start
D	0,0475	m	Durchmesser Plattenreaktor innen
R	0,0475	m	Radius Rührkesselreaktor innen
r_0	0,00605	m	Radius Rührwelle
A	53,2	-	Koeffizient für k_{cor}
B	0,6887	-	Koeffizient für k_{cor}
m	106,37	-	Koeffizient für k_{cor}
ϵ_0	130	$\text{L g}^{-1} \text{m}^{-1}$	Extinktionskoeffizient
K_c	PE	g L^{-1}	Korrekturkoeffizient Streuung
K_z	PE	m	Korrekturkoeffizient Streuung

ANHANG

K_I	PE	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$	Michaelis-Menten Konstante Licht
K_{NH_4}	PE	g L^{-1}	Michaelis-Menten Konstante NH_4^+
$r_{\text{CO}_2, \text{max}}$	0,3	$\text{g}_{\text{CO}_2} \text{g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$	Maximale Aufnahme rate CO_2
$r_{\text{NH}_4, \text{max}}$	0,025159	$\text{g}_{\text{NH}_4} \text{g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$	Maximale Aufnahme rate NH_4^+
a	0,1	-	Verhältnis $r_{\text{DNA}}/r_{\text{XA}}$
t_{lag}	24	h	Dauer Lag-phase
r_{ATPm}	2,184	$\text{g}_{\text{ATPm}} \text{g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$	Maintenance Rate
$e_{\text{C}, \text{CO}_2}$	0,272	$\text{g}_C \text{g}_{\text{CO}_2}^{-1}$	Massenanteil C in CO_2
$e_{\text{N}, \text{NH}_4}$	0,778	$\text{g}_N \text{g}_{\text{NH}_4}^{-1}$	Massenanteil N in NH_4^+
$e_{\text{N}, \text{P}}$	PE	$\text{g}_N \text{g}_P^{-1}$	Massenanteil N in Proteinen
$e_{\text{C}, \text{P}}$	0,53	$\text{g}_C \text{g}_P^{-1}$	Massenanteil C in Proteinen
$e_{\text{C}, \text{SS}}$	0,546	$\text{g}_C \text{g}_{\text{SS}}^{-1}$	Massenanteil C in Stärke
$e_{\text{C}, \text{LA}}$	0,646	$\text{g}_C \text{g}_{\text{LA}}^{-1}$	Massenanteil C in Membranlipiden
$e_{\text{C}, \text{LS}}$	0,77	$\text{g}_C \text{g}_{\text{LS}}^{-1}$	Massenanteil C in Speicherlipiden
$e_{\text{N}, \text{DNA}}$	0,16	$\text{g}_N \text{g}_{\text{DNA}}^{-1}$	Massenanteil N in DNA
$e_{\text{C}, \text{DNA}}$	0,37	$\text{g}_C \text{g}_{\text{DNA}}^{-1}$	Massenanteil C in DNA
$e_{\text{C}, \text{GLU}}$	0,4	$\text{g}_C \text{g}_{\text{GLU}}^{-1}$	Massenanteil C in Glukose
$Y_{\text{DNA}, \text{ATP}}$	0,01419	$\text{g}_{\text{DNA}} \text{g}_{\text{ATP}}^{-1}$	Ausbeutekoeffizient DNA/ATP
$Y_{\text{DNA}, \text{GLU}}$	1,082	$\text{g}_{\text{DNA}} \text{g}_{\text{GLU}}^{-1}$	Ausbeutekoeffizient DNA/Glukose
$Y_{\text{GLU}, \text{CO}_2}$	0,682	$\text{g}_{\text{GLU}} \text{g}_{\text{CO}_2}^{-1}$	Ausbeutekoeffizient Glukose/ CO_2
$Y_{\text{CO}_2, \text{GLU}}$	1,466	$\text{g}_{\text{CO}_2} \text{g}_{\text{GLU}}^{-1}$	Ausbeutekoeffizient CO_2 /Glukose
$Y_{\text{ATP}, \text{GLU}}$	106,976	$\text{g}_{\text{ATP}} \text{g}_{\text{GLU}}^{-1}$	Ausbeutekoeffizient ATP/Glukose
$Y_{\text{P}, \text{ATP}}$	0,00913	$\text{g}_P \text{g}_{\text{ATP}}^{-1}$	Ausbeutekoeffizient Proteine/ATP
$Y_{\text{LA}, \text{ATP}}$	0,00534	$\text{g}_{\text{LA}} \text{g}_{\text{ATP}}^{-1}$	Ausbeutekoeffizient Membranlipide/ATP
$Y_{\text{LS}, \text{ATP}}$	0,00277	$\text{g}_{\text{LS}} \text{g}_{\text{ATP}}^{-1}$	Ausbeutekoeffizient Speicherlipide/ATP
$Y_{\text{SS}, \text{ATP}}$	0,01471	$\text{g}_{\text{SS}} \text{g}_{\text{ATP}}^{-1}$	Ausbeutekoeffizient Stärke/ATP
$Y_{\text{P}, \text{GLU}}$	0,755	$\text{g}_P \text{g}_{\text{GLU}}^{-1}$	Ausbeutekoeffizient Proteine/Glukose
$Y_{\text{LA}, \text{GLU}}$	0,615	$\text{g}_{\text{LA}} \text{g}_{\text{GLU}}^{-1}$	Ausbeutekoeffizient Membranlipide/Glukose
$Y_{\text{LS}, \text{GLU}}$	0,519	$\text{g}_{\text{LS}} \text{g}_{\text{GLU}}^{-1}$	Ausbeutekoeffizient Speicherlipide/Glukose
$Y_{\text{SS}, \text{GLU}}$	0,909	$\text{g}_{\text{SS}} \text{g}_{\text{GLU}}^{-1}$	Ausbeutekoeffizient Stärke/Glukose
$c_{\text{XA}, 0}$	0,06	g L^{-1}	Startkonzentration aktive Biomasse
$c_{\text{P}, 0}$	$0,75 \cdot c_{\text{XA}, 0}$	g L^{-1}	Startkonzentration Proteine
$c_{\text{LA}, 0}$	$0,15 \cdot c_{\text{XA}, 0}$	g L^{-1}	Startkonzentration Membranlipide
$c_{\text{DNA}, 0}$	$0,1 \cdot c_{\text{XA}, 0}$	g L^{-1}	Startkonzentration DNA

$c_{\text{NH}_4,0}$	0,22 (Charge I),	g L^{-1}	Startkonzentration Ammonium
	0,235 (Charge II)		

Tabelle A10: Quelltexte der Systemfunktionen „S-functions“ vom Typ Level-1 MATLAB in Simulink und MATLAB-Skripte für das photoautotrophe Wachstumsmodell aus Kapitel 4.2.

S-function “Light_radiation” für den Block “Lichtfeld”

```
function [sys,x0,str,ts] = Light_radiation(t,x,u,flag,Reactortype,I_0,D,r_0,K_c,K_z);
switch flag,

    case 0,
        [sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(Reactortype,I_0,D,r_0,K_c,K_z);

    case 1,
        sys=mdlDerivatives(t,x,u,Reactortype,I_0,D,r_0,K_c,K_z);

    case 2,
        sys=mdlUpdate(t,x,u);

    case 3,
        sys=mdlOutputs(t,x,u,Reactortype,I_0,D,r_0,K_c,K_z);

    case {4,9}; % unused flags

    otherwise
        error('unhandled flag ', num2str(flag));

end

function [sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(Reactortype,I_0,D,r_0,K_c,K_z);

sizes = simsizes;

sizes.NumContStates = 0;
sizes.NumDiscStates = 0;
sizes.NumOutputs = 2;
sizes.NumInputs = 1;
sizes.DirFeedthrough = 1;
sizes.NumSampleTimes = 1;

sys = simsizes(sizes);

x0 = [];

str = [];

ts = [0 0]; % dynamic sample time

function sys=mdlUpdate(t,x,u,Reactortype,I_0,D,r_0,K_c,K_z);
sys = [];

function sys=mdlOutputs(t,x,u,Reactortype,I_0,D,r_0,K_c,K_z);

    c_X = u(1);          % input
    ext = 1650;
```

```

% % Exponential Method %
% m = 106.37;
% A = 53.2;
% B = 0.6887;
% if c_X <= 2.044
%     b = m*c_X;
% else
%     b = A*exp(B*c_X); % b is the product of extinction coefficient and biomass
concentration
% end

% Konstant Ext Method %
% b = 130*c_X;

if Reactortype == 1 % cylindrical stirred tank reactor
    R = D;
    dR = (R-r_0)/1000;
    z = r_0:dR:R;
    k_sca = ext*c_X/(K_c+c_X)*z/(K_z+z);
    b = k_sca*c_X;
    Intensity = I_0*D*exp(b.*(z-D))./z;
    Intensity_av = mean(Intensity);

elseif Reactortype == 2 % plate reactor illuminated from one side
    z = 0:D/1000:D;
    k_sca = ext*c_X/(K_c+c_X)*z/(K_z+z);
    b = k_sca*c_X;
    Intensity = I_0*exp(-b.*z);
    Intensity_av = mean(Intensity);

elseif Reactortype == 3 % plate reactor illuminated from both sides
    z = 0:D/1000:D;
    k_sca = ext*c_X/(K_c+c_X)*z/(K_z+z);
    b = k_sca*c_X;
    Intensity = I_0*(exp(-b.*z)+exp(b.*z-b.*D));
    Intensity_av = mean(Intensity);

else
    error('Undefined Reactortype ', num2str(Reactortype));
end

% persistent t_PSend; % declaration of time variable once intensity reaches
critical PFD
% if Intensity_av <= 14000
%     if isempty(t_PSend) == 1
%         t_PSend = t;
%     end
%     Intensity_av = Intensity_av-10*(t-t_PSend)^2;
%
%     if Intensity_av <= 0
%         Intensity_av = 0;
%     end
% end
% end

sys(1) = Intensity_av; % output light intensity
sys(2) = u(1); % biomass concentration is passed through

```

```

function [sys,x0,str,ts] = Metabolism(t,x,u,flag,K_I,K_NH4,r_CO2max,r_NH4max,e_NP)

switch flag,

    case 0,
        [sys,x0,str,ts]=mdlInitializesizes;

    case 1,
        sys=mdlDerivatives(t,x,u,K_I,K_NH4,r_CO2max,r_NH4max,e_NP);

    case 2,
        sys=mdlUpdate(t,x,u,K_I,K_NH4,r_CO2max,r_NH4max,e_NP);

    case 3,
        sys=mdlOutputs(t,x,u,K_I,K_NH4,r_CO2max,r_NH4max,e_NP);

    case {4,9};

    otherwise
        error('unhandled flag ', num2str(flag));

end

function [sys,x0,str,ts]=mdlInitializesizes

sizes = simsizes;

sizes.NumContStates = 0;
sizes.NumDiscStates = 0;
sizes.NumOutputs = 21;
sizes.NumInputs = 29;
sizes.DirFeedthrough = 1;
sizes.NumSampleTimes = 1; % At least one sample time is needed

sys = simsizes(sizes);

x0 = []; % Initial state conditions

str = [];

ts = [0 0]; % Continuous sample time

function sys=mdlDerivatives(t,x,u,K_I,K_NH4,r_CO2max,r_NH4max,e_NP)

sys = [];

function sys=mdlUpdate(t,x,u,K_I,K_NH4,r_CO2max,r_NH4max,e_NP)

sys = [];

function sys=mdlOutputs(t,r,u,K_I,K_NH4,r_CO2max,r_NH4max,e_NP)

% Input
Intensity_av = u(1);
c_X = u(2);
c_NH4 = u(3);
Q_XAX = u(4);
c_LS = u(5);

```

```

c_P      = u(6);
c_LA     = u(7);
c_SS     = u(8);
c_DNA    = u(9);
r_old    = u(10:29);
c_XA     = c_P + c_LS + c_DNA;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Constants
a        = 0.1;      % Ratio DNA to active biomass
Q_XAmin  = 0.25;    % Minimal ratio c_XA/c_X for a working cell
Q_XAmax  = 1;
t_lag    = 24;      % Duration lag phase [h]
r_ATPM   = 2.184;   % Maintenance                               From literature
e_CCO2   = 3/11;   % Mass fraction C,CO2
e_NNH4   = 7/9;    % Mass fraction N,NH4
e_CXA    = 0.515;  % Mass fraction C,XA                               Sensitivity estimate !
e_CP     = 0.53;   % Mass fraction C,P                               From literature
e_CSS    = 0.546;  % Mass fraction C,S                               From literature
e_CLA    = 0.646;  % Mass fraction C,LA                               From literature
e_CLS    = 0.77;   % Mass fraction C,LS                               From literature
e_NXA    = 0.075;  % Mass fraction N,XA                               Sensitivity estimate !
e_NP     = e_NP;   % Mass fraction N,P                               Parameter from parameter estimation
e_NDNA   = 0.16;   % Mass fraction N,DNA                               From literature
e_CDNA   = 0.37;   % Mass fraction C,DNA                               From literature
Y_DNAATP = 0.01419; % Yield DNA/ATP in g/g                               From literature
Y_DNAGLU = 1.082;  % Yield DNA/GLU in g/g                               From literature
e_CGLU   = 0.4;    % Mass fraction C,GAP
Y_GLUGAP = 0.5;    % Yield GLU/GAP
Y_GLUCO2 = 0.682;  % Yield Glu/CO2 [g/g]
Y_CO2GLU = 1.466;  % Yield CO2/GLU [g/g]
Y_ATPGLU = 106.976; % Yield ATP/GLU [g/g]
Y_PATP   = 0.00913; % Yield P/ATP in g/g                               From literature
Y_LAATP  = 0.00534; % Yield LA/ATP in g/g                               From literature
Y_LSATP  = 0.00277; % Yield LS/ATP in g/g                               From literature (Johnson)
Y_SSATP  = 0.01471; % Yield SS/ATP in g/g                               From literature
Y_PGLU   = 0.755;  % Yield P/GLU in g/g                               From literature
Y_LAGLU  = 0.615;  % Yield LA/GLU in g/g                               From literature
Y_LSGLU  = 0.519;  % Yield LS/GLU in g/g                               From literature
Y_SSGLU  = 0.909;  % Yield SS/GLU in g/g                               From literature

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Uptake rate NH4
r_NH4maxlimited = e_NP*Y_PGLU/e_NNH4*(r_old(5)-r_old(12)/Y_LAGLU-r_old(20)/Y_DNAGLU) +
r_old(20)*e_NDNA/e_NNH4; % Maximum NH4 Uptake based on the available Glucose from
Photosynthesis
% the smaller rate is rate determining
r_NH4s = min(r_NH4max*c_NH4./(K_NH4 + c_NH4), r_NH4maxlimited*c_NH4./(K_NH4 + c_NH4));

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Uptake rate CO2
r_CO2av = r_CO2max*Intensity_av/(K_I + Intensity_av); %*(Q_XAX-Q_XAmin)/(Q_XAmax-Q_XAmin);
% Monod Kinetik paired with Cell Quota Model

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% DNA rate
r_DNA = a*r_old(15);

```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Formation rate matrix

Aeq = [ 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 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;
        0, 1, 0, 0, 0, 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, 0, 0, 1, 0, -1, -1, -1, -1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, -1/Y_DNAGLU;
        0, 0, 0, Y_CO2GLU, 0, -1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0;
        0, 0, 0, Y_ATPGLU, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, -1, 0, 0;
        e_NNH4, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, -e_NP, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, -e_DNA;
        0, -Y_GLUCCO2, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0;
        0, 0, 0, 0, 0, 0, Y_PGLU, 0, 0, 0, -1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0;
        0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, Y_LAGLU, 0, 0, 0, -1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0;
        0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, Y_LSGLU, 0, 0, 0, -1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0;
        0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, Y_SSGLU, 0, 0, 0, -1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0;
        0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 0, 0, -1, 0, 0, 0, 0, 1;
        0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 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, 0, 0, 0, 1, -1, 0, 0, 0;
        0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,-1/Y_PATP,-1/Y_LAATP,-1/Y_LSATP,-1/Y_SSATP,0,0,0,0,1,-1/Y_DNAATP;
        0,e_CCO2,0,0,0,-e_CCO2, 0, 0, 0, 0,-e_CP,-e_CLA,-e_CLS,-e_CSS, 0, 0, 0, 0, 0,-e_CDNA;
        0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, -10/3, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0;
        0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, -3, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0];

beq = [ r_DNA; r_NH4s; r_CO2av; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0];

% Solve linear system of equations
r = linsolve(Aeq,beq);
% r = lsqnonneg(Aeq,beq);

if t>=0.0001 && t<=t_lag      %Lag Phase
    r=0.05*r;
end

% Output
sys (1:20) = r(1:20);
sys (21)   = c_X;

```

S-function "Reactor" für den Block "Reaktor"

```

function [sys,x0,str,ts] =
Reactor(t,x,u,flag,c_XA0,c_XS0,c_P0,c_NH40,c_LS0,c_LA0,c_SS0,c_DNA0)

switch flag,

case 0,
    [sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(c_XA0,c_XS0,c_P0,c_NH40,c_LS0,c_LA0,c_SS0,c_DNA0);

case 1,
    sys=mdlDerivatives(t,x,u,c_XA0,c_XS0,c_P0,c_NH40,c_LS0,c_LA0,c_SS0,c_DNA0);

case 2,
    sys=mdlUpdate(t,x,u,c_XA0,c_XS0,c_P0,c_NH40,c_LS0,c_LA0,c_SS0,c_DNA0);

case 3,
    sys=mdlOutputs(t,x,u,c_XA0,c_XS0,c_P0,c_NH40,c_LS0,c_LA0,c_SS0,c_DNA0);

```

```

case {4,9};

otherwise
    error('unhandled flag', num2str(flag));

end

function
[sys,x0,str,ts]=mdlInitializeSizes(c_XA0,c_XS0,c_P0,c_NH40,c_LS0,c_LA0,c_SS0,c_DNA0)

sizes = simsizes;

sizes.NumContStates = 8;
sizes.NumDiscStates = 0;
sizes.NumOutputs = 31;
sizes.NumInputs = 21;
sizes.DirFeedthrough = 1;
sizes.NumSampleTimes = 1; % at least one sample time is needed

sys = simsizes(sizes);

x0 = [c_XA0; c_XS0; c_P0; c_NH40; c_LS0; c_LA0; c_SS0; c_DNA0];

str = [];

ts = [0 0];

function sys=mdlDerivatives(t,x,u,c_XA0,c_XS0,c_P0,c_NH40,c_LS0,c_LA0,c_SS0,c_DNA0)

% Input
r = u(1:20);
c_X = u(21);

% States
c_XA = x(1);
c_XS = x(2);
c_P = x(3);
c_NH4 = x(4);
c_LS = x(5);
c_LA = x(6);
c_SS = x(7);
c_DNA = x(8);

% Equations
c_XAdot = r(15)*c_XA;
c_XSdot = r(16)*c_XA;
c_Pdot = r(11)*c_XA;
c_NH4dot = -r(1)*(c_P+c_DNA);
c_LScdot = r(13)*c_XA;
c_LAdot = r(12)*c_XA;
c_SScdot = r(14)*c_XA;
c_DNAdot = r(20)*c_XA;

% Function output
sys(1) = c_XAdot;
sys(2) = c_XSdot;
sys(3) = c_Pdot;
sys(4) = c_NH4dot;
sys(5) = c_LScdot;

```

```

sys(6) = c_LAdot;
sys(7) = c_SSdot;
sys(8) = c_DNAdot;

function sys=mdlUpdate(t,x,u,c_XA0,c_XS0,c_P0,c_NH40,c_LS0,c_LA0,c_SS0,c_DNA0)

sys = [];

function sys=mdlOutputs(t,x,u,c_XA0,c_XS0,c_P0,c_NH40,c_LS0,c_LA0,c_SS0,c_DNA0)

r      = u(1:20);

c_XA   = x(1);
c_XS   = x(2);
c_P    = x(3);
c_NH4  = x(4);
c_LS   = x(5);
c_LA   = x(6);
c_SS   = x(7);
c_DNA  = x(8);

c_X    = c_XA + c_XS;      % Total biomass concentration
Q_XAX  = c_XA/c_X;        % Proportion of inactive biomass

sys(1) = c_X;
sys(2) = c_NH4;
sys(3) = Q_XAX;
sys(4) = c_XS;
sys(5) = c_XA;
sys(6) = c_LS;
sys(7) = c_P;
sys(8) = c_LA;
sys(9) = c_SS;
sys(10) = c_DNA;
sys(11:30) = u(1:20);
sys(31) = c_NH40;

```

MATLAB-Funktion für die Bestimmung der lokalen Sensitivität (Block "Parameterschätzung")

```

function [simOut, sensfunc, sensfunc_sca], t] = LocalSensitivity (Parameter, Parametername)

model = 'Irradiation_Metabolism_Reactor_v2_0_4';

wksp = get_param(model, 'ModelWorkspace');

% Auslesen der Parameterwerte aus Modelworkspace
K_Iset = getVariable(wksp, 'K_I');
K_NH4set = getVariable(wksp, 'K_NH4');
e_NPset = getVariable(wksp, 'e_NP');

% Berechnung der Schrittweite für den Differenzenquotient
n = 1000;
delta_Parameter = Parameter./n;
Parameterplus = Parameter + delta_Parameter;

for i = 1:2          % Simulationsschleife für zweimalige Simulation (normale
Parameter - um delta_Parameter erhöhter Parameter)

```

```

if i == 1

    simOut = sim(model,'SolverType','Fixed-step','FixedStep','0.5');
    conc1 = simOut.get('concentrations');

elseif i == 2
    assignin(wksp, Parametername, Parameterplus);

    simOut = sim(model,'SolverType','Fixed-step','FixedStep','0.5');
    conc2 = simOut.get('concentrations');
else
end

end

t = simOut.get('t');

% Berechnung der Ausgabefunktion (Sensitivitäten)
delta_conc = conc2 - conc1;
sensfunc = delta_conc/delta_Parameter;
sensfunc_sca1 = sensfunc.*Parameter;

assignin(wksp, Parametername, Parameter);    %reassign the parameter value to start value

end

```

MATLAB-Skript für die Berechnung der Fischer-Informations-Matrix (Block "Parameterschätzung")

```

% Laden der Varianzen, Sensitivitäten und des Modelworkspace
load('varianzen.mat');
load('Sensitivitäten_FIM.mat');
model = 'Irradiation_Metabolism_Reactor_v2_0_4';

wksp = get_param(model, 'ModelWorkspace');

% Auslesen der Parameterwerte aus Modelworkspace
Parameter(1,1) = getVariable(wksp, 'K_I');
Parameter(1,2) = getVariable(wksp, 'K_NH4');
Parameter(1,3) = getVariable(wksp, 'e_NP');
Parameter(1,4) = getVariable(wksp, 'K_c');
Parameter(1,5) = getVariable(wksp, 'K_z');

% questdlg Abfrage der Kultivierung
choice = questdlg('FIM für welche Kultivierung?','Auswahl der
Kultivierung','F6','F18','F18');

switch choice
    case 'F6'
        disp(['Berechnung für ',choice])
        Kultivierung = 1;
    case 'F18'
        disp(['Berechnung für ',choice])
        Kultivierung = 2;
end

if Kultivierung == 1
    senscell = senscellF6;
    Varianzmatrix = VarianzF6;
elseif Kultivierung == 2
    senscell = senscellF18;

```

```

    Varianzmatrix = VarianzF18;
end

% Initialisierungen
[m,n] = size(Varianzmatrix);
FIM = zeros(length(Parameter));           %Fisher Matrix
wtrans = zeros(length(Parameter),n);     %Sensitivitätsmatrix
C = zeros(n);                             %Kovarianzmatrix
t = m;

Zustaende = n;                             %Anzahl der Zustände

% Zeitschritt-Schleife. von t0,t1,t2,... ,tj
for zeit = 1:t                             %Zeitschritte j

    % Erstellen der Kovarianzmatrix zu jedem Zeitschritt "zeit"
    for i = 1:Zustaende                     %Zustände i
        C(i,i) = Varianzmatrix(zeit,i);
    end

    % Inverse von C
    Cinv = inv(C);

    % Erstellen der transponierten Sensitivitätsmatrix zu jedem Zeitschritt "zeit".
    for i = 1:length(Parameter)
        wtrans(i,:) = senscell{1,i}(zeit,:);
    end
    w = wtrans';

    % Aufsummieren der FIM über alle Zeitschritte/Messzeitpunkte
    FIM = FIM+(wtrans*Cinv*w);
end

% LAMBDA ist die Parametermatrix
LAMBDA = zeros(length(Parameter));

for i = 1:length(Parameter)
    LAMBDA(i,i) = Parameter(1,i);
end

% Ausgabe
FIMout = FIM;                               % FIM
FIMoutSkaliert = LAMBDA .* FIM .* LAMBDA;    % Skalierte FIM
FIMoutSkaliert_inv = inv(FIMoutSkaliert);    % Skalierte FIM Inverse
gammaskal = sqrt(FIMoutSkaliert_inv)         % Streuung skaliert
[Eigen,Det] = eig(FIMoutSkaliert);           % Eigenvektoren und Determinanten
gammaskal_transformiert = sqrt(1./Det);      % Streuung des transformierten Bereiches

```