

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

**Diskontinuierliche Zugabe von Glucose zum Ausgleich des
nächtlichen Biomasseverlustes der photoautotrophen
Kultivierung von Mikroalgen**

Bachelorarbeit
Studiengang B. Sc. Biotechnologie

Vorgelegt von

Julia Radko

Hamburg

12.08.2022

Erstgutachter:
Prof. Dr. Christian Kaiser (HAW Hamburg)

Zweitgutachterin:
Dr. Sarah Löhn (TUHH)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der ausgewiesenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Werken im Wortlaut und Sinn entnommenen Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Diese Versicherung umfasst sowohl die Textinhalte als auch die verwendeten bildlichen Inhalte und Tabellen.

Ort, Datum

Unterschrift

Abstract

Während der Abwesenheit von Licht geht bei der photoautotrophen Kultivierung von Mikroalgen ein Teil der Biomasse durch die Zellatmung verloren. Diese Biomasseverluste können mit einer mixotrophen Kultivierung durch die Zugabe einer organischen Kohlenstoffquelle ausgeglichen und die Produktivität der Mikroalgen deutlich gesteigert werden. Gleichzeitig nimmt jedoch auch das Bakterienwachstum zu. In dieser Arbeit wurde in Kultivierungen der Mikroalge *Chlorella sorokiniana* im Labormaßstab diskontinuierlich Glucose vor einer 14-stündigen Dunkelphase hinzugegeben und eine Glucose-Aufnahmerate von $0,02 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ermittelt. Die hinzugefügte Glucose wurde während der Dunkelphase vollständig verbraucht und das Mikroalgenwachstum um den Faktor 2,2 gesteigert. Des Weiteren wurden die Entwicklung des Bakterienwachstums während der Kultivierungen und die Auswirkungen auf die Zellzusammensetzung untersucht. Die bakterielle Kontamination nahm durch die Glucose-Zugabe im Vergleich zu der photoautotrophen Kultivierung um den Faktor 1,7 zu. Die Analyse der Zellzusammensetzung ergab einen Anstieg des Saccharidgehalts während der mixotrophen Kultivierung. Der Pigmentgehalt änderte sich nicht nennenswert. Es wurde ein Rückgang des Lipid- und Proteingehalts beobachtet. Eine Analyse der Fettsäuren ergab, dass die am häufigsten vorkommenden Fettsäuren Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure und α -Linolensäure waren. Es wurde während der mixotrophen Kultivierung eine Zunahme des Gehalts von Linolsäure beobachtet, wohingegen der Gehalt an α -Linolensäure abnahm.

Schlagwörter: Mikroalgen, *Chlorella sorokiniana*, mixotrophe Kultivierung, Biomasseverlust, Bakterienwachstum, Zellzusammensetzung

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Mikroalgen.....	3
2.1.1 <i>Chlorella sorokiniana</i>	5
2.2 Metabolismus von Mikroalgen.....	6
2.2.1 Photosynthese und Photorespiration	7
2.2.2 Zellatmung	8
2.2.3 Pentosephosphatweg	10
2.3 Biochemische Komponenten.....	11
2.3.1 Proteine.....	12
2.3.2 Saccharide	13
2.3.3 Lipide	13
2.3.4 Pigmente.....	15
2.4 Kultivierung.....	15
2.4.1 Kultivierungssysteme	16
2.4.2 Kultivierungsparameter	17
2.4.3 Photoautotrophe Kultivierung	17
2.4.4 Mixotrophe Kultivierung.....	18
3 Material und Methoden	20
3.1 Material.....	20
3.2 Vorkulturführung.....	23
3.3 Medienzusammensetzung.....	24
3.4 Kultivierung im Multi-Cultivator MC-1000.....	25
3.4.1 Versuchsaufbau	25
3.4.2 Kultivierungsbedingungen	26
3.4.3 Versuchsablauf	27
3.5 Kultivierung im FPA	28
3.5.1 Versuchsaufbau	28
3.5.2 Kultivierungsbedingungen	29

3.5.3	Versuchsablauf	30
3.6	Ernte mittels Zentrifugation.....	31
3.7	Gefriertrocknung	31
3.8	Analytische Methoden	31
3.8.1	Optische Dichte	32
3.8.2	Biotrockenmasse	32
3.8.3	Volumetrische Produktivität	33
3.8.4	pH-Wert.....	34
3.8.5	Temperaturmessung	34
3.8.6	Nährstoffkonzentration.....	34
3.8.7	Glucosekonzentration.....	35
3.8.8	Mikroskopie	35
3.8.9	Bestimmung der Gesamtzellzahl.....	35
3.8.10	Bestimmung der Zellzusammensetzung.....	37
3.9	Statistische Methoden.....	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Kultivierung im Multi-Cultivator MC-1000.....	45
4.2	Kultivierung im FPA	52
4.3	Bestimmung der Zellzusammensetzung.....	57
5	Diskussion	62
5.1	Kultivierung im Multi-Cultivator MC-1000.....	62
5.2	Kultivierung im FPA	64
5.3	Vergleich der Zellzusammensetzung.....	67
5.4	Fehlerbetrachtung	71
6	Zusammenfassung und Fazit.....	73
7	Ausblick	75
8	Literaturverzeichnis.....	76
Anhang	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau einer eukaryotischen Mikroalgenzelle	4
Abbildung 2.2: Lichtmikroskopische Aufnahme einer <i>Chlorella sorokiniana</i> Kultur bei 1000facher Vergrößerung.	5
Abbildung 2.3: Die wichtigsten Produkte der Licht- und Dunkelreaktion der Photosynthese. .	8
Abbildung 2.4: Die drei Phasen der Zellatmung.	9
Abbildung 2.5: Pentosephosphatweg im Überblick.	10
Abbildung 2.6: Wachstumsphasen einer Algenkultivierung.	11
Abbildung 2.7: Knüpfung einer Peptidbindung.	12
Abbildung 2.8: Struktur der Proteine.	13
Abbildung 2.9: Kultivierungssysteme der Mikroalgenbiotechnologie.	16
Abbildung 3.1: Aufbau des Multi-Cultivator MC-1000 [modifiziert nach Francke, 2018; Wieczorek, 2018].	26
Abbildung 3.2: Aufbau der Kultivierungen im Flat Panel Airlift Reaktor.	29
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Zählgitters der Neubauer-Zählkammer.	36
Abbildung 4.1: Verlauf der Zellkonzentrationen während der Kultivierungen im Multi-Cultivator bei diskontinuierlicher Zugabe unterschiedlicher Mengen an Glucose vor der Dunkelphase.	46
Abbildung 4.2: Verlauf der Glucosekonzentrationen während der Kultivierungen im Multi-Cultivator.	46
Abbildung 4.3: Verlauf des pH-Werts und der Temperatur während der Kultivierungen im Multi-Cultivator bei diskontinuierlicher Zugabe unterschiedlicher Mengen an Glucose vor der Dunkelphase.	48
Abbildung 4.4: Entwicklung der Gesamtzellzahlen der Kultivierungen im Multi-Cultivator, welche in Algen- und Bakterienzellzahl unterteilt werden.	49
Abbildung 4.5: Lichtmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Kulturen aus den Kultivierungen in Multi-Cultivator von <i>C. sorokiniana</i> nach Tag 1, 4 und 7 bei 1000facher Vergrößerung.	50
Abbildung 4.6: Aufnahmen der Kultivierungsgefäße (a) und der Filter der Biotrockenmasse-Bestimmung (b) nach der Kultivierung von <i>Chlorella sorokiniana</i> im Multi-Cultivator.	51
Abbildung 4.7: Verlauf der Biotrockenmassekonzentrationen während der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung im FPA.	53

Abbildung 4.8: Verlauf der Glucosekonzentrationen während der mixotrophen Kultivierung im FPA.....	53
Abbildung 4.9: Verlauf des pH-Werts und der Temperatur während der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung im FPA.	55
Abbildung 4.10: Entwicklung der Gesamtzellzahlen der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung im FPA, welche in Algen- und Bakterienzellzahl unterteilt werden.	56
Abbildung 4.11: Lichtmikroskopische Aufnahmen der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung von <i>C. sorokiniana</i> im FPA nach Tag 1, 4 und 7 bei 1000facher Vergrößerung.	57
Abbildung 4.12: Zellzusammensetzung der Biomasse von <i>C. sorokiniana</i> nach photoautotropher und mixotropher Kultivierung im FPA.....	58
Abbildung 4.13: Fettsäurezusammensetzung von <i>C. sorokiniana</i> nach photoautotropher und mixotropher Kultivierung im FPA.	60
Abbildung A.1: Abhängigkeit der Biotrockenmasse und der optischen Dichte bei 750 nm von <i>Chlorella sorokinana</i>	82
Abbildung A.2: Abhängigkeit der Glucosekonzentration und der Absorption bei 620 nm zur Bestimmung des Saccharidgehalts.	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht der verschiedenen Stoffwechselformen von Mikroalgen und ihre Energie- und Kohlenstoffquellen [in Anlehnung an Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004].	6
Tabelle 3.1: Liste der verwendeten Geräte.....	20
Tabelle 3.2: Liste der verwendeten Materialien.....	21
Tabelle 3.3: Liste der verwendeten Chemikalien.....	22
Tabelle 3.4: Zusammensetzung des EG-Düngemittels Ferty Basis 2 [Plantafert, 2020].	24
Tabelle 3.5: Verteilung der untersuchten Glucose-Aufnahmeraten in den Kultivierungsgefäßen des Multi-Cultivators MC-100.	27
Tabelle 4.1: Zellzusammensetzung der Biomasse von <i>C. sorokiniana</i> nach photoautotropher und mixotropher Kultivierung im FPA.	58
Tabelle 4.2: Bezeichnungen der mittels FAME-Analyse nachgewiesenen Fettsäuren in den Proben der phototrophen und mixotrophen Kultivierung.	59
Tabelle 4.3: Prozentuale Verteilung der gesättigten sowie der einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren.	61
Tabelle A.1: Werte der Kalibrierung für eine optische Dichte bei 750 nm in Abhängigkeit der Biotrockenmassekonzentration.	82
Tabelle A.2: Werte der Absorption bei 620 nm für unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen.	83
Tabelle A.3: Zusammensetzung der Fettsäuren in <i>C. sorokiniana</i> nach photoautotropher und mixotropher Kultivierung im FPA sowie Vergleichswerte anderer Arbeiten.....	84

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
% (v/v)	Volume to Volume Percent; Volumenprozent
% (w/w)	Weight to Weight Percent; Massenprozent
λ	Wellenlänge
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
σ	Standardabweichung
μE	Mikroeinsteinstunde
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
A	Absorption
ADP	Adenosindiphosphat
AGQ	Fläche eines Gruppenquadrats
ALA	α -Linolensäure
ATP	Adenosintriphosphat
BM	Biomasse
c	Konzentration
$\text{C}_6(\text{H}_2\text{O})_6$	Glucose
$\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_m$	Saccharid aus n Kohlenstoffatomen und m Molekülen H_2O
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COO^-	Deprotonierte Carboxylgruppe (COOH)
D	Verdünnungsfaktor
d	Tag
DHA	Docosahexaensäure
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPA	Eicosapentaensäure
FAD/ FADH_2	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FPA	Flat Panel Airlift Reaktor
f_{Protein}	Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor
g	Gramm
Glc	Glucose
h	Stunde
H_2O	Wasser
H_2SO_4	Schwefelsäure
H_3N^+	Aminogruppe
HCO_3^-	Hydrogencarbonat

K	Korrelationsfaktor
KNO ₃	Kaliumnitrat
L	Liter
LA	Linolsäure
m	Masse
mbar	Millibar
MBTH	3-Methyl-2-benzothiazolinonehydrazon
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MUFA	Monounsaturated fatty acids
N	Anzahl
n	Anzahl der Messungen
n.d.	No date
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺ / NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH ₂	NAPH + H ⁺
nm	Nanometer
NO ₃ ⁻	Nitrat
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OH ⁻	Hydroxid-Ionen
PO ₄ ³⁻	Phosphat
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
rpm	revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase-oxygenase
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
SFA	Saturated fatty acids
t	Zeit
T	Tiefe
TKN	Total Kjeldahl Nitrogen
V	Volumen
VE	Vollentsalzt
w	Massenanteil
\bar{x}	Mittelwert
x _i	Messwert der i-ten Messung
α	Alpha
ϑ	Temperatur

1 Einleitung

Die gegenwärtige Energiekrise und Umweltprobleme, wie der Klimawandel, die Wasserknappheit oder die Luftverschmutzung, haben dazu geführt, dass die Nachhaltigkeit der Nutzung fossiler Brennstoffe überdacht wird und der Bedarf der Nutzung alternativer Energiequellen wächst. Fossile Brennstoffe decken bisher den größten Teil des Weltenergiebedarfs und sind durch die Freisetzung von CO₂ Hauptverantwortliche der globalen Erwärmung [Enamala et al., 2018; Zhu et al., 2016]. Eine der Herausforderungen der alternativen und erneuerbaren Energienutzung liegt in der Speicherung von Sonnenenergie. Eine Lösung bietet die Verwertung von Biomasse, in welcher die Sonnenenergie in Form chemischer Verbindungen gespeichert wird [Edmundson & Huesemann, 2015].

Neben Nutzpflanzen, wie Raps oder Soja, stellen auch Mikroalgen eine potenzielle Quelle für die Biomassegewinnung dar. Photosynthetische Mikroalgen sind in der Lage, einfache chemische Verbindungen mithilfe der Sonnenenergie in komplexe Verbindungen, wie Polysaccharide und Lipide, umzuwandeln, die als Ausgangsmaterialien für die Biokraftstoffherstellung eingesetzt werden. Des Weiteren bieten sie die Möglichkeit, dass nicht trinkbares Wasser und unfruchtbares oder nicht bebaubares Land für die Kultivierungen genutzt werden können. Aufgrund ihrer Fähigkeit, weitere wertvolle Produkte, wie Proteine, Carotinoide, langkettige Fettsäuren, bestimmte Vitamine oder essentielle Aminosäuren herzustellen, werden Mikroalgen bereits in der Lebensmittel- oder pharmazeutischen Industrie eingesetzt [Grabl et al., 2010; Edmundson & Huesemann, 2015; Matos, 2017].

Die photosynthetische Nutzung der Mikroalgen ist jedoch stark abhängig von den Lichtverhältnissen oder der Umgebungstemperatur, die je nach Kultivierungsstandort, Tages- und Jahreszeit variieren können. Während der Abwesenheit von Licht kann es infolge der Zellatmung zu Verlusten von 10 bis 15 % der täglich produzierten Biomasse kommen [Ogbonna & Tanaka, 1996]. Dies hat eine geringere Produktivität und Biomasseausbeute zur Folge. Doch um die Mikroalgen-Kultivierung und die Produktion der biochemischen Produkte wirtschaftlich zu gestalten, gilt es, die Biomasseproduktivität der Mikroalgen zu steigern.

Einen Lösungsansatz bietet die mixotrophe Kultivierung als Kombination der photosynthetischen Nutzung von Lichtenergie und der gleichzeitigen Verstoffwechslung von organischem Kohlenstoff. Studien zeigen, dass so der Biomasseertrag erheblich gesteigert werden kann und dabei der Anteil von synthetisierten Lipiden und Sacchariden in den Zellen zunimmt. Der Nachteil ist eine Verringerung des Gehalts an wertvollen Pigmenten [Kong et al.,

2013; Cheirsilp & Torpee, 2012; Li et al., 2014]. Zudem begünstigt das Vorhandensein von organischem Kohlenstoff das Wachstum von Bakterien. Da diese sich heterotroph ernähren, kann dies zu einer unerwünschten Zunahme der Bakterienpopulation und einer Überwucherung der Mikroalgen führen [Deschênes et al. 2015].

Einen weiteren Lösungsansatz bietet die Zugabe der organischen Kohlenstoffquelle vor der Dunkelphase der Kultivierung. Während der Abwesenheit von Licht kann diese von den Mikroalgen verbraucht werden. Dies ermöglicht es, dass keine Biomasseverluste durch die Zellatmung auftreten, sondern weiterhin unter heterotrophen Bedingungen Biomasse produziert wird [Ogbonna & Tanaka, 1996].

In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie sich eine solche diskontinuierliche Zugabe von Glucose als organische Kohlenstoffquelle auf die Kultivierung der Mikroalge *Chlorella sorokiniana* auswirkt. Durch die Zugabe der Glucose soll ein Ausgleich der nächtlichen Biomasseverluste und eine damit einhergehende Steigerung der Biomasseproduktivität erreicht werden. Gleichzeitig wird die Entwicklung des Bakterienwachstums während der Kultivierungen beobachtet und die Veränderungen der biochemischen Zusammensetzung der Mikroalgen im Vergleich zu einer photoautotrophen Kultivierung analysiert.

2 Theoretische Grundlagen

Dieses Kapitel behandelt die theoretischen Grundlagen, auf die sich diese Arbeit stützt. Es folgt eine allgemeine Betrachtung von Mikroalgen sowie eine Auseinandersetzung mit dem Metabolismus, der Zellzusammensetzung und ihrer Kultivierung.

2.1 Mikroalgen

Die Bezeichnung „Alge“ definiert keinen taxonomischen Begriff, sondern beschreibt vielmehr pflanzenähnliche Organismen, die Photosynthese betreiben [Borowitzka, 2018]. Aufgrund ihrer Morphologie und Lebensräume umfassen Algen viele verschiedene Klassen, die sich unter anderem den Protozoen, Pilzen oder Tieren zuordnen lassen [Friedl et al., 2013]. Die Vielfalt reicht dabei von prokaryotischen einzelligen bis hin zu eukaryotischen mehrzelligen, komplexen Algen, deren Lebensraum sich auf verschiedenen Arten von Gewässern, wie Seen, Flüsse oder Meere, erstreckt [Tan et al., 2020].

Unterschieden wird sowohl zwischen Makro- als auch Mikroalgen. Zu den Makroalgen zählen Seetang oder -gräser, die oft eine Länge von mehreren Metern erreichen. Mikroalgen hingegen sind einzellige, koloniale oder fadenförmige Organismen, die nur wenige Mikrometer groß sind. Zu ihnen werden Eukaryoten, wie Rot-, Grün- oder Braunalgen sowie aufgrund ihrer ähnlichen Lebensweise, auch Cyanobakterien (Blaualgen) gezählt [Rosello Sastre & Posten, 2010]. Da zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Zellen unterschieden wird, kann die Zellstruktur von Mikroalgen stark variieren. So liegt die DNA in Cyanobakterien frei im Cytoplasma vor und die Organellen werden nicht von einer Membran umschlossen. Eukaryotische Mikroalgen besitzen hingegen eine Kompartimentierung und ihre Organellen sind von Membranen umgeben. Der größte Teil des Genoms ist hier im Zellkern enthalten. Abbildung 2.1 zeigt eine schematische Abbildung einer eukaryotischen Mikroalgenzelle. Diese unterteilt sich hauptsächlich in Zellkern, Chloroplast, Thylakoide, Mitochondrien, Stärkekörner, Pyrenoid und den Golgi-Apparat. Viele der Mikroalgen sind unbeweglich. Es gibt jedoch auch bewegliche Formen, bei welchen die Fortbewegungsfähigkeit auf das Vorhandensein von Geißeln zurückzuführen ist [Richmond, 2004].

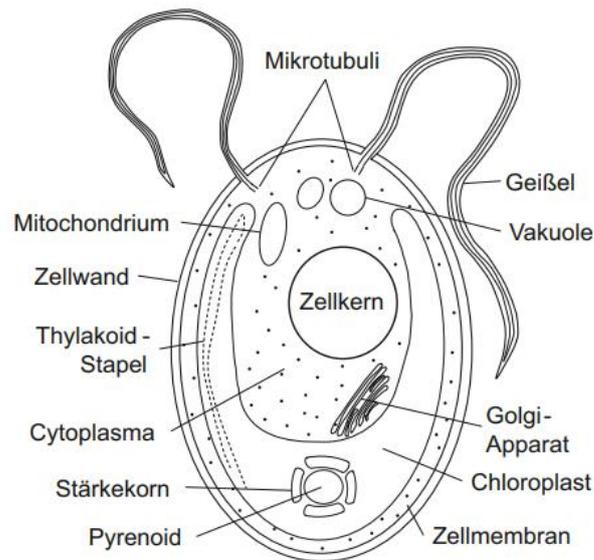


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau einer eukaryotischen Mikroalgenzelle.

Die Zelle unterteilt sich in verschiedene, membranumschlossene Kompartimente, die im wesentlichen Zellkern, Chloroplasten, Thylakoide, Mitochondrien, Stärkeköerner, das Pyrenoid und den Golgi-Apparat umfassen. [Kaltschmitt et al., 2016].

Da die Kompartimente einen hohen Gehalt an Proteinen besitzen, besteht die Trockenmasse der Mikroalgen bis zu 50 % aus Proteinen, jene der Cyanobakterien sogar aus bis zu 80 %. Der Rest der Biomasse besteht hauptsächlich aus Kohlenhydraten, Lipiden und Pigmenten [Kaltschmitt et al., 2016].

Die meisten der Algen leben photoautotroph und beziehen ihre Energie damit hauptsächlich aus Sonnenlicht, Kohlenstoffdioxid und Wasser, um organische Verbindungen aufzubauen. Dieser Vorgang wird als Photosynthese bezeichnet und findet in den Chloroplasten der Zellen statt. Angetrieben von der Lichtenergie wird das CO₂ mit Wasser in Kohlenhydrate und Sauerstoff umgesetzt [Richmond, 2004]. Schätzungen zufolge sind Mikroalgen, hauptsächlich Plankton, für etwa 40 % der globalen Sauerstoffproduktion verantwortlich [Friedl et al., 2013]. Einige der Mikroalgen sind jedoch auch in der Lage heterotroph oder mixotroph zu wachsen, also Biomasse aus organischen Substraten aufzubauen. So auch die Mikroalge *Chlorella sorokiniana*, die im Rahmen dieser Arbeit sowohl phototroph als auch mixotroph kultiviert wird [Van Wagenen et al., 2015].

Mikroalgen bieten umfangreiche Anwendungsmöglichkeiten in verschiedenen Bereichen. Aufgrund ihrer Fähigkeit wertvolle Produkte, wie Carotinoide, langkettige Fettsäuren, bestimmte Vitamine oder essentielle Aminosäuren herzustellen, werden Mikroalgen bereits in der Lebensmittel- oder pharmazeutischen Industrie eingesetzt [Matos, 2017]. Sie bieten

außerdem die Möglichkeit auf der Grundlage ihrer Biomasse Biokraftstoff herzustellen. Lipide stellen dafür den Grundbaustein dar, deren Produktion sich in den Zellen durch äußere Faktoren gezielt steigern lässt [Zhu et al., 2016].

2.1.1 *Chlorella sorokiniana*

Die Grünalgen der Gattung *Chlorella* gehören zu den am meisten kommerziell genutzten Mikroalgen. Bereits 1890 wurde die Mikroalge *Chlorella vulgaris* von M. Beijerinck das erste Mal beschrieben. Die Mikroalge wurde von ihm als „grüner Ball“ bezeichnet, inspiriert durch ihre kugelige Form und intensiv grüne Farbe [Krienitz et al., 2004].

Chlorella sorokiniana stellt eine Unterart der Gattung *Chlorella* dar, die erstmals 1953 von C. Sorokin isoliert wurde und misst einen Durchmesser von etwa 2 bis 4,5 μm [Sorokin & Myers, 1953; Lizzul et al., 2018]. Abbildung 2.2 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme einer *Chlorella sorokiniana* Kultur. Typisch für diese Mikroalge ist die Zusammenlagerung der einzelnen Zellen zu Agglomeraten, welche bei höherer Zellkonzentration sogar um ein Vielfaches größer sein können als das Agglomerat auf diesem Bild.

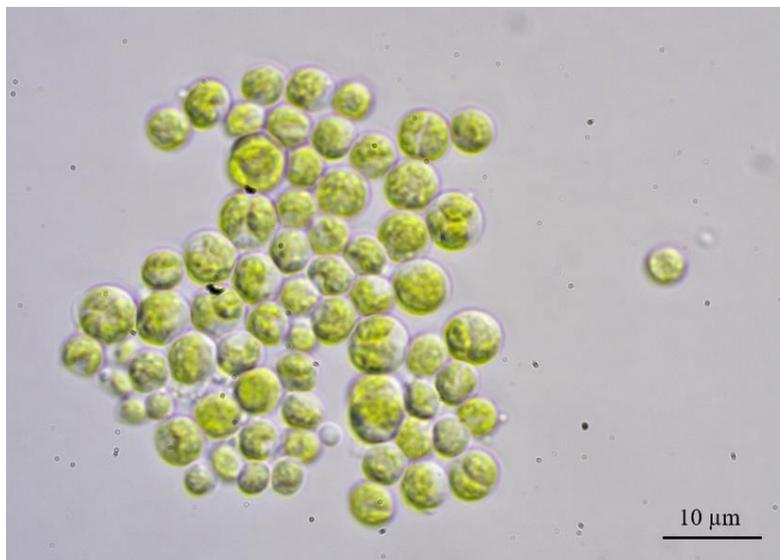


Abbildung 2.2: Lichtmikroskopische Aufnahme einer *Chlorella sorokiniana* Kultur bei 1000facher Vergrößerung.

Die Vermehrung von *Chlorella* erfolgt ausschließlich asexuell und sie ist in der Lage photoautotroph, heterotroph und mixotroph zu wachsen. Dementsprechend können sie neben anorganischem Kohlenstoff, wie CO_2 , auch organische Kohlenstoffquellen, wie z.B. Glucose, verwerten [Lizzul et al., 2018]. Da *Chlorella* unter verschiedensten Wachstumsbedingungen

eine hohe Wachstumsrate erreichen können, eignen sie sich für Kultivierungen im großen Maßstab. Sie wird vorwiegend bei der Herstellung von Lebensmitteln, Biodiesel und als Nahrungsergänzung eingesetzt, dient aber auch als Biomasselieferant für Fette, Kohlenhydrate, Vitamine und Antioxidantien [Romero et al., 2020, Schmidt & Wilhelm, 2014].

2.2 Metabolismus von Mikroalgen

Einige Mikroalgenarten, wie auch *Chlorella sorokiniana*, verfügen über die Fähigkeit verschiedene Stoffwechselformen zu nutzen. Unterschieden wird hierbei zwischen photoautotrophem, (chemo-)heterotrophem und mixotrophem Stoffwechsel. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über diese Stoffwechselformen und die jeweiligen Energie- und Kohlenstoffquellen.

Tabelle 2.1: Übersicht der verschiedenen Stoffwechselformen von Mikroalgen und ihre Energie- und Kohlenstoffquellen [in Anlehnung an Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004].

Stoffwechselform	Energiequelle	Kohlenstoffquelle
Photoautotroph	Licht	Anorganisch
(Chemo-)Heterotroph	Organisch	Organisch
Mixotroph	Licht und organisch	Anorganisch und organisch

Der photoautotrophe Stoffwechsel zeichnet sich durch die Aufnahme von Licht zur Energiegewinnung sowie der Nutzung einer anorganischen Kohlenstoffquelle, meist CO₂, aus. Photoautotrophe Organismen sind also in der Lage, selbstständig durch Nutzung der Lichtenergie aus einfachen, anorganischen Verbindungen organische Stoffe bzw. Biomasse aufzubauen. Dieser Vorgang findet sich in der Photosynthese wieder.

Der (chemo-)heterotrophe Stoffwechsel beschreibt das genaue Gegenteil des photoautotrophen Stoffwechsels. Hier stellen organische Verbindungen, z.B. Glucose, sowohl die Energie- als auch die Kohlenstoffquelle dar. Die Energiegewinnung folgt hier durch eine chemische Umsetzung dieser Verbindungen, oftmals in Form von Redoxreaktionen. Bereits vorhandene organische Verbindungen werden damit in körpereigene organische Verbindungen zum Aufbau von Biomasse umgewandelt. Im Fall des Substrats Glucose wird diese durch die Glycolyse und den Pentosephosphatweg umgesetzt [Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004; Perez-Garcia et al, 2011].

Der mixotrophe Stoffwechsel stellt eine Kombination aus photoautotrophen und heterotrophen Stoffwechsel dar. Dies bedeutet, dass gleichzeitig sowohl Licht als auch organische Verbindungen als Energiequelle und anorganischer sowie organischer Kohlenstoff als Kohlenstoffquelle von den Organismen genutzt werden können. Die Mikroalgen der Gattung *Chlorella* sind in der Lage unter mixotrophen Bedingungen zu wachsen und werden daher auch als „photoautotrophe Heterotrophe“ bezeichnet [Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004]. Diese gleichzeitige Nutzung beider Stoffwechselwege kann, im Vergleich zu einer rein photoautotrophen oder heterotrophen Kultivierung, zu höheren Wachstumsraten der Mikroalgen und damit, zu höheren Biomasseausbeuten in einem kürzeren Kultivierungszeitraum führen [Nair & Chakraborty, 2020].

2.2.1 Photosynthese und Photorespiration

Die oxidative Photosynthese stellt die Grundlage des photoautotrophen Stoffwechsels dar. Sie beruht auf der Umsetzung von Kohlenstoffdioxid und Wasser (H_2O) zu Kohlenhydraten ($C_n(H_2O)_m$) und Sauerstoff (O_2) durch Lichtenergie. Die Aufnahme dieser Lichtenergie erfolgt durch photosynthetische Pigmente, welche in den eukaryotischen Zellen in der Thylakoidmembran der Chloroplasten lokalisiert sind. Insbesondere das grüne Pigment Chlorophyll *a* ist dort für die Aufnahme verantwortlich und daher in allen photosynthetischen Organismen zu finden [Hoisikian et al., 2010]. Die Lichtenergie wird dort in chemische Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) umgesetzt. Gleichzeitig erfolgt eine Reduktion von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat ($NADP^+$) zu $NADPH_2$ und die Oxidation von Wasser zu Sauerstoff. Um diese unterschiedlichen Reaktionen zu ermöglichen, teilt sich die Reaktion auf zwei Pigment-Protein-Komplexe auf, die sogenannten Photosysteme I und II. Diese Reaktionsabfolge wird aufgrund der Lichtabhängigkeit als Lichtreaktion bezeichnet.

Die $NADPH_2$ - und ATP-Moleküle aus der Lichtreaktion treiben die lichtunabhängige Dunkelreaktion der Photosynthese, die auch als Calvin-Zyklus bekannt ist, an. Diese findet im Stroma der Chloroplasten statt. Katalysiert durch das Enzym RuBisCo werden das $NADPH_2$ und ATP dort für die Reduktion von Kohlenstoffdioxid verwendet, aus dem schließlich Kohlenhydrate aufgebaut werden können [Richmond, 2004; Peterhansel et al., 2010].

Eine vereinfachte Darstellung des Zusammenhangs beider Reaktionen ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

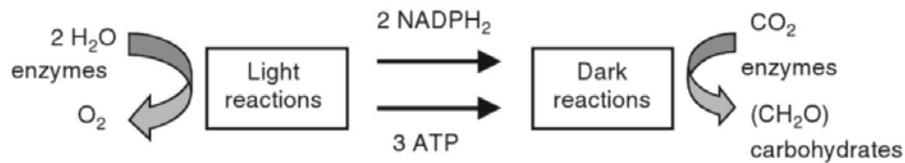


Abbildung 2.3: Die wichtigsten Produkte der Licht- und Dunkelreaktion der Photosynthese.

Während Licht- und Dunkelreaktion der Photosynthese findet eine Oxidation von Wasser (H₂O) zu Sauerstoff (O₂) sowie eine Reduktion von Kohlendioxid (CO₂) zu Kohlenhydraten (C_n(H₂O)_m) statt. Dabei wird Lichtenergie in chemische Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt [Richmond, 2004].

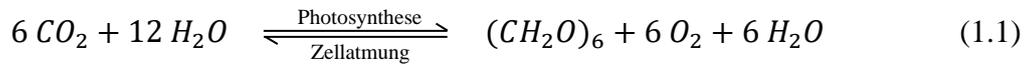
Während der Kohlenstofffixierung kommt es jedoch zu einem gleichzeitigen Verbrauch von Sauerstoff unter CO₂-Abgabe. Dieser Prozess wird als Photorespiration oder Lichtatmung bezeichnet und ist das Ergebnis einer Nebenreaktion von RuBisCo. Das Enzym kann neben dem CO₂ auch die Fixierung von O₂ katalysieren [Pflanzenforschung.de, n.d.].

2.2.2 Zellatmung

Während die Photorespiration die lichtabhängige Oxidation von Sauerstoff zu Kohlendioxid in der Photosynthese beschreibt, definiert sich die Zellatmung (auch „Dunkelatmung“) als oxidative Reaktion organischer Kohlenstoffquellen unter Verbrauch von Sauerstoff und Entstehung von Kohlendioxid und Wasser. Vor allem aber dient sie der Energiegewinnung in Form von ATP. Der Stoffwechselweg steht in Verbindung mit den Elektronentransportwegen der Mitochondrien, die in deren Membranen lokalisiert sind und als Atmungskette bezeichnet werden [Graham, 1980].

Der Stoffwechselweg lässt sich in drei Phasen unterteilen: (1) Die Bildung von Acetyl-Co-A aus Glucose durch die Glycolyse und den Abbau von Proteinen und Fetten, (2) die Oxidation von Acetyl-Co-A im Citratzyklus sowie (3) den Elektronentransfer zur Umsetzung von Sauerstoff in Wasser und die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP (Abb. 2.4). Während der Glycolyse wird das Substrat Glucose unter Elektronenabgabe und Abspaltung von CO₂ über Pyruvat zu Acetyl-CoA umgewandelt. Während der Umwandlung des Acetyl-CoA zu Oxalacetat im Citratzyklus wird weiteres CO₂ abgespalten und die Cosubstrate NAD⁺ und FAD zu NADH und FADH₂ reduziert. Diese reduzierten Cosubstrate bilden den Übergang zur Atmungskette und dienen dort als Elektronendonoren. Das über mehrere Redoxreaktionen zu O₂ veratmete Wasser stellt das Ende des vollständigen Abbaus der Glucose dar [Müller-Esterl, 2018].

Vereinfacht lässt sich die Gleichung der Zellatmung als Rückreaktion der Photosynthese darstellen (Gleichung 1.1).



Bei Mikroalgen kann durch die Zellatmung in der Nacht ein deutlicher Teil der photosynthetischen Produktivität verloren gehen und damit zu Biomasseverlusten führen [Edmundson & Huesemann, 2015].

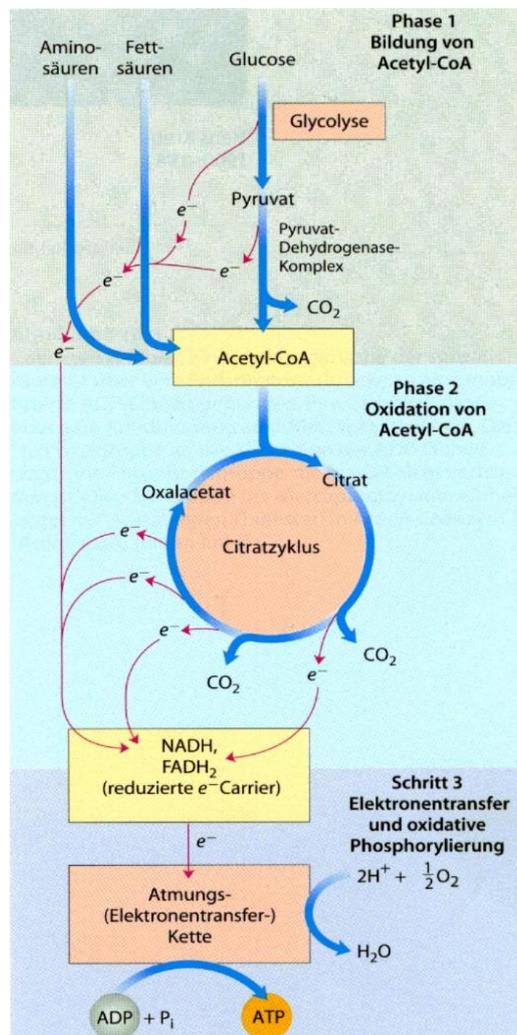


Abbildung 2.4: Die drei Phasen der Zellatmung.

Die Zellatmung dient dem Abbau der Glucose und kann in drei Phasen unterteilt werden: Die Bildung von Acetyl-CoA, Oxidation von Acetyl-CoA sowie Elektronentransfer und oxidative Phosphorylierung. Die Substrate durchlaufen dabei die Glycolyse, den Citratzyklus und die Atmungskette. Die Glucose wird schließlich zusammenfassend in CO_2 und H_2O unter Verbrauch von O_2 abgebaut, während gleichzeitig Energie in Form von ATP gewonnen wird [Müller-Esterl, 2018].

2.2.3 Pentosephosphatweg

Für den Glucose-Abbau findet in Mikroalgen neben der Zellatmung zusätzlich der Pentosephosphatweg als Alternative zur Glycolyse Gebrauch. Im Gegensatz zur Zellatmung dient der Pentosephosphatweg nicht der Energiegewinnung, sondern der Produktion von Ribulose-5-phosphat - als Vorstufe von Nucleotiden und Nucleotidcoenzymen - und NADPH, als eines der wichtigsten Reduktionsmittel für Biosynthesen. Eine Übersicht des Pentosephosphatwegs ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

Die Reaktionen des Pentosephosphatwegs werden in eine oxidative und nicht-oxidative Phase unterteilt, die direkt von der Glycolyse abzweigen. Die oxidative Phase dient in erster Linie der Synthese von NADPH während der Reaktion von Glucose-6-phosphat zu Ribulose-5-phosphat. Dabei wird NADP^+ zu NADPH reduziert und CO_2 freigesetzt. Ribulose-5-phosphat kann in Ribose-5-phosphat als Baustein für die Nucleotidsynthese umgewandelt werden.

Die nicht-oxidative Phase dient der Umwandlung des Ribose-5-phosphats in Zwischenstufen der Glycolyse, wie Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fructose-6-phosphat, wenn mehr NADPH als Ribose-5-phosphat benötigt wird. Reguliert werden die Reaktionen durch die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, welche durch eine hohe Konzentration an NADPH inhibiert und bei einem hohen NADP^+ -Angebot aktiviert wird [Stincone et al., 2015, Müller-Esterl, 2018].

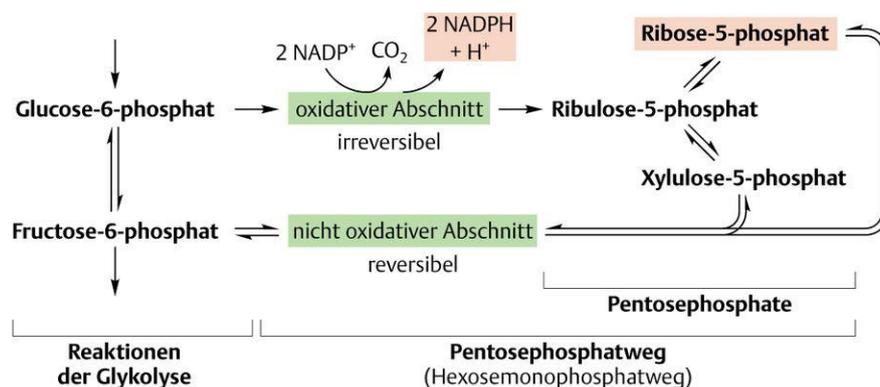


Abbildung 2.5: Pentosephosphatweg im Überblick.

Der Pentosephosphatweg zweigt von den Reaktionen der Glycolyse ab und teilt sich in eine oxidative und nicht-oxidative Phase. In der oxidativen Phase wird NADPH irreversibel über die Umwandlung von Glucose-6-phosphat zu Ribulose-5-phosphat synthetisiert und gleichzeitig CO_2 freigesetzt. Der nicht-oxidative Abschnitt dient der Umwandlung von Ribose-5-phosphat in Zwischenstufen der Glycolyse [Rassow et al., 2022].

2.3 Biochemische Komponenten

Mikroalgen sind aus verschiedenen biochemischen Komponenten aufgebaut, deren Anteile zwischen den einzelnen Arten stark variieren können. Zu diesen Komponenten zählen wertvolle Stoffe, wie Proteine, Saccharide, Lipide und Pigmente, die jeweils durch bestimmte Verfahren extrahiert und weiterverarbeitet werden können. So können beispielsweise die Lipide und Saccharide der Mikroalgen für die Biodieselproduktion oder andere industrielle Prozesse eingesetzt werden [Kong et al. 2013].

Auch die Wachstumsphase und die Kultivierungsbedingungen nehmen Einfluss auf die biochemische Zusammensetzung der Mikroalgen (Abb. 2.6). So werden in der exponentiellen Phase des photoautotrophen Wachstums vermehrt Proteine und Chlorophyll gebildet, wohingegen zum Ende eine verstärkte Stärkesynthese stattfindet. Im Falle eines Stickstoffmangels tritt eine verstärkte Synthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf [Gifuni et al., 2019]. Eine mixotrophe Kultivierung unter Zugabe von Glucose oder Acetat führt potentiell zu einer höheren Lipid- und Saccharidproduktion, wohingegen der Gehalt an photosynthetischen Pigmenten und Proteinen sinkt [Kong et al. 2013]. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Auswirkungen einer Kultivierung untersucht, bei der die Mikroalge *C. sorokiniana* tagsüber einen rein photoautotrophen und während der Nacht einen heterotrophen Stoffwechsel betreibt. So lassen sich möglicherweise etwaige Vorteile beider Kultivierungsformen hinsichtlich der biochemischen Zusammensetzung nutzen.

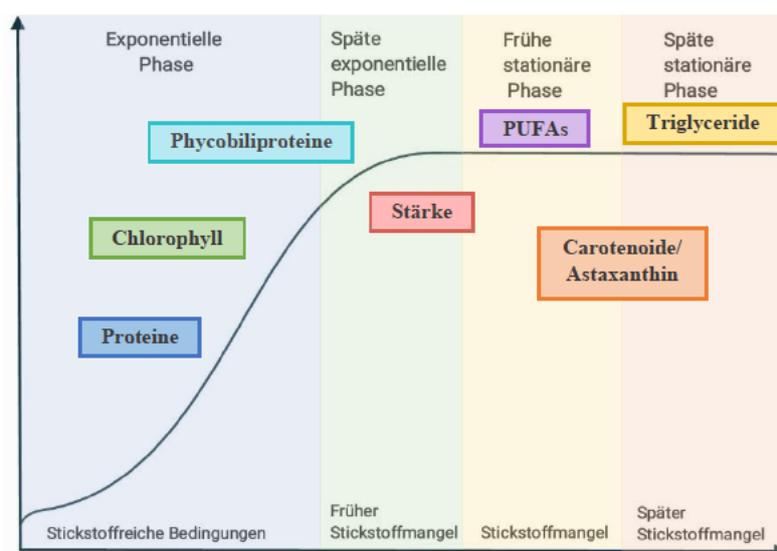


Abbildung 2.6: Wachstumsphasen einer Algenkultivierung.

Die Wachstumsphasen und die damit gegenwärtigen Nährstoffkonzentration haben einen Einfluss auf die Produktion von bestimmten biochemischen Bestandteilen während einer Algenkultivierung [modifiziert nach Gifuni et al., 2019].

2.3.1 Proteine

Proteine bilden mit einem Anteil von etwa 50 % den Hauptbestandteil der Mikroalgenzellen. Je nach Art der Mikroalge und den Kultivierungsbedingungen kann der Anteil größer oder kleiner sein [Becker, 2007]. Aufgrund dessen werden einige Mikroalgen als Nahrungsergänzung und alternative Proteinquelle vermarktet [Tan et al., 2020]. Für *C. sorokiniana* ermittelte Becker [2007] einen Proteingehalt von 57 %, Belkoura et al. [1997] einen Proteingehalt von etwa 40 % der Trockenmasse.

Es handelt sich um biologische Makromoleküle, die aus Polypeptidketten, also aus durch Peptidbindungen verknüpften Aminosäuren, aufgebaut sind. Die Struktur der Proteine wird in Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur eingeteilt. Die Primärstruktur beschreibt die Aminosäuresequenz der Polypeptidketten. Die einzelnen Aminosäuren können aufgrund ihrer Seitenketten verschiedene Merkmale aufweisen, die für die räumliche Struktur und Funktion des Proteins verantwortlich sind. Sie werden durch eine Kondensationsreaktion ihrer Carboxyl- und Aminogruppe zu einem Peptid verknüpft (Abb. 2.7). Durch Verknüpfung vieler weiterer Aminosäuren entsteht eine Polypeptidkette.

Wasserstoffbrücken, die sich zwischen räumlich beieinanderliegenden Aminosäuren ausbilden, führen zu einer dreidimensionalen Struktur in Form einer

α -Helix, eines β -Faltblatts oder gefalteter Abschnitte, die als Sekundärstruktur bezeichnet wird. Die Tertiärstruktur als Gesamtanordnung der Polypeptidketten ergibt sich aus den Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren, die räumlich weit voneinander entfernt sind. Als Quartärstruktur wird schließlich das funktionelle Protein bezeichnet, welches oft aus mehreren unterschiedlichen Polypeptidketten besteht, die sich zu einem Komplex anordnen und einzelne Untereinheiten bilden [Stryer, 2018]. Eine Übersicht dieser Strukturen ist in Abbildung 2.8 dargestellt.

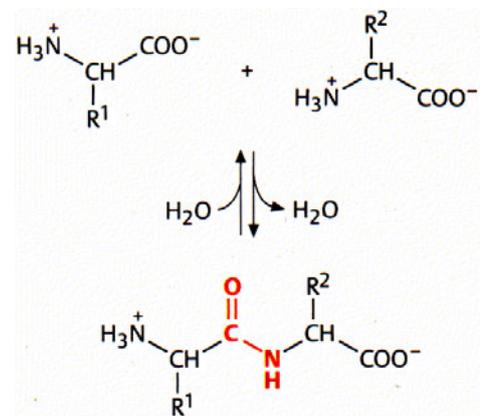


Abbildung 2.7: Knüpfung einer Peptidbindung.

Zur Verknüpfung zweier Aminosäuren erfolgt eine Kondensationsreaktion zwischen der Carboxyl- (COO⁻) und Aminogruppe (H₃N⁺). Die entstehende Verbindung beider Moleküle (rot) wird als Peptidbindung bezeichnet [Stryer, 2018].

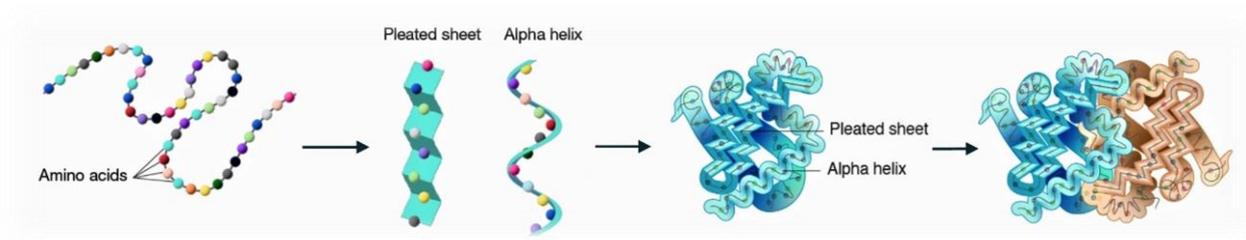


Abbildung 2.8: Struktur der Proteine.

Die Struktur der Proteine wird in Primär-, Sekundär-, Tertiär-, und Quartärstruktur eingeteilt, die die Aminosäuresequenz (r.), die räumliche Struktur einzelner Polypeptidketten (mitte r.), die Gesamtanordnung der Polypeptidkette (mitte l.) und die Anordnung von Polypeptidketten zu einem funktionellen Protein (l.) beschreiben [modifiziert nach: National Human Genome Research Institute, 2022].

2.3.2 Saccharide

Saccharide (auch *Kohlenhydrate*, *Zucker*) stellen einen weiteren Hauptbestandteil von Mikroalgenzellen dar. Der Anteil beläuft sich dabei auf durchschnittlich etwa 10 % der Trockenmasse, variiert aber je nach Mikroalgenart und Kultivierungsbedingungen [Villarruel-López et al., 2017]. Für die Mikroalge *Chlorella sorokiniana* beläuft sich der Saccharidgehalt nach Becker auf ca. 26 % der Trockenmasse, bei *Chlorella vulgaris* hingegen liegt dieser mit etwa 12 bis 17 % deutlich darunter [Becker, 2007]. Belkoura et al. [1997] ermittelten einen Saccharidgehalt von etwa 30 % der Trockenmasse.

Saccharide dienen den Mikroalgen unter anderem als Energielieferant und sind die Grundlage der verschiedenen Stoffwechselwege, wie beispielweise das Monosaccharid Glucose. Darüber hinaus werden die Saccharide in Di-, Oligo- und Polysaccharide eingeteilt. Diese Bezeichnung bezieht sich auf die Anzahl der Monosaccharide, aus denen die komplexeren Kohlenhydrate aufgebaut sind [Villarruel-López et al., 2017]. Zu den Polysacchariden zählen unter anderem Zellulose, Agarose, Stärke und Glykogen, die sich als Ausgangsmaterialien für die Herstellung von Bioethanol nutzen lassen [Tan et al., 2020].

2.3.3 Lipide

Mikroalgen sind insbesondere für ihren Lipidgehalt bekannt. Der Begriff „Lipid“ umfasst eine Reihe von Stoffen, die in unpolaren Lösungsmitteln löslich und damit lipophil bzw. hydrophob sind. Sie dienen in den Zellen als Energiespeicher oder -substrate, als Strukturbestandteile von Membranen und sind in verschiedene Stoffwechselprozesse integriert.

Sie sind außerdem in der Lage, Lipide unter Stressbedingungen anzureichern. Zu diesen Stressbedingungen gehört unter anderem ein Mangel an Stickstoff, der sich in der stationären Phase einer Kultivierung ergibt oder gezielt induziert werden kann [Gifuni et al., 2019]. Der Lipidanteil in den Mikroalgenzellen liegt durchschnittlich bei 20 bis 50 % der Trockenmasse, kann jedoch durch die Anpassung der Kultivierungsparameter noch weiter gesteigert werden, weshalb Mikroalgen besonders attraktiv für die Biodieselherstellung sind und als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt werden [Tan et al., 2020]. Becker [2007] ermittelte für *Chlorella sorokiniana* einen Lipidanteil von 2 % der Trockenmasse. Für *Chlorella vulgaris* ist ein höherer Anteil von 14 bis 22 % dokumentiert. In anderen Arbeiten wurden für *C. sorokiniana* dagegen Lipidanteile von 18 bis 22 % festgestellt [Lizzul et al., 2018; Belkoura et al., 1997].

Den Hauptbestandteil der Lipide der Mikroalgenbiomasse bilden Fettsäuren, aus denen beispielweise Phospholipide, Glycolipide und Triglyceride aufgebaut sind [Hu et al., 2008]. Die Fettsäuren werden zum einen nach ihrer Länge eingeteilt (Anzahl der Kohlenstoffatome), zum anderen wird zwischen ungesättigten und gesättigten Fettsäuren unterschieden. Gesättigte Fettsäuren (Saturated fatty acids, SFA) weisen in ihrer Struktur keine Doppelbindung auf. Einfach ungesättigte Fettsäuren (Monounsaturated fatty acids, MUFA) besitzen eine Doppelbindung, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Polyunsaturated fatty acids, PUFA) besitzen mehr als eine Doppelbindung, die zusätzlich nach Position der ersten Doppelbindung in Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren eingeteilt werden [Simopoulos, 1994]. Die Bezeichnung einer Fettsäure erfolgt gemäß folgendem Schema:

Anzahl der Kohlenstoffatome : Anzahl der Doppelbindungen

Für die Biodieselproduktion ist vor allem ein hoher Anteil an gesättigten Fettsäuren von Vorteil, für die menschliche Ernährung hingegen ein hoher Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vorzugsweise Omega-3-Fettsäuren. Zu den wichtigsten Omega-3-Fettsäuren werden hier die α -Linolensäure 18:3 (ALA), Eicosapentaensäure 20:5 (EPA) und Docosahexaensäure 22:6 (DHA) gezählt [Kong et al., 2013; Nagy & Tiuca, 2017].

2.3.4 Pigmente

Alle photosynthetisch lebenden Organismen sind auf Pigmente zur Gewinnung von Lichtenergie angewiesen und verleihen den Mikroalgen gleichzeitig ihre charakteristischen Farben. Da sie fettlöslich sind, gehören Pigmente zu der Gruppe der Lipide und können daher zur Quantifizierung in organischen Lösungsmitteln extrahiert werden. Zu den wichtigsten Pigmenten der Mikroalgen gehören Carotinoide und Chlorophyll. Chlorophyll wird von Mikroalgen vor allem in der exponentiellen Phase einer Kultivierung gebildet. Die Synthese von Carotinoiden findet vermehrt in der späten stationären Phase statt [Gifuni et al., 2018].

Carotinoide besitzen eine gelbe bis rote Farbe mit einem Absorptionsbereich zwischen 400 und 550 nm. In der Photosynthese dienen sie zum einen als Lichtsammelpigmente sowie als Schutz vor z.B. Strahlung oder reaktiven Sauerstoffspezies [Richmond, 2004].

Chlorophylle besitzen eine blau-grüne bis gelb-grüne Farbe. Unterschieden wird zwischen Chlorophyll *a*, *b*, *c*, *d* und *f*. Chlorophyll *a* ist dabei das wichtigste aktive photosynthetische Pigment mit einem Absorptionsbereich von 660 bis 665 nm und dient in der Photosynthese als Lichtempfänger. In der Mikroalge *Chlorella* ist neben Chlorophyll *a* noch Chlorophyll *b* enthalten, welches ausschließlich in Grünalgen zu finden ist. Es besitzt einen Absorptionsbereich von 642 bis 652 nm. Zusammen sind in der Art *Chlorella* Gehalte von bis zu 4,5 % des Trockengewichts möglich [Villarruel-López et al., 2017; Christaki et al., 2015].

2.4 Kultivierung

Die Kultivierung von Mikroalgen wird bereits seit vielen Jahren erforscht und stetig weiterentwickelt. Je nach Anwendung und Umgebungsbedingungen sind verschiedene Arten der Kultivierung möglich, die im Aufbau des Systems oder den eingesetzten und festgelegten Parametern variieren. Im Fokus liegen dabei vor allem eine möglichst hohe Produktivität und Zelldichte der Biomasse [Tan et al., 2020]. Im Folgenden werden die Unterschiede zwischen verschiedenen Kultivierungssystemen und -formen in Hinblick auf diese Parameter näher beschrieben sowie die optimalen Kultivierungsparameter für die Kultivierung von *Chlorella sorokiniana* herausgearbeitet.

2.4.1 Kultivierungssysteme

Die Kultivierungssysteme von Mikroalgen können in offene und geschlossene Systeme eingeteilt werden.

Offenen Systeme bieten eine Möglichkeit zur Kultivierung im großen Maßstab und sind in der Industrie weit verbreitet. Es handelt sich hierbei oft um offene Teiche, wie *Circular ponds* oder *Raceway ponds* (Abb. 2.9a). Die offenen Systeme bieten den Vorteil, dass sie kostengünstig und einfach zu betreiben sind. Jedoch können keine hohen Zellkonzentrationen bei der Kultivierung erreicht werden, da der Lichteintrag nur über die Oberfläche der etwa 30 cm tiefen Kulturen stattfindet. Auch die Produktivität kann durch äußere Bedingungen, wie z.B. Regenwasser oder Kontaminationen, zusätzlich beeinträchtigt werden [Tan et al., 2020, Kaltschmitt et al., 2016].

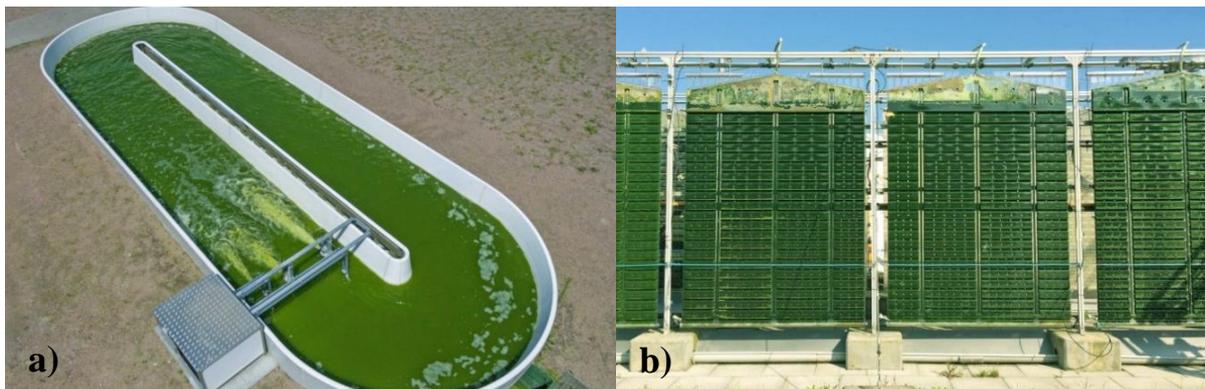


Abbildung 2.9: Kultivierungssysteme der Mikroalgenbiotechnologie.

Die in der Mikroalgenkultivierung eingesetzten Kultivierungssysteme lassen sich in offene und geschlossene Systeme einteilen. Der *Open pond* (a), stellt ein Beispiel eines offenen Systems dar. *Flat Panel Airlift* Reaktoren (b), bieten eine Möglichkeit für die Kultivierung in einem geschlossenen System [Bioökonomie.de, 2020].

Geschlossene Systeme bzw. Photobioreaktoren bieten hingegen den Vorteil, dass kein direkter Austausch der Kultur mit der Umgebung stattfindet, wodurch beispielsweise Kontaminationen verhindert werden können. Ein Beispiel eines geschlossenen Kultivierungssystems, das auch Teil dieser Arbeit ist, stellt der *Flat Panel Airlift* Reaktor dar (Abb. 2.9b). Diese Reaktoren zeichnen sich durch eine kompaktere Bauweise und besser kontrollierbare Wachstumsbedingungen aus. Wird lichtdurchlässiges Material eingesetzt wird, kann ein größerer Lichtdurchsatz ermöglicht werden, was zu einer Steigerung der Biomasseproduktion führt. Jedoch sind geschlossene Systeme nur begrenzt skalierbar. Im Produktionsmaßstab wird ihr Einsatz unwirtschaftlich [Tan et al., 2020].

2.4.2 Kultivierungsparameter

Damit Mikroalgen eine hohe Produktivität und Wachstumsrate und dementsprechend eine hohe Biomassekonzentration erreichen, benötigen sie angemessene Kultivierungsbedingungen. Dafür müssen Parameter, wie der pH-Wert und die Temperatur angepasst und der Nährstoffbedarf gedeckt werden. Der optimale pH-Wert einer Kultivierung von Mikroalgen liegt meist zwischen 7 und 9. Befindet sich der Wert nicht mehr im tolerierbaren Bereich, kann es zu Störungen der zellulären Prozesse kommen [Wang et al., 2012]. Das Temperaturoptimum für *Chlorella sorokiniana* befindet sich bei etwa 25 bis 30 °C [Wieczorek, 2018]. Das Licht als Energiequelle ist bei photoautotrophen Organismen als Grundnährstoff erforderlich und die Lichtstärke somit ein wichtiger Einflussparameter. Dabei ist Licht mit einer Wellenlänge von 400 bis 700 nm als photosynthetisch aktive Strahlung nötig. Zudem ist die Zufuhr von anorganischem Kohlenstoff, meist in Form einer Begasung durch CO₂, erforderlich, damit die Mikroalgen Photosynthese betreiben können. Hierbei ist auf die potentielle Einflussnahme durch die Begasung mit CO₂ auf den pH-Wert zu achten. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, organischen Kohlenstoff in Form von z.B. Glucose einzusetzen. Damit sind die Organismen nicht mehr ausschließlich auf das Licht angewiesen, sondern können heterotroph oder mixotroph wachsen. Um sicherzustellen, dass die Bedingungen in der gesamten Kultur gleich und die Mikroalgen homogen verteilt sind, ist eine Durchmischung der Kultur erforderlich [Acién Fernández et al., 2013; Wang et al., 2012; Kaltschmitt et al., 2016].

2.4.3 Photoautotrophe Kultivierung

Der Gewinn von Biomasse beruht bei einer photoautotrophen Kultivierung lediglich auf der Nutzung der Photosynthese durch Aufnahme von Licht. Diese Art des Stoffwechsels wurde bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Damit wird das Licht und dessen Verfügbarkeit zum wichtigsten Faktor dieser Kultivierungsmethode und nimmt direkten Einfluss auf die Photosyntheserate. Diese stellt eine Funktion der Bestrahlungsstärke dar, die die Gesamtmenge der Strahlung für einen Punkt definiert [Acién Fernández et al., 2013]. Bei einer bestimmten Lichtintensität soll die gespeicherte biochemische Energie in Form von Sacchariden, Proteinen und Lipiden maximiert werden. In Freilandssystemen steht besonders die effektive Nutzung des Sonnenlichts im Fokus. Im Labor können zudem künstliche Lichtquellen mit variierenden Lichtstärken eingesetzt werden. [Richmond, 2013].

Da Licht bei der photoautotrophen Kultivierung die einzige Energiequelle darstellt, können Probleme auftreten, wenn dieses nicht mehr zu Verfügung steht. So kommt es beispielsweise durch die Zellatmung während der Nacht zu Biomasseverlusten von etwa 10 bis 15 % [Ogbonna & Tanaka, 1996]. Bei hohen Zelldichten wird die Lichtverfügbarkeit eingeschränkt, da die Zellen sich gegenseitig beschatten und das Licht nicht mehr alle Schichten der Kultur durchdringen kann. Hieraus resultieren Einbuße der Produktivität sowie weitere Verluste durch Atmung [Li et al., 2014].

2.4.4 Mixotrophe Kultivierung

Eine Alternative zum photoautotrophen Wachstum der Mikroalgen bietet die mixotrophe Kultivierung, bei welcher der Kultur ein organisches Substrat, z.B. Glucose, als zusätzliche Energiequelle zugesetzt wird. Damit ermöglicht diese Kultivierungsmethode für den Aufbau von Biomasse sowohl die Bindung von anorganischem Kohlenstoff durch die Photosynthese als auch die Aufnahme und Verstoffwechslung von organischem Kohlenstoff. Dies resultiert in einem verstärkten Zellwachstum. Nächtliche Biomasseverluste, die in der photoautotrophen Kultivierung durch die Zellatmung auftreten, können damit verhindert werden [Li et al., 2014].

Durch die mixotrophe Kultivierung ändert sich zudem die Zellzusammensetzung der Mikroalgen. So können beispielweise die Biosynthesen von Lipiden und Sacchariden angeregt werden, wohingegen die Produktion und damit der Gehalt an photosynthetischen Pigmenten sinkt, da die Zellen nicht mehr ausschließlich auf das Licht als Energiequelle angewiesen sind [Kong et al., 2013; Cheirsilp & Torpee, 2012].

Mit der Zugabe von organischem Kohlenstoff nimmt jedoch das Risiko einer bakteriellen Kontamination zu, die vor allem im größeren Maßstab nur schwerkontrollierbar ist. Die bakterielle Wachstumsrate kann dabei sogar um ein Vielfaches höher sein als die der Algen. Es besteht das Risiko, dass die Mikroalgen bei nährstoffreichen Bedingungen schnell durch die Bakterien überwuchert werden. Besonders ungünstig ist dabei die Zugabe aller Nährstoffe zu Beginn der Kultivierung, da der größte Teil des organischen Kohlenstoffs von den Bakterien verbraucht wird [Deschênes, 2016].

In Anbetracht dessen wäre eine Kultivierungsmethode von Vorteil, die in verstärktem Zellwachstum, ohne erhebliches Bakterienwachstum, resultiert. Dafür muss sichergestellt werden, dass den Bakterien die organischen Nährstoffe nicht kontinuierlich zur Verfügung stehen. Ein Ansatz dafür wurde bereits 1996 von Ogbonna und Tanaka beschrieben. Ihr Ziel

war es, die nächtlichen Biomasseverluste einer *Chlorella sorokiniana* Kultur auszugleichen, indem sie der Kultur zur Nacht eine definierte Menge Glucose hinzufügten. Dabei wurde eine durchschnittliche Glucose-Aufnahmerate von $0,11 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ermittelt. Die Biomasseverluste konnten ohne negative Auswirkungen auf die biochemische Zusammensetzung ausgeglichen werden. Sie stellten ebenfalls fest, dass die Biomasseverluste bei geringeren Temperaturen während der Nacht geringer ausfielen [Ogbonna & Tanaka, 1996]. Auf Grundlage dieser Ergebnisse werden in dieser Arbeit der Ausgleich der Biomasseverluste im Zusammenhang mit der bakteriellen Kontamination sowie die Auswirkungen dieser Kultivierungsmethode auf die Zellzusammensetzung der kultivierten *Chlorella sorokiniana* untersucht.

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Geräte, Materialien und Chemikalien aufgelistet und Versuchsaufbauten, Versuchsdurchführungen sowie die angewendeten Methoden erläutert. Beschrieben werden die einzelnen Kultivierungsmethoden, die Ernte und Separation der Biomasse sowie analytische und statistische Methoden.

3.1 Material

Die verwendeten Geräte, Materialien und Chemikalien wurden vom Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft der Technischen Universität Hamburg zur Verfügung gestellt und werden nachfolgend in den Tabellen 3.1 bis 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Analysenwaage	PFB 1200-2A	KERN & SOHN GmbH, Balingen
Einkanalpipetten	Eppendorf Research plus 0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL, 0,5-5 mL, 1-10 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Exsikkator	ROTILABO Glas, DN 250, 8.0 L	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Flat Panel Airlift-Reaktor	FPA28	Subitec, Stuttgart
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 LDplus	Christ GmbH, Osterode
Kälteumwälzthermostat	F10-HC	JULABO GmbH, Seelbach
	HC-130A	HAILEA, Guangdong
Kühlzentrifuge	4-16KS	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Laborkühlschrank	TC 207	tritec® GmbH, Hannover
Labortiefkühlschrank	TC 213-1	tritec® GmbH, Hannover
LED-Pflanzenwuchslampe	Nova P2	QrowShop, Gotha
	Nova P4	QrowShop, Gotha
Lichtmesser	LI-250A Light Meter	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Lichtmikroskop	Axio Lab.A1	Carl-Zeiss, Jena

Gerät	Typ	Hersteller
Lichtsensor	LI-190R	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Magnetrührer	MR 2000	Heidolph, Schwabach
	IKAMAG RH	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Muffelofen	MR 170 E	Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau
Multi-Cultivator	Multi-Cultivator MC-1000	Photon Systems Instruments spol. s r.o, Drásov
ph-Messgerät	Eutech pH 6+	Thermo Scientific, Waltham
Präzisionswaage	Mettler PM6	Mettler Toledo, Greifensee
	ADB 200-4	KERN & SOHN GmbH, Balingen
Randall-Heißextraktor	E4 Behrotest Heißextraktion nach Randall	behr Labor-Technik GmbH, Düsseldorf
Schwebekörper- Durchflussmesser	DK800/PV	KROHNE Messtechnik GmbH, Duisburg
Spektralphotometer	DR 3900	Hach Lange GmbH, Düsseldorf
Trockenofen	UL30	Memmert, Schwabach
Trockenofen	APT.lineTMED	Thermo Fischer Scientific Mess- technik, USA
Trockenschrank	Typ 9240300002000, 0 - 300°C	BINDER GmbH, Tuttlingen
Ultra-Turrax	T25 basic	IKA®-Werke, Staufen
Vakuumpumpe	25511C-10 Kolbenpumpe	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Tabelle 3.2: Liste der verwendeten Materialien.

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Einmal-Injektions-Kanüle	HENKE-JECT® 23Gx1", 0,6 x 25 mm	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Einwegspritzen	5 mL HENKE-JECT®, Luer	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Enzymatisches Testkit	D-Glucose UV-Test	R-Biopharm AG
Extraktionsbecher	EB75	behr Labor-Technik GmbH, Düsseldorf
Extraktionshülsen	501 33X60	VWR International, Darmstadt
Glasküvetten	Rundküvetten	VWR International, Radno
Glasküvetten	Gewindeflaschen, 7 mL	Nipro PharmaPackaging Germany GmbH, Münnertstadt

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Glasmikrofaserfilter	Filter 693, 1,2µm	VWR International, Radnor
Küvetten	VWR Cuvettes PS, semi-micro, 1,5 mL	VWR International, Radno
	VWR Cuvettes PS, macro, 2,5 mL	VWR International, Radno
Mikroreaktionsgefäße	Microtubes, PP, 1,5 mL	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim
	Safe-Lock Tubes 2,0 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Mörser	Porzellan-Mörser	VWR International, Darmstadt
Neubauer Zählkammer	Neubauer Improved, 0,02 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim von der Rhön
Nitrat Küvetten-Test	LCK 339 Nitrat	Hach Lange GmbH, Düsseldorf
Parafilm	PARAFILM® "M"	Pechinery Plastic Packaging, Inc., Chicago
Phosphat Küvetten-Test	LCK349 Phosphor	Hach Lange GmbH, Düsseldorf
Pipettenspitzen	100-1000 µl ep.T.I.P.S.®	Eppendorf AG, Hamburg
Porzellantiegel	-	VWR International, Darmstadt
PTFE-Luftfilter	Midisart 2000	Sartorius stedim biotech, Göttingen
Siedesteine	-	Merck KGaA, Darmstadt
Spritzenvorsatzfilter	ROTILABO® KY63.1, PVDF, 0,45 µm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
	CHROMAFIL® PET-45/25, 0,45 µm	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Zentrifugenbehälter	Gefäß 15917, PPCO, 750 mL	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Zentrifugenröhrchen	Schraubröhre, 50 ml, (LxØ): 114 x 28 mm, PP	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht

Tabelle 3.3: Liste der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Typ	Hersteller
CO ₂	Kohlenstoffdioxid (gasförmig)	Westfalen AG, Münster
D-Glucose	D(+)-Glucose wasserfrei	AppliChem GmbH, Darmstadt
DMSO	Dimethylsulfoxid	VWR International, Radnor
DTT	Dithiotreitol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	absolute for analysis EMSURE®	Merck KGaA, Darmstadt
Ferty-Nährsalz	FERTY® 2 Basisdünger	Planta Düngemittel GmbH, Regenstauf

Bezeichnung	Typ	Hersteller
H ₂ NSO ₃ H	Amidoschwefelsäure	Merck KGaA, Darmstadt
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid 50 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure 95-97 % EMSURE®	AppliChemGmbH, Darmstadt
HCL	Salzsäure 37 %	Merck KGaA, Darmstadt
Hexan	n-Hexan ROTISOLV® Pestilyse® plus ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
KNO ₃	Kaliumnitrat	VWR International, Radnor
MBTH	3-Methyl-2-benzothiazolinonehydrazon	Merck KGaA, Darmstadt
NaOH	Natriumhydroxid-Plätzchen	AppliChemGmbH, Darmstadt
NH ₄ Fe(SO ₄) ₂ · 12 H ₂ O	Ammoniumeisen(III)-sulfat-Dodecahydrat	VWR International, Radnor

3.2 Vorkulturführung

Eine *Chlorella sorokiniana* Kultur wurde aus einem Volumen von etwa 100 mL in immer größeren Laborglasflaschen zu zwei Kulturen mit einem Volumen von je 5 L herangezogen. Die Vorkultur wurde bei Raumtemperatur täglich für 16 Stunden mit einer Pflanzenlampe beleuchtet und mit einem Gemisch aus Druckluft und 10 % CO₂ begast. Das Gasgemisch wurde vor Eintritt in die Kultur durch PTFE-Luftfilter gefiltert. Die Abluft wurde durch eine Abluftflasche geleitet und vor Austritt in die Umgebung ebenfalls gefiltert. Die Durchmischung der Suspension erfolgte durch einen Magnetrührer und einen Rührfisch.

Da für die Versuche im *Flat Panel Airlift* Reaktor (nachfolgend FPA) große Kulturvolumina nötig waren, um die gewünschte Startkonzentration zu erreichen, wurde der Rest der 5 L Kulturen nach dem Befüllen der Reaktoren jeweils mit neuem Medium aufgefüllt. Um Kontaminationen zu kontrollieren, wurden die Vorkulturen regelmäßig mikroskopiert.

Die Zusammensetzung des Nährmediums wird im folgenden Kapitel beschrieben.

3.3 Medienzusammensetzung

Die Zusammensetzung des Nährmediums war sowohl für die Vorkultur als auch für die Versuche im Multi-Cultivator und FPA gleich. Das EG-Düngemittel Ferty Basis 2 sowie KNO_3 wurden dafür in Leitungswasser gelöst, um die Versorgung mit den benötigten Spurenelementen und Stickstoff sicherzustellen. Die Zielkonzentration des Ferty Basis 2 Düngemittels im Medium betrug 2 g L^{-1} , die des KNO_3 $3,26 \text{ g L}^{-1}$. Eine Übersicht der Zusammensetzung des Ferty Basis 2 ist in Tabelle 3.5 zu finden.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des EG-Düngemittels Ferty Basis 2 [Plantafert, 2020].

Komponente		Konzentration in % (v/v)
Stickstoff	NO_3^-	3
Phosphat	P_2O_5	15
Kalium	K_2O	35
Magnesium	MgO	5
Schwefel	S	9,5
Bor	B	0,035
Molybdän	Mo	0,012
Kupfer EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{CuNa}_2$	0,006
Eisen DTPA	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{FeNa}_2$	0,4
Mangan EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{MnNa}_2$	0,080
Zink EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{ZnNa}_2$	0,010

Als Ergänzung der photoautotrophen Kultivierung wurde den Kulturen in den entsprechenden Versuchen zusätzlich eine bestimmte Menge Glucose hinzugefügt. Diese Menge war abhängig von der initialen Zellkonzentration und der Dauer der Dunkelphase. Die gewählten Glucose-Aufnahmeraten werden in den folgenden Kapiteln definiert, in denen die Kultivierungsbedingungen betrachtet werden.

3.4 Kultivierung im Multi-Cultivator MC-1000

Der erste Versuch dieser Arbeit wurde im Multi-Cultivator MC-100 durchgeführt. Dieser erlaubt zeitgleich bis zu acht unterschiedliche und voneinander unabhängige Kultivierungen. Dies ermöglicht es, die Auswirkungen unterschiedlicher Kultivierungsparameter auf eine bestimmte Mikroalge oder die Auswirkung eines bestimmten Parameters auf unterschiedliche Mikroalgen parallel zu untersuchen. Ziel des dieses Versuchs ist in dieser Arbeit ist die Ermittlung der Aufnahmerate von Glucose der Mikroalge *Chlorella sorokiniana*, bei welcher der vollständige Verbrauch der hinzugegebenen Glucose-Menge während der Dunkelphase erreicht wird.

Der Versuchsaufbau, die Kultivierungsbedingungen und der Versuchsablauf werden im Folgenden näher erläutert.

3.4.1 Versuchsaufbau

Der grundlegende Aufbau des Multi-Cultivators MC-100 ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt. Der Multi-Cultivator setzt sich im Wesentlichen aus acht Kulturgefäßen mit einem Gesamtvolumen von je 100 mL, dahinterliegenden LED-Panels, einem Wasserbad und einem Begasungssystem zusammen. Das Wasserbad kann über ein externes Kälteumwälzthermostat temperiert und die LEDs auf verschiedene Lichtintensitäten eingestellt werden. Die Durchmischung der Kultur erfolgt durch Begasungsröhrchen, die durch die Verschlussstopfen der Kultivierungsgefäße führen und bis an den unteren Teil der Gefäße reichen. Durch eine Luer-Lock Verbindung lässt sich der Begasungsstrom unterbrechen. Die Begasung setzt sich auch aus einem Gemisch von 10 % (v/v) CO₂ und Druckluft zusammen. Bevor diese in das Kultivierungssystem geleitet wird, passiert das Gas eine mit VE-Wasser befüllte Flasche, um dieses zu befeuchten und so den Verdampfungseffekt in den Kultivierungsgefäßen zu verringern. Die entstehende Abluft wird über eine weitere Öffnung im Verschlussstopfen durch einen Abluftschlauch nach außen geleitet [Francke, n.d.].

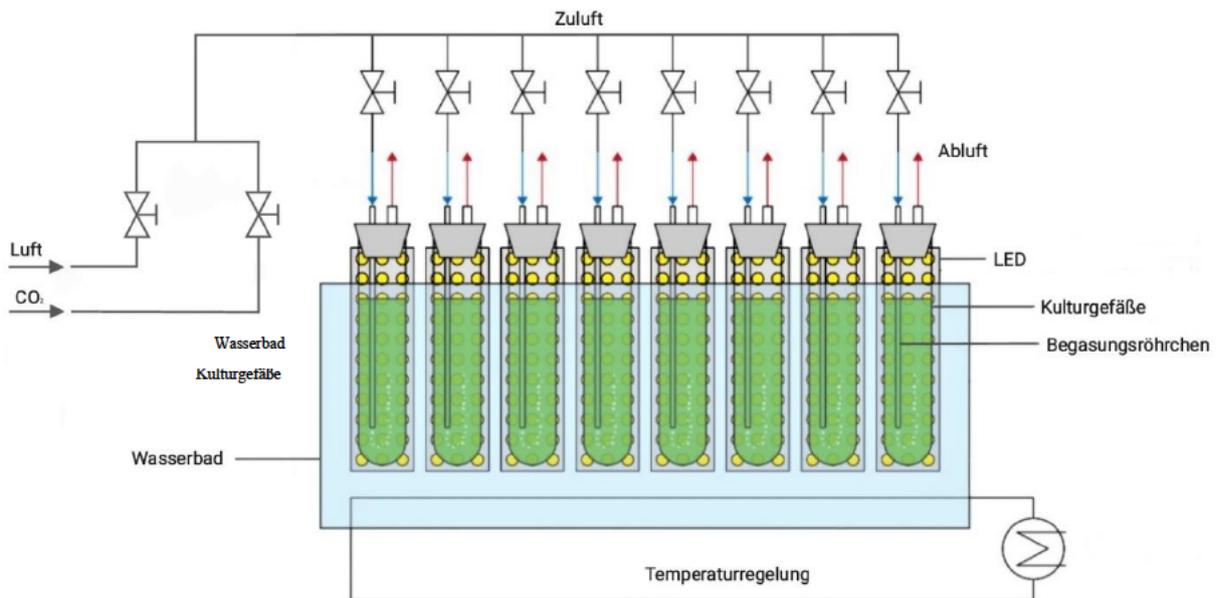


Abbildung 3.1: Aufbau des Multi-Cultivator MC-1000 [modifiziert nach Francke, 2018; Wiczorek, 2018].

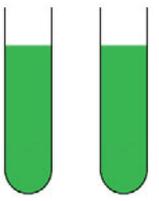
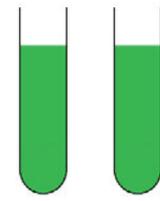
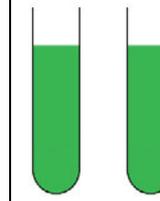
3.4.2 Kultivierungsbedingungen

Die Parameter der Kultivierung wurden so gewählt, dass sie sich nachfolgend auf die Versuche im 30 L FPA übertragen lassen. Die gewählte Beleuchtungsdauer richtete sich nach bereits durchgeführten Versuchen, welche ebenfalls nächtliche Biomasseverluste und den Ausgleich durch organischen Kohlenstoff thematisiert haben sowie nach der zeitlichen Realisierbarkeit der Probenahmen unter Berücksichtigung des natürlichen Tag-Nacht-Zyklus. Die Kultivierungsdauer betrug sieben Tage.

Es wurde ein Tag-Nacht-Zyklus gewählt, bei welchem die Dunkelphase 14 Stunden und die Lichtphase 10 Stunden andauerten. Auch Ogbonna und Tanaka sowie Edmundson und Huesemann wählten in ihren Arbeiten diese Beleuchtungsdauern [Ogbonna & Tanaka, 1996; Edmundson & Huesemann, 2015]. Als Beleuchtungsstärke wurde ein Wert von $500 \mu\text{E}$ (entspricht $500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) festgelegt. Dieser wurde durch Messung der Lichtstärke der Pflanzenlampe, die für die Versuche im FPA verwendet wird, für einen Abstand von 70 cm ermittelt. Die Temperatur während der Hellphase betrug $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Während der Dunkelphase wurde das Wasserbad mithilfe des Kälteumwälzthermostats auf $15 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert, um den natürlichen Temperaturabfall während der Nacht zu simulieren. Die Begasung erfolgte durch ein Gemisch aus etwa 200 L h^{-1} Druckluft und $20 \text{ L h}^{-1} \text{ CO}_2$. Der Anteil an CO_2 betrug folglich etwa 10 % (v/v).

Es wurden während der Kultivierungen der Mikroalge *Chlorella sorokiniana* vier verschiedene Glucose-Dosierungen für den Ausgleich der nächtlichen Biomasseverluste in Doppelbestimmung untersucht. Die hinzugefügte Glucose-Menge wurde in Abhängigkeit der initialen Zellkonzentration und der Dauer der Dunkelphase (14 h) ermittelt und orientierte sich an den Glucose-Aufnahmeraten der Versuche von Ogbonna und Tanaka, die für *C. sorokiniana* einen Wert von $0,11 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ermittelten [Ogbonna & Tanaka, 1996]. Unter Berücksichtigung vorangegangener Bachelorarbeiten, in denen *C. sorokiniana* kultiviert wurde, wurde jedoch eine geringere Aufnahmerate vermutet und dementsprechend ausgewählt [Schöke, 2020; Maubach, 2021]. Untersucht wurden schließlich neben den $0,11 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ noch Aufnahmeraten von $0,02$ und $0,07 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Als Referenz wurde eine photoautotrophe Kultivierung durchgeführt. Eine Übersicht der Verteilung der verwendeten Glucose-Dosierungen in den Kulturgefäßen ist in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Verteilung der untersuchten Glucose-Aufnahmeraten in den Kultivierungsgefäßen des Multi-Cultivators MC-100.

Kultivierungsgefäß	1	2	3	4	5	6	7	8
								
Untersuchte Glucose-Aufnahmerate [$\text{g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$]	0 (photoautotroph)		0,02		0,07		0,11	

3.4.3 Versuchsablauf

Die Kultivierungsgefäße wurden mit 80 mL der gezüchteten *C. sorokiniana* Kultur befüllt. Es sollte Startkonzentration von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht werden. Hierfür wurde die benötigte Menge der Vorkultur abzentrifugiert, das Zellpellet mit VE-Wasser gewaschen und in frischem Medium resuspendiert. Die entsprechenden Kultivierungsparameter wurden über die Kontrollsoftware des Multi-Cultivators eingestellt und die Begasung über Durchflussmesser kontrolliert. Zum Anfang der Hellphase wurde die Kultivierung gestartet. Die Probenahmen erfolgten alle 10 und 14 Stunden im Wechsel, um die Biomassekonzentrationen zum Beginn und zum Ende der Dunkelphase sowie den pH-Wert und die Temperatur der Kulturen zu bestimmen. Vor den Probenahmen wurden entstandene Verdunstungsverluste durch Zugabe von VE-Wasser

ausgeglichen. Aus jedem der Kultivierungsgefäße wurde für die Bestimmung der Biomassekonzentration das gleiche Volumen entnommen und die optische Dichte gemessen. Eine Erläuterung dieser Methode folgt in Kapitel 3.8.1. Zu Beginn der Hellphase wurden Zählungen der Algen- und Bakterienzellen für je ein Kulturgefäß der vier verschiedenen Kultivierungen durchgeführt und so die Gesamtzellzahl bestimmt. Zum Versuchsstart und -ende wurde die Biotrockenmassekonzentration der Kulturen bestimmt. Zum Anfang der Dunkelphase wurde den Kulturen mithilfe der bestimmten Biomassekonzentrationen die den Aufnahmeraten entsprechende Menge Glucose hinzugefügt. Jeweils vor und nach der Dunkelphase wurde den Kulturgefäßen 3 bis 8 etwa 1 mL Probe entnommen und mit einem Spritzenvorsatzfilter gefiltert. Dieses Filtrat wurde bei -20 °C gelagert und nach den Kultivierungen für die Bestimmung der Glucosekonzentrationen mithilfe eines Testkits verwendet. Der Versuch wurde nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen (168 h) beendet.

3.5 Kultivierung im FPA

Der zweite Versuchsteil dieser Arbeit bestand aus Kultivierungen von *C. sorokiniana* in einem 30 L *Flat Panel Airlift* Reaktor, um die Ergebnisse des Multi-Cultivator Versuchs in einem größeren Maßstab zu verifizieren und anschließend die Auswirkungen der diskontinuierlichen Glucose-Zugabe auf die Zellzusammensetzung zu untersuchen.

3.5.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau der Kultivierungsversuche im FPA ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

Der Reaktor ist hängend an einem Metallgestell befestigt. Er besitzt ein Gesamtvolumen von 30 L und kann mit einem Kulturvolumen von 27 L befüllt werden. Für die Befüllung ist am unteren Ende des Reaktors ein mit einer Pumpe verbundener Schlauch mit Ventil angebracht. Der untere Teil des Reaktors befand sich in einem mit VE-Wasser befüllten Wasserbad, welches sich durch ein Kälteumwälzthermostat temperieren ließ.

Die Begasung wurde über Schwebekörperdurchflussmesser geregelt und erfolgte bodenseitig. Das aufsteigende Gas stellte gleichzeitig die Durchmischung der Kultur sicher. Über eine Öffnung an der Kopfseite des Reaktors konnte das Gas wieder austreten. Damit kein Inhalt des Reaktors in die Umgebung getragen wurde, war ein Silikonschlauch an der Öffnung befestigt

und endete in einem Kunststoffbehälter. Eine LED-Pflanzenwuchslampe des Typs Nova P4 wurde als Lichtquelle in einer Entfernung von 70 cm vor dem Reaktor aufgestellt, sodass ein zentraler Lichteinfall erreicht wurde. Die Probenahme und Glucose-Zugabe erfolgten über zwei Probenahmeventile an der Vorderseite des Reaktors. Um die Mikroalgenkultur während der Dunkelphase vor Umgebungslicht zu schützen, wurde dieser mit lichtundurchlässigem Molton bedeckt.

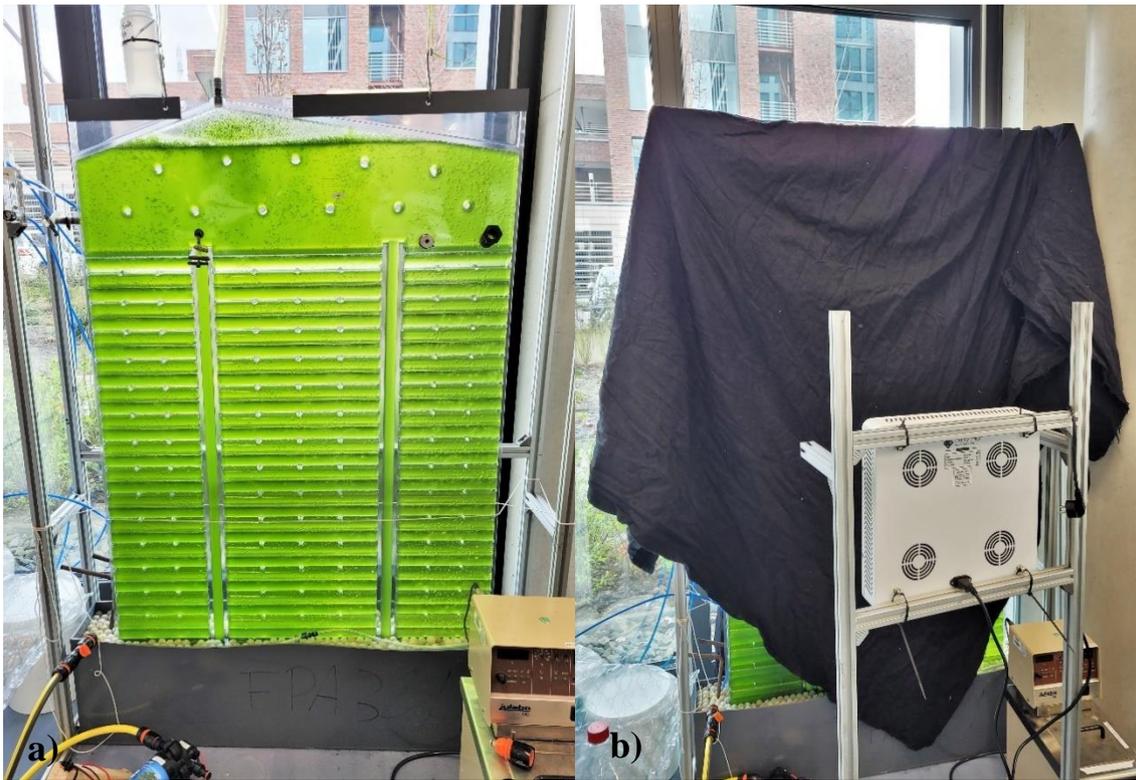


Abbildung 3.2: Aufbau der Kultivierungen im Flat Panel Airlift Reaktor.

Für die Kultivierungen des zweiten Versuchsteils wurde ein 30 L FPA verwendet, der an einem Metallgestell hängt und deren unterer Teil sich in einem Wasserbad befindet, welches über ein Kälteumwälzthermostat temperiert werden kann (a). Die Lichtquelle ist in einer Entfernung von 70 cm vor dem Reaktor aufgestellt. Während der Dunkelphase wird die Kultur mit Molton bedeckt, um die Kultur vor Umgebungslicht zu schützen (b).

3.5.2 Kultivierungsbedingungen

Die Parameter der Kultivierung der *Chlorella sorokiniana* im Multi-Cultivator wurden auf die Versuche im FPA übertragen. Die Kultivierungsdauer betrug ebenfalls sieben Tage. Die Dauer der Dunkelphase der Kultivierung betrug 14 Stunden, die der Lichtphase 10 Stunden. Die Beleuchtungsstärke der Pflanzenwuchslampe bei einer Entfernung von 70 cm zum Reaktor wurde mithilfe eines Lichtsensors bestimmt und betrug $500 \mu\text{E}$. Die Begasung erfolgte durch ein Gemisch aus etwa 100 L h^{-1} Druckluft und $10 \text{ L h}^{-1} \text{ CO}_2$ und entspricht damit einem Anteil von etwa 10 % (v/v) CO_2 .

Tagsüber wurde bei Raumtemperatur kultiviert. In der Nacht wurde das Wasserbad auf 5 °C temperiert. Da sich nur der untere Teil des Reaktors im Wasserbad befand, wurde die Temperatur herabgesetzt und die Kühlung der gesamten Kultur durch Durchmischung realisiert.

Die erste Kultivierung fand unter photoautotrophen Bedingungen statt. Die im Multi-Cultivator untersuchte Glucose-Zugabe von $0,02 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurde für die mixotrophe Kultivierung im FPA eingesetzt.

3.5.3 Versuchsablauf

Der Reaktor wurde mit einem Kulturvolumen von 27 L befüllt. Zunächst wurde konzentriertes Nährmedium in einer 5 L Laborglasflasche angesetzt, in den Reaktor gepumpt und mit weiteren 5 L Leitungswasser verdünnt. Es wurden jeweils 8 L der Vorkulturen von *C. sorokiniana* für die Kultivierung verwendet. Der übrige Teil wurde für die nächste Kultivierung mit frischem Medium aufgefüllt und erneut hochgezüchtet. Der Reaktor wurde anschließend mit 8 L Leitungswasser auf das Zielvolumen aufgefüllt. Die Startkonzentration lag schließlich bei etwa $0,3 \text{ g L}^{-1}$.

Die Kultivierung wurde zum Anfang der Hellphase gestartet und die Begasung über die Schwebekörperdurchflussmesser eingestellt. Die Probenahmen erfolgten alle 10 und 14 Stunden im Wechsel. Zu jedem der Zeitpunkte wurde sowohl die Biomassekonzentration mithilfe der OD als auch die Biotrockenmasse der Kultur bestimmt und der pH-Wert und die Temperatur gemessen. Zu Beginn der Hellphase erfolgten auch hier Zellzählungen zur Bestimmung der Gesamtzellzahl. Zum Anfang der Dunkelphase wurde den Kulturen, mithilfe der über die OD bestimmten Biomassekonzentration, die der Aufnahmerate von $0,02 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ entsprechende Menge Glucose hinzugefügt. Die Glucose wurde dafür zunächst in Wasser gelöst und mithilfe einer Spritze über das Probenahmeventil in die Kultur überführt. Nach der Glucose-Zugabe sowie nach der Dunkelphase wurden Proben entnommen, mit einem Spritzenvorsatzfilter gefiltert und bei -20 °C gelagert, um nach den Kultivierungen die Glucosekonzentration mithilfe eines enzymatischen Testkits in den Proben bestimmen zu können. Sowohl zum Versuchsstart und -ende wurden Bestimmungen der initialen Konzentrationen von Nitrat und Phosphat durchgeführt. Der Versuch endete nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen.

3.6 Ernte mittels Zentrifugation

Nach Ende der Kultivierungen im FPA wurde ein Teil der Kultur für die anschließende Zellanalytik durch Zentrifugation geerntet. Die benötigten Kulturvolumina wurden zunächst in 5 L Laborglasflaschen gesammelt. Die Separation wurde mit einer Kühlzentrifuge durchgeführt. In vier Zentrifugenbecher wurden jeweils 500 mL der Kultur eingefüllt. Anschließend wurde das Gewicht jedes Bechers mithilfe einer Präzisionswaage austariert, sodass keine Unwucht während der Zentrifugation entsteht. Nach Einsetzen der vier Becher in die Zentrifuge wurde für 25 Minuten bei einer Umdrehungszahl von 4800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 30 mL VE-Wasser resuspendiert. Anschließend wurde erneut bei 4800 rpm für 15 Minuten zentrifugiert und auch hier der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis genügend Biomasse für die spätere Zellanalytik vorhanden war. Die Biomasse wurde in Kristallisierschalen gesammelt, mit Parafilm abgedeckt und bei -20 °C gelagert.

3.7 Gefriertrocknung

Die zuvor separierte und tiefgefrorene Biomasse wurde mithilfe einer Gefriertrocknungsanlage getrocknet. Die Haupttrocknung der Biomasse erfolgte bei -52 °C und 1 mbar Unterdruck für eine Dauer von etwa 64 Stunden. Anschließend wurde eine zweistündige Nachtrocknung bei -54 °C und 0,052 mbar durchgeführt. Die gefriergetrockneten Proben wurden mithilfe eines Mörsers zerkleinert und in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Proben wurden weiterhin bei -20 °C gelagert. Die gefriergetrocknete und gemörserte Biomasse wurde in den nachfolgenden Zellanalysen eingesetzt.

3.8 Analytische Methoden

Im Folgenden werden die analytischen Methoden, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, erläutert. Diese umfassen sowohl die einzelnen Methoden und Bestimmungen, die während der Kultivierungsversuche durchgeführt wurden, als auch die Analysen der Zellzusammensetzung der Proben aus den Kultivierungen im FPA.

3.8.1 Optische Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte mit einem Spektralphotometer. Für verschiedene Wellenlängen lässt sich damit die Extinktion einer Probe messen, also das Verhältnis zwischen einfallender und austretender Strahlung nach dem Durchqueren eines Mediums und bestimmter Weglänge [Mayerhöfer et al., 2020]. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die Konzentration dieser Probe. Im Falle einer Mikroalgenkultur wird für die Bestimmung der Biomassekonzentration die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 750$ nm gemessen. Verwendet wurden Halbmikroküvetten mit einer Weglänge von 1 cm. Es ist darauf zu achten, dass der gemessene Wert im Bereich $0,1 < OD < 0,7$ liegt, da dieser Bereich linear mit der Trockenmasse der Probe korreliert. Lag der gemessene Wert außerhalb dieses Bereichs wurde die Probe entsprechend mit VE-Wasser verdünnt.

Mithilfe des Korrelationsfaktors einer vorher angefertigten Kalibriergeraden und unter Berücksichtigung der Verdünnung konnten die Biomassekonzentrationen c_x der jeweiligen Proben ermittelt werden. Die Kalibriergerade stellt eine Beziehung zwischen der OD und der Biotrockenmasse der Mikroalgen her und wird im folgenden Kapitel näher erläutert. Die Berechnung erfolgte über Gleichung (3.1).

$$c_x = OD_{750} \cdot K \cdot D \quad (3.1)$$

mit:	c_x	Zellkonzentration	[g L ⁻¹]
	OD_{750}	Optische Dichte bei $\lambda = 750$ nm	[-]
	K	Korrelationsfaktor	[-]
	D	Verdünnungsfaktor	[-]

3.8.2 Biotrockenmasse

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse wurden zunächst die benötigten Glasmikrofaserfilter mit einer Porengröße von 1,2 μ m im Trockenschrank für mindestens 24 Stunden bei etwa 60 °C getrocknet und das Leergewicht der Filter mit einer Analysenwaage bestimmt. Ein Filter wurde danach auf der Filtervorrichtung einer Vakuumpumpe platziert und mit VE-Wasser benetzt. Anschließend wurde ein definiertes Volumen der Mikroalgenkultur aufgetragen und einige Male mit VE-Wasser gespült, um Reste wasserlöslicher Bestandteile zu lösen. Die Filter wurden erneut für mindestens 24 Stunden im Trockenschrank getrocknet und ausgewogen. Die

Berechnung der Biotrockenmassekonzentration c_{BTM} erfolgte unter Berücksichtigung des aufgetragenen Probevolumens und dem Leergewicht der ausgewogenen Filter über Gleichung (3.2).

$$c_{BTM} = \frac{m_{beladen} - m_{leer}}{V_{Probe}} \quad (3.2)$$

mit:	c_{BTM}	Biotrockenmassekonzentration	[g L ⁻¹]
	$m_{beladen}$	Gewicht des beladenen Filters	[g]
	m_{leer}	Leergewicht des Filters	[g]
	V_{Probe}	Aufgetragenes Probevolumen	[L]

In Abhängigkeit der OD lässt sich die Biotrockenmasse bei verschiedenen Verdünnungen der verwendeten Mikroalgenkultur in einem Diagramm auftragen. Für die Messpunkte kann eine Regressionsgerade erstellt werden. Der resultierende Korrelationsfaktor, das heißt die Steigung der Geraden, wird Teil der Berechnung der Biomassekonzentration auf Grundlage der optischen Dichte (Kapitel 3.8.1).

3.8.3 Volumetrische Produktivität

Die volumetrische Produktivität wird auch als Raum-Zeit-Ausbeute *RZA* bezeichnet. Mit ihr lässt sich eine Aussage darüber treffen, wie viel Biomasse zwischen zwei bekannten Zeitpunkten eines Prozesses gebildet wurde. Die Bestimmung der maximalen Produktivität einer Kultivierung kann schließlich als Vergleichswert und für die Beurteilung verschiedener Prozesse verwendet werden. Die Berechnung erfolgte mithilfe von Gleichung (3.3).

$$RZA = \frac{c_{BTM} - c_{BTM,0}}{t - t_0} \quad (3.3)$$

mit:	RZA	Raum-Zeit-Ausbeute	[g L ⁻¹ d ⁻¹]
	c_{BTM}	Biotrockenmassekonzentration zum Zeitpunkt t	[g L ⁻¹]
	$c_{BTM,0}$	Biotrockenmassekonzentration zum Zeitpunkt $t=0$	[g L ⁻¹]
	t	Beliebiger Zeitpunkt	[d]
	t_0	Start-Zeitpunkt ($t=0$)	[d]

3.8.4 pH-Wert

Die Messung des pH-Werts erfolgte mithilfe eines pH-Messgeräts. Während der Kultivierung im Multi-Cultivator fanden die pH-Messungen direkt innerhalb der Kulturgefäße statt. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die pH-Elektrode mit VE-Wasser gereinigt und trocken getupft. Bei den Versuchen im FPA wurde über das Probenahmeventil eine Probe der Kultur entnommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und dort der pH-Wert gemessen.

3.8.5 Temperaturmessung

Die Messung der Temperatur erfolgte mithilfe eines Temperatur-Messgeräts. Die Messungen erfolgten entsprechend der pH-Wert-Messungen. Während der Kultivierungen im FPA wurde zusätzlich die Temperatur des Wasserbads kontrolliert.

3.8.6 Nährstoffkonzentration

Zu jedem Versuchsanfang und -ende der Kultivierungen im FPA wurden die Nährstoffkonzentrationen von Nitrat (NO_3^-) und Phosphat (PO_4^{3-}) photometrisch mithilfe von Küvetten-Tests bestimmt. Um präzise Ergebnisse zu erhalten, müssen sich die Nährstoffkonzentrationen der Proben in den Messbereichen ($1 - 60 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$; $0,15 - 4,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ PO}_4^{3-}$) der Nährstofftests befinden.

Die aus der Kultur entnommenen Proben wurden zur Vorbereitung durch einen Spritzenvorsatzfilter gefiltert, um die Mikroalgen und mögliche andere Feststoffe vom Medium zu trennen. Entsprechend der erwarteten Nitrat- und Phosphat-Konzentrationen wurde das Filtrat verdünnt und als Probe für die Küvetten-Tests eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach den auf der Verpackung angegebenen Schritten. Die Konzentration der Nährstoffe in den Küvetten wurde direkt vom Photometer ausgegeben [Hach Lange GmbH, 2019; Hach Lange GmbH, 2020].

3.8.7 Glucosekonzentration

Bestimmungen der Glucosekonzentration wurde für alle Proben durchgeführt, denen Glucose während der Kultivierungen im Multi-Cultivator oder im FPA zugesetzt wurde. Hierfür wurde ein enzymatisches Testkit verwendet. Die Probenvorbereitung, Durchführung der Tests und die anschließende Berechnung der Glucosekonzentration erfolgten nach der dem Testkit beiliegenden Versuchsvorschrift [R-Biopharm AG, 2017].

3.8.8 Mikroskopie

Die Vorkulturen und die im Versuch verwendeten Kulturen wurden zur Kontrolle und Beurteilung ihres Zustands mithilfe eines Mikroskops untersucht. Ebenfalls wurde die im nachfolgenden Kapitel beschriebene Bestimmung der Gesamtzellzahl am Mikroskop durchgeführt. Für die allgemeine Beurteilung der Kulturen wurde an jedem Tag der Kultivierungen bei 1000-facher Vergrößerung mikroskopiert. Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde ein Vergrößerungsfaktor von 400 gewählt.

3.8.9 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer, die eine Kammertiefe von 0,02 mm besitzt. Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, erfolgte die Zählung bei einer 400-fachen Vergrößerung am Mikroskop. Zur Vorbereitung der Zählkammer musste das Deckglas bei leichtem Druck aufgeschoben werden bis dieses fest aufsaß und sich Interferenz-Linien ausgebildeten. Zwischen Deckglas und Zählkammer bildete sich so ein Kapillarspalt. Mit einer Pipette wurde eine Probe der Kultur auf den Mittelsteg der Zählkammer aufgetragen. Durch die Kapillarwirkung wurde die Probe in den Kapillarspalt gesogen und benetzte das auf dem Mittelsteg befindliche Zählgitter.

Das Zählgitter besteht aus insgesamt 25 Gruppenquadraten, die durch drei Linien voneinander getrennt werden. Die Gruppenquadrate bestehen wiederum aus 16 Kleinquadraten. Die Fläche dieser Großquadrate beträgt $0,04 \text{ mm}^2$ [Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, 2019].

Die Zählung der Zellen innerhalb dieser Großquadrate erfolgte nach einer vorher festgelegten Zähltechnik. So wurden die Quadrate in der Reihenfolge, wie sie in Abbildung 3.3a dargestellt ist, ausgezählt. Bei der Zählung der Zellen innerhalb dieser Quadrate wurden auch Zellen

berücksichtigt, die sich auf den oberen und linken Grenzlinien befanden oder diese berührten (Abb. 3.3b).

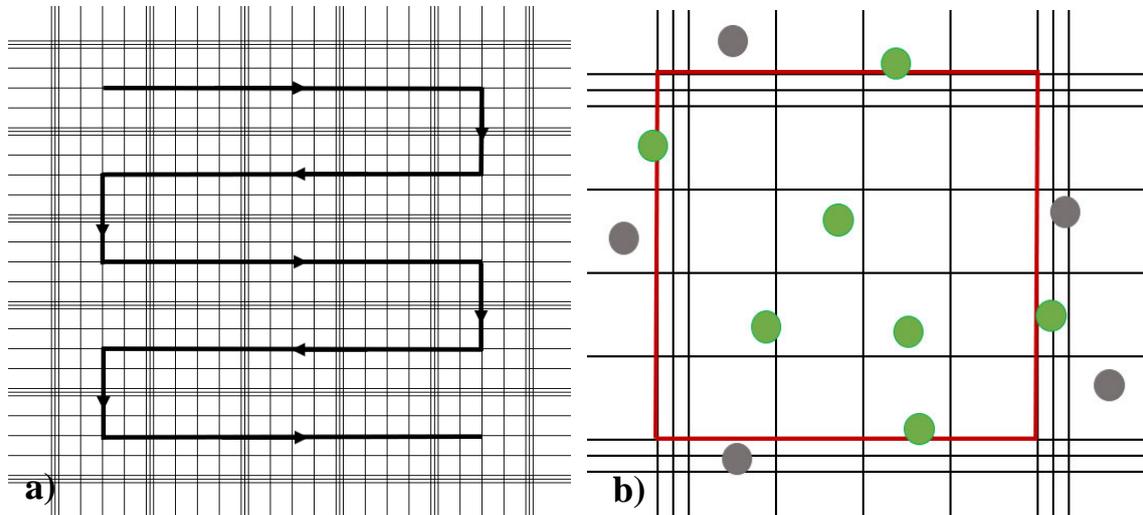


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Zählgitters der Neubauer-Zählkammer.

Die Zellzählungen mit der Neubauer-Zählkammer erfolgten unter Festlegung einer bestimmten Zähltechnik. Die Reihenfolge der Zählungen der einzelnen Gruppenquadrate erfolgte nach (a). Die Zählung innerhalb dieser Gruppenquadrate erfolgte nach (b). Es wurden dabei Zellen berücksichtigt, die sich auf den oberen und linken Grenzlinien befanden oder diese berührten [modifiziert nach Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, 2019].

Für jede Probe der Kultur wurde jeweils die Algenzellzahl und die Bakterienzellzahl ermittelt. Die Probe wurde verdünnt, sobald eine präzise Zählung durch eine zu hohe Zellkonzentration beeinträchtigt wurde. Die maximale Anzahl gezählter Zellen in einer Probe lag bei 400. Im Idealfall befand sich die Zellzahl zwischen 50 und 150. Aus den ermittelten Werten konnten die Gesamtzellzahlen $N_{Z,Ges.}$ der Proben gemäß nachstehender Gleichung (3.4) unter Berücksichtigung der Verdünnung, der Anzahl und Fläche der Gruppenquadrate sowie der Tiefe der Zählkammer berechnet werden.

$$N_{Z,Ges.} = \frac{N_Z}{N_{GQ} \cdot A_{GQ} \cdot T_{ZK}} \cdot D \quad (3.4)$$

mit:	$N_{Z,Ges.}$	Gesamtzellzahl	[-]
	N_Z	Anzahl gezählter Zellen	[-]
	N_{GQ}	Anzahl der Gruppenquadrate	[-]
	A_{GQ}	Fläche eines Gruppenquadrats	[mm ²]
	T_{ZK}	Tiefe der Zählkammer	[mm]
	D	Verdünnungsfaktor	[-]

3.8.10 Bestimmung der Zellzusammensetzung

Alle der im Folgenden beschriebenen Analysen zur Bestimmung der Zellzusammensetzung wurden für die gefriergetrocknete und gemörserte Biomasse der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung im FPA durchgeführt.

3.8.10.1 Proteingehalt

Die Bestimmung des Proteingehalts der Proben erfolgte nach der Methode nach Kjeldahl durch das Labor des Instituts für Umwelttechnik und Energiewirtschaft der Technischen Universität Hamburg. Diese Methode dient der Ermittlung von organisch gebundenem Stickstoff und Ammoniak-Stickstoff (Total Kjeldahl Nitrogen, TKN) in den Proben. Die enthaltenen Stickstoffverbindungen wurden dabei durch zweistündiges Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure in Ammoniumsulfat überführt. Durch eine Austreibung mit Natronlauge und einer Wasserdampfdestillation wurde dieses in Ammoniak umgesetzt und anschließend in Schwefelsäure aufgefangen und titriert [Scholz & Stahl, 2021]. Die damit bestimmte Massenkonzentration an Stickstoff in der Probe konnte unter Verwendung eines Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktors nach González López et al. [2010] von 5,95 in den Proteingehalt $w_{Protein}$ umgerechnet werden. Die Berechnung erfolgte mithilfe von Gleichung (3.5).

$$w_{Protein} = w_{TKN} \cdot f_{Protein} \cdot 100 \% \quad (3.5)$$

mit:	$w_{Protein}$	Proteingehalt	[%]
	w_{TKN}	Stickstoffanteil	[g g _{BM} ⁻¹]
	$f_{Protein}$	Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor	[-]

3.8.10.2 Saccharidgehalt

Die Bestimmung des Saccharidgehalts erfolgte nach der photometrischen Methode von Van Wychen und Laurens [2017], die auf der Derivatisierung der Aldehydgruppen von Monosacchariden durch 3-Methyl-2-benzothiazolinonehydrazon (MBTH) beruht. Die Methode wurde bezüglich eines vorangehenden Zellaufschlusses der Mikroalgenprobe durch 72 % (w/w) Schwefelsäure (H₂SO₄) modifiziert. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Es wurden 10 mg der gefriergetrockneten und gemörserten Probe in eine Glasküvette eingewogen, 125 μL der 72 % (w/w) Schwefelsäure hinzugegeben und diese für 1 Stunde bei 30 °C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurden 3,5 mL VE-Wasser hinzugefügt und die Probe für eine weitere Stunde bei 90 °C inkubiert. Durch die Zugabe des Wassers wurde die Konzentration der Säure auf 4 % (w/w) herabgesetzt und eine Probenkonzentration von etwa 3 g L^{-1} erreicht. Nach der Inkubationszeit wurde die so aufgeschlossene Probe durch einen Spritzenvorsatzfilter von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Von dem Filtrat war für die weitere Versuchsdurchführung eine 1:25 Verdünnung erforderlich, um den Säuregehalt und die Saccharidkonzentration der Probe herabzusetzen. Diese wurde direkt in der Glasküvette angesetzt, die für die photometrische Bestimmung verwendet wurde. Da 500 μL Probe erforderlich war, wurden 20 μL des Filtrats mit 480 μL VE-Wasser verdünnt. Es wurden weitere 500 μL einer 0,5 M Natronlauge und 500 μL des MBTH-Reaktionsgemisches hinzugegeben. Das MBTH-Gemisch bestand aus einer 1:1 (v/v) Mischung einer 1 g L^{-1} DTT- und einer 3 g L^{-1} MBTH-Lösung. Die Glasküvetten wurden verschlossen, gemischt und für 15 ± 1 Minute bei 80 °C im Heizblock inkubiert. Nach der Inkubation wurden den Proben zügig jeweils 1 mL einer Eisenlösung hinzugefügt. Die Eisenlösung setzt sich aus 0,25 M Salzsäure, 5 g L^{-1} Ammoniumeisen(III)-sulfat Dodecahydrat und 5 g L^{-1} Amidosulfonsäure zusammen. Die Lösung wurde gemischt und 10 bis 15 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden jeweils 2,5 mL VE-Wasser in die Küvetten pipettiert, die Lösung gemischt und mit dem Photometer die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 620$ nm gemessen. Um aus den gemessenen Werten den Saccharidgehalt der Proben ermitteln zu können, wurde eine Kalibriergerade aus verschiedenen Verdünnungen einer 0,25 g L^{-1} Glucose-Standardlösung erstellt, deren Konzentrationen sich im Bereich von 0 bis 0,050 g L^{-1} befanden. Die einzelnen Kalibrierlösungen wurden als Probe behandelt und jeweils in Dreifachbestimmung vermessen. Der zweistündige Zellaufschluss mittels Schwefelsäure entfiel. Die zuvor beschriebene Durchführung blieb für die weiteren Schritte gleich. Unter Berücksichtigung der eingewogenen Probenmenge, des hinzugegebenen Volumens von 3,625 mL an Schwefelsäure und Wasser während des Probenaufschlusses und der nachfolgenden 1:25 Verdünnung des Filtrats konnten die Saccharidgehalte $w_{\text{Saccharide}}$ der Mikroalgenproben mithilfe von Gleichung (3.6) und Gleichung (3.7) ermittelt werden. Die Formel zur Berechnung der Konzentration an Sacchariden $c_{\text{Saccharide}}$ ergibt sich aus der Umstellung der Geradengleichung der Kalibriergeraden. Die Kalibriergerade ist in Anhang B zu finden.

$$c_{Saccharide} = 0,05001 \text{ g L}^{-1} \cdot A_{620} - 0,00862 \text{ g L}^{-1} \quad (3.6)$$

$$w_{Saccharide} = \frac{c_{Saccharide} \cdot D \cdot V_{H_2O+H_2SO_4}}{m_{Probe}} \cdot 100 \% \quad (3.7)$$

mit:	$c_{Saccharide}$	Saccharidkonzentration	[g L ⁻¹]
	A_{620}	Absorption bei $\lambda = 620 \text{ nm}$	[-]
	$w_{Saccharide}$	Saccharidgehalt	[%]
	D	Verdünnungsfaktor	[-]
	$V_{H_2O+H_2SO_4}$	Zugesetztes Volumen an H ₂ O und H ₂ SO ₄	[L]
	m_{Probe}	Masse der eingewogenen Probe	[g]

3.8.10.3 Lipidgehalt

Zur Ermittlung des Lipidgehalts der Biomasse wurde eine Heißextraktion nach Randall und eine anschließende gravimetrische Bestimmung durchgeführt. Die Extraktion erfolgte durch ein 9:1 (v/v) Hexan-Ethanol-Gemisch.

Für die Vorbereitung des Versuchs wurden je Probe drei Extraktionsbecher mit einer kleinen Menge des Hexan-Ethanol-Gemisches gereinigt und zwei Siedesteine hinzugegeben. Zusammen mit den Extraktionshülsen wurde alles bei 55 °C für 24 Stunden im Trockenschrank gelagert. Nach dem Auskühlen der Becher und Hülsen im Exsikkator konnte ihr Leergewicht bestimmt werden. In die Extraktionshülsen wurden jeweils etwa 0,7 g Probe eingewogen und die genauen Massen notiert. Die Becher wurden mit 75 ml des Extraktionsmittels befüllt. Die Extraktion erfolgte für 30 Minuten bei 90 °C im siedenden Extraktionsmittel. Anschließend wurden die Proben für weitere 60 Minuten durch den Rücklauf des Lösungsmittels gespült. Die Extraktion wurde beendet als das Lösungsmittel nahezu verdampft war. Nach dem Ausdampfen und Abkühlen der Hülsen und der in den Bechern befindlichen Lipide wurden diese für mindestens 24 Stunden bei 55 °C im Trockenschrank getrocknet. Nach dem Auskühlen wurden erneut alle Extraktionsbecher und -hülsen ausgewogen und das Gewicht notiert. Der Lipidgehalt w_{Lipide} konnte mithilfe von Gleichung (3.8) berechnet werden.

$$w_{Lipide} = \frac{m_{B+L} - m_B}{m_{Probe}} \cdot 100 \% \quad (3.8)$$

mit:	w_{Lipide}	Lipidgehalt	[%]
	m_{B+L}	Masse des Extraktionsbechers mit den Lipiden	[g]
	m_B	Leergewicht des Bechers	[g]
	m_{Probe}	Masse der eingewogenen Probe	[g]

Wie in Kapitel 2.3.4 bereits angemerkt, gehören auch die Pigmente zu der Gruppe der Lipide. Daher erfolgte mithilfe von Gleichung (3.9) eine Berechnung des Gehalts an Lipiden ohne Pigmente $w_{Lipide,oP}$ durch die Subtraktion des Pigmentgehalts w_{Lipide} .

$$w_{Lipide,oP} = w_{Lipide} - w_{Pigmente} \quad (3.9)$$

mit:	$w_{Lipide,oP}$	Lipidgehalt ohne Pigmente	[%]
	w_{Lipide}	Lipidgehalt	[%]
	$w_{Pigmente}$	Pigmentanteil	[%]

3.8.10.4 Fettsäuren

Die Analyse der Fettsäuremethylester (FAME) der Proben erfolgte durch das Labor des Instituts für Umwelttechnik und Energiewirtschaft der Technischen Universität Hamburg. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die DFG-Einheitmethode C-VI 10a (DFG, 2000), die von der Firma ODOCON GbR für das Institut erstellt wurde. Die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung erfolgte über eine kombinierte Fettextraktion durch Umesterung der in den Proben enthaltenen Fette. Den gefriergetrockneten Proben wurden 4 mL einer Aufschlusslösung sowie 0,5 mL einer ISTD-Stammlösung-Heptan hinzugefügt. Die Aufschlusslösung setzte sich aus Methanol, Toluol, 2,2-Dimethoxypropan (DMP), Schwefelsäure und Heptan im Verhältnis 37:15:10:2:16 zusammen. Bei der ISTD-Stammlösung-Heptan handelt es sich um eine Stammlösung eines internen Standards von Nonadecansäuremethylestern, die in Heptan gelöst wurden. Die Proben wurden anschließend für 60 Minuten in ein Wasserbad mit Magnetrührer bei 80 bis 100 °C gestellt und ca. alle 5 Minuten leicht geschüttelt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur stellte sich eine Phasentrennung ein. Die obere Heptan-Phase wurde durch eine geringe Menge Natriumhydrogensulfat-Monohydrat in einem 10 mL-Messkolben filtriert und mehrfach mit

n-Heptan nachgewaschen. Zu beachten war, dass die filtrierte Lösung vollständig geklärt war. Danach wurde der Messkolben bis zur Markierung mit n-Heptan aufgefüllt. Anschließend wurde je 1 µL der Messlösung mittels eines Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektors (GC-FID) analysiert. Die prozentuale Fettsäurezusammensetzung der Proben konnte mithilfe eines internen Standards bestimmt werden [Kleeberg, n.d.].

3.8.10.5 Pigmentgehalt

Im Anschluss einer Extraktion der Pigmente mit Dimethylsulphoxid (DMSO) erfolgte eine photometrische Bestimmung des Pigmentgehalts nach den Methoden von Singh et al. [2020] und Wellburn [1994]. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Es wurden 10 mg der Probe in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und die genauen Einwaagen notiert. Nach Hinzufügen von 10 mL wurde die Probe für 15 Minuten bei 21.500 rpm mit dem Hochgeschwindigkeitshomogenisator im Lösungsmittel suspendiert. Um die Pigmente der Mikroalgen vor Licht zu schützen, wurden die Zentrifugenröhrchen von außen mit Aluminiumfolie bedeckt und für 24 Stunden rührend inkubiert. Nach der Inkubation wurde der zellfreie Überstand der Probe für die photometrische Bestimmung bei den Wellenlängen $\lambda = 665 \text{ nm}$, 649 nm und 480 nm verwendet. Damit die gemessene Absorption im Bereich von 0,3 bis 0,7 liegt, war eine entsprechende Verdünnung mit DMSO anzusetzen. Aus den gemessenen Werten konnten die Konzentrationen von Chlorophyll *a*, Chlorophyll *b* und den Carotinoiden in den Proben mithilfe der Gleichungen (3.10) bis (3.12) berechnet werden. Aus den berechneten Konzentrationen wurde anschließend über Gleichung (3.13) der Pigmentgehalt w_{Pigmente} bestimmt.

$$c_a = 12,19 \cdot A_{665} - 3,45 \cdot A_{649} \quad (3.10)$$

$$c_b = 21,99 \cdot A_{649} - 5,32 \cdot A_{665} \quad (3.11)$$

$$c_{x+c} = \frac{1000 \cdot A_{480} - 2,14 \cdot c_a - 70,16 \cdot c_b}{220} \quad (3.12)$$

mit:	c_a	Konzentration von Chlorophyll <i>a</i>	$[\mu\text{g mL}^{-1}]$
	c_b	Konzentration von Chlorophyll <i>b</i>	$[\mu\text{g mL}^{-1}]$
	c_{x+c}	Konzentration der Carotinoide	$[\mu\text{g mL}^{-1}]$
	A_{665}	Absorption bei $\lambda = 665 \text{ nm}$	[-]
	A_{649}	Absorption bei $\lambda = 649 \text{ nm}$	[-]
	A_{480}	Absorption bei $\lambda = 480 \text{ nm}$	[-]

$$w_{Pigmente} = \sum \frac{c_i \cdot D \cdot V_{DMSO}}{1000 \mu\text{g g}^{-1} \cdot m_{Probe}} \cdot 100 \% \quad (3.13)$$

mit:	$w_{Pigmente}$	Pigmentgehalt	[%]
	c_i	Konzentration c_a , c_b oder c_{x+c}	[$\mu\text{g mL}^{-1}$]
	V_{DMSO}	Hinzugefügtes Volumen DMSO	[mL]
	m_{Probe}	Masse der eingewogenen Probe	[mg]

3.8.10.6 Wassergehalt

Die Bestimmung des Wassergehalts erfolgte gravimetrisch in Dreifachbestimmung. Es wurden ausgeglühte und gesäuberte Porzellantiegel verwendet. Die benötigte Anzahl an Porzellantiegeln wurde für 24 Stunden im Trockenschrank getrocknet. Nach dem Auskühlen im Exsikkator wurde jeweils das Leergewicht bestimmt. Anschließend wurden je 0,7 g der Biomasse aus der photoautotrophen- und je 1 g Biomasse aus der mixotrophen Kultivierung in den Tiegeln eingewogen und die Massen notiert. Die Menge an eingewogener Probe orientierte sich an der Menge der vorhandenen Biomasse. Die Proben wurden bei 55 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet, im Exsikkator ausgekühlt und die Massen des Tiegels mit der darin befindlichen Probe ausgewogen. Der Wassergehalt der Proben w_{Wasser} konnte anschließend mit Gleichung (3.14) über die Differenz der Massen berechnet werden.

$$w_{Wasser} = \left(1 - \frac{m_{T+P,vor} - m_T}{m_{T+P,nach} - m_T} \right) \cdot 100 \% \quad (3.14)$$

mit:	w_{Wasser}	Wassergehalt	[%]
	m_T	Leergewicht des Tiegels	[g]
	$m_{T+P,vor}$	Masse des Tiegels mit Probe vor dem Trocknen	[g]
	$m_{T+P,nach}$	Masse des Tiegels mit Probe nach dem Trocknen	[g]

3.8.10.7 Anorganische Bestandteile

Die Bestimmung der anorganischen Bestandteile (Asche) erfolgte ebenfalls gravimetrisch. Sie basiert auf der Bestimmung des Glühverlusts in Anlehnung an die DIN 38 409-1 [DIN Deutsches Institut für Normung e. V., n.d.]. Es wurden die Porzellantiegel und Proben der vorher durchgeführten Bestimmung des Wassergehaltes verwendet. Die gesamten Proben wurden zusammen im Muffelofen über drei Temperaturschritte ausgeglüht. Im ersten Schritt wurde für 20 Minuten bei 200 °C beheizt, im nächsten Schritt für 30 Minuten bei 300 °C und anschließend für 5 Stunden bei 550 °C. Durch das langsame Hochheizen wird sichergestellt, dass die Temperatur nicht auf über 600 °C ansteigt und damit Carbonate in der Probe erfasst werden [Friderich & Scholz, 2009]. Nach dem Ausglühen wurden die Tiegel mit den darin befindlichen Glührückständen zum Abkühlen in den Exsikkator gestellt. Anschließend wurden sie ausgewogen und die Massen notiert. Der Gehalt an anorganischen Bestandteilen w_{Asche} wurde mithilfe von Gleichung (3.15) berechnet.

$$w_{Asche} = \frac{m_{T+P,vor} - m_{T+P,nach}}{m_{Probe}} \cdot 100 \% \quad (3.15)$$

mit:	w_{Asche}	Aschegehalt	[%]
	$m_{T+P,vor}$	Masse des Tiegels mit Probe vor dem Ausglühen	[g]
	$m_{T+P,nach}$	Masse des Tiegels mit Probe nach dem Ausglühen	[g]
	m_{Probe}	Masse der eingewogenen Probe	[g]

3.9 Statistische Methoden

Alle eigenständig durchgeführten Analysen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt, um die Messgenauigkeit zu erhöhen. Aus den ermittelten Daten wurden anschließend der Mittelwert \bar{x} und die Standardabweichung σ gebildet.

Der Mittelwert berechnet sich aus der Summe der einzelnen Messwerte über die Anzahl der durchgeführten Messungen gemäß Gleichung (3.16).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad (3.16)$$

mit: \bar{x} Mittelwert
 n Anzahl der Messungen
 x_i Messwert der i -ten Messung

Um bei einer Messung die Abweichung der einzelnen Messwerte vom Mittelwert und damit die Genauigkeit der Messung beschreiben zu können, wird die Standardabweichung angegeben [Eichler et al., 2016]. Die Berechnung erfolgt gemäß Gleichung (3.17).

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (3.17)$$

mit: σ Standardabweichung
 n Anzahl der Messungen
 x_i Messwert der i -ten Messung
 \bar{x} Mittelwert

4 Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der durchgeführten Versuche dargestellt. Die Kultivierungen im Multi-Cultivator und FPA werden hinsichtlich ihres Wachstumsverlaufs, der Gesamtzellzahl und dem Verlauf der Glucosekonzentration betrachtet. Anschließend werden die Zellzusammensetzungen der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung im FPA abgebildet. Sofern Doppel- oder Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden, wurde der Mittelwert gebildet und ihre Standardabweichung in den Diagrammen in Form von Fehlerbalken dargestellt.

4.1 Kultivierung im Multi-Cultivator MC-1000

Der Versuch im Multi-Cultivator umfasste neben einer photoautotrophen Kultivierung drei mixotrophe Kultivierungen, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Während der mixotrophen Kultivierungen wurde Glucose als organische Kohlenstoffquelle eingesetzt. Die drei mixotrophen Kultivierungen unterschieden sich hinsichtlich der diskontinuierlich vor der 14-stündigen Dunkelphase zugesetzten Glucose-Mengen. Diese wurden täglich für jede Kultur in Abhängigkeit der initialen Zellkonzentration berechnet. Die Kultivierungsbedingungen und die zugesetzten Glucose-Mengen wurden in Kapitel 3.4.2 bereits beschrieben. Die Kultivierungsdauer betrug sieben Tage bzw. 168 Stunden.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Kultivierung im Multi-Cultivator dargestellt. Diese umfassen die Verläufe der Zellkonzentration, der Glucosekonzentration und eine Übersicht der Entwicklung der Gesamtzellzahlen, die sich aus den gezählten Bakterien- und Algenzellen zusammensetzen. Da in Kultivierungsgefäß 8 während der ersten Dunkelphase die Begasung ausgefallen ist und dies zu signifikanten Biomasseverlusten führte, wird dieses nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Abbildung 4.1 zeigt die Verläufe der Zellkonzentrationen der vier verschiedenen Kultivierungen. In Abbildung 4.2 sind die initialen Glucosekonzentrationen dargestellt. Die Probenahme erfolgte jeweils zum Anfang und zum Ende der Dunkelphase und damit alle 14 bzw. 10 Stunden. Die Hellphasen sind im Diagramm durch einen gelben, die Dunkelphasen durch einen blauen Hintergrund gekennzeichnet.

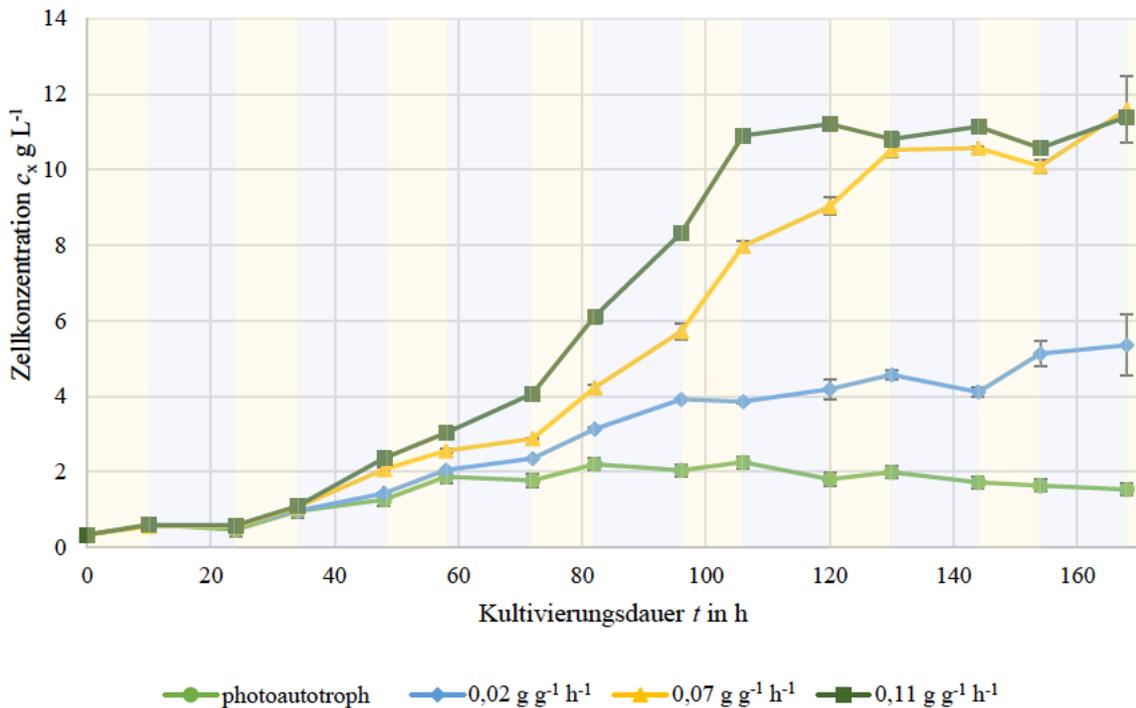


Abbildung 4.1: Verlauf der Zellkonzentrationen während der Kultivierungen im Multi-Cultivator bei diskontinuierlicher Zugabe unterschiedlicher Mengen an Glucose vor der Dunkelphase.

Die hinzugefügten Mengen an Glucose orientierten sich an untersuchten Aufnahmeraten der kultivierten *C. sorokiniana* von $0,02$; $0,07$ und $0,11 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für eine 14-stündige Dunkelphase. Die Dunkelphasen werden durch einen blauen Hintergrund und die Hellphasen durch einen gelben Hintergrund gekennzeichnet.

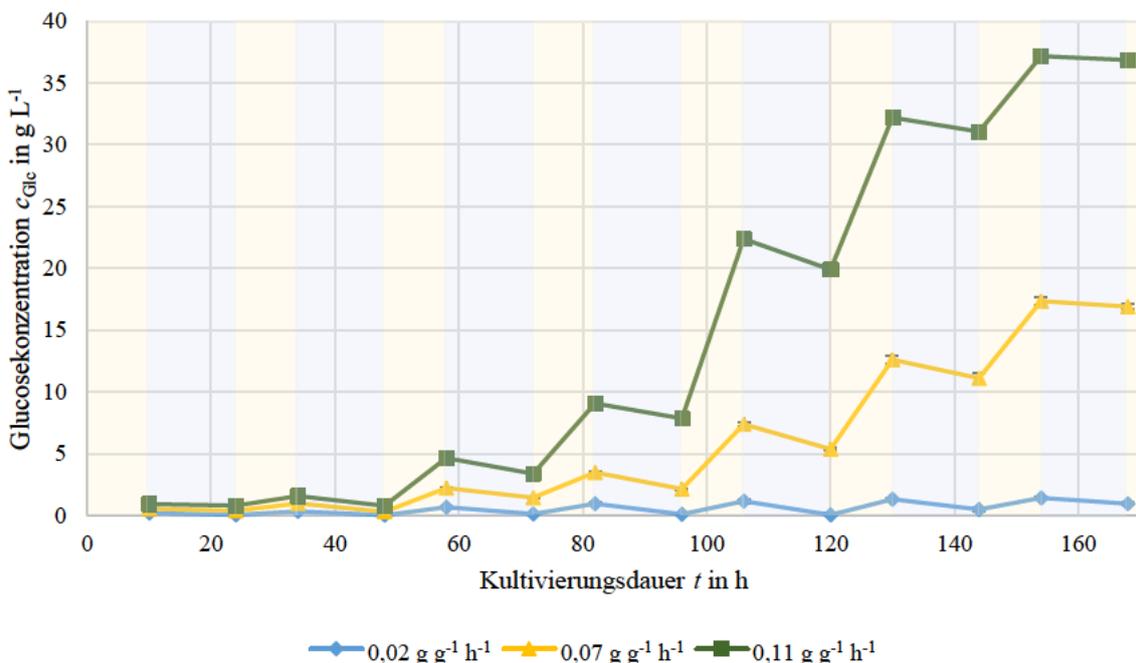


Abbildung 4.2: Verlauf der Glucosekonzentrationen während der Kultivierungen im Multi-Cultivator.

Im Multi-Cultivator wurden drei mixotrophe Kultivierungen durchgeführt. Es erfolgte eine diskontinuierliche Zugabe unterschiedlicher Mengen an Glucose vor der 14-stündigen Dunkelphase. Die initialen Glucosekonzentrationen vor und nach der Dunkelphase wurden mithilfe eines enzymatischen Testkits bestimmt. Die Dunkelphasen werden durch einen blauen Hintergrund und die Hellphasen durch einen gelben Hintergrund gekennzeichnet.

Die Zellkonzentrationen wurden mithilfe der gemessenen OD und dem Korrelationsfaktor der Kalibriergeraden, wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben, ermittelt. Die Kalibriergerade der *Chlorella sorokiniana* ist in Anhang A zu finden. Der Korrelationsfaktor beträgt 0,4324. Um die genauen Start- und Endkonzentrationen der Kultivierungen festzustellen, wurden zusätzlich Bestimmungen der Trockenmasse nach Kapitel 3.8.2 durchgeführt. Die Startkonzentration beträgt demnach für alle Kulturen $0,28 \text{ g L}^{-1}$. Die Zellkonzentration auf Grundlage der OD ergibt eine Startkonzentration von $0,34 \text{ g L}^{-1}$. Das Zellwachstum verstärkt sich bei höherer Glucosekonzentration und ist damit bei einer Zugabe von $0,07$ und $0,11 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ um ein Vielfaches höher als bei der photoautotrophen Kultivierung. Nach vier (106 h) bzw. fünf Tagen (130 h) erreichen diese Kulturen die maximale Zellkonzentration und stagnieren im weiteren Verlauf. Die durchschnittliche volumetrische Produktivität ist mit $1,18$ und $1,25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ähnlich hoch. Mit dem photoautotrophen Wachstum wird demgegenüber eine durchschnittliche Produktivität von $0,38 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht. Die durchschnittliche Produktivität der Kultur, der $0,02 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose hinzugefügt wurden, beträgt $0,67 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Betrachtet man den Verlauf der photoautotrophen Kultivierung, lässt sich ein Verlust der Biomasse während der Dunkelphasen von durchschnittlich etwa 12 % beobachten. Es wird ein Rückgang der Zellkonzentration nach etwa vier Tagen (106 h) festgestellt. Die mixotrophen Kultivierungen weisen einen fast durchgängigen Biomassegewinn auf, sofern nicht bereits die maximale Biomassekonzentration erreicht wurde. Lediglich bei der Kultivierung der $0,02 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose-Zugabe ist bei der Probenahme nach 106 Stunden und 144 Stunden ein Biomasseverlust während der Dunkelphase zu verzeichnen.

Zum Ende der Kultivierungen beträgt die Biotrockenmassekonzentration der photoautotrophen Kultivierung etwa $1,79 \text{ g L}^{-1}$. Die Kulturen der geringsten hinzugefügten Glucose-Menge von $0,02 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreichen eine Konzentration von etwa $4,13 \text{ g L}^{-1}$. Bei Zugabe von $0,07 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ steigt die Biotrockenmassekonzentration auf $8,50 \text{ g L}^{-1}$ und mit $0,11 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $7,30 \text{ g L}^{-1}$ an. Die mittels OD berechneten Zellkonzentrationen der mixotrophen Kultivierungen sind mit $5,35 \text{ g L}^{-1}$, $11,59 \text{ g L}^{-1}$ und $10,40 \text{ g L}^{-1}$ jedoch deutlich höher als die tatsächlichen Konzentrationen. Hinsichtlich der photoautotrophen Kultivierung wird mit $1,45 \text{ g L}^{-1}$ eine geringere Konzentration erzielt.

Die Glucosekonzentrationen wurden jeweils vor und nach der Dunkelphase mithilfe eines enzymatischen Testkits bestimmt. Die geringste hinzugegebene Glucose-Menge wird während der Dunkelphase fast vollständig von den Mikroalgen verbraucht. Zum Ende der Kultivierung

wird jedoch am Ende der Dunkelperiode noch eine geringe Konzentration gemessen. Bei den höheren Glucose-Dosierungen ist über den gesamten Kultivierungsverlauf eine Akkumulation der Glucose im Medium zu beobachten. Die initiale Glucosekonzentration wird immer größer, wohingegen nur ein geringer Teil der Glucose während der Dunkelperiode verbraucht wird. So wird bei einer Glucose-Zugabe von $0,07 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ am Ende der Kultivierung eine Konzentration von etwa $17 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ L}^{-1}$ gemessen, bei einer Zugabe von $0,11 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ beträgt diese am Ende mit $33 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ L}^{-1}$ nahezu das Zweifache.

In Abbildung 4.3 ist der Verlauf des pH-Werts, im Bereich von 6 bis 8,5, für jede der Kultivierungen und die durchschnittliche Temperatur über die gesamte Kultivierungsdauer dargestellt. Zu Beginn liegt der pH-Wert bei 6,04. Bei fortlaufender Kultivierung steigt dieser in jeder Kultur während der Hellphasen deutlich an und fällt während der Dunkelperioden wieder. Je mehr Glucose den Kulturen hinzugefügt wird, desto höher ist der pH-Wert der Kultur. Während der pH-Wert der photoautotrophen Kultivierung insgesamt über den gesamten Kultivierungsverlauf ansteigt, ist bei den mixotrophen Kultivierungen ab einem bestimmten Zeitpunkt ein leichter Abfall zu beobachten. Zu jedem Anfang der Dunkelperiode wird eine Temperatur etwa $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und zu jedem Ende der Dunkelperiode von etwa $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessen.

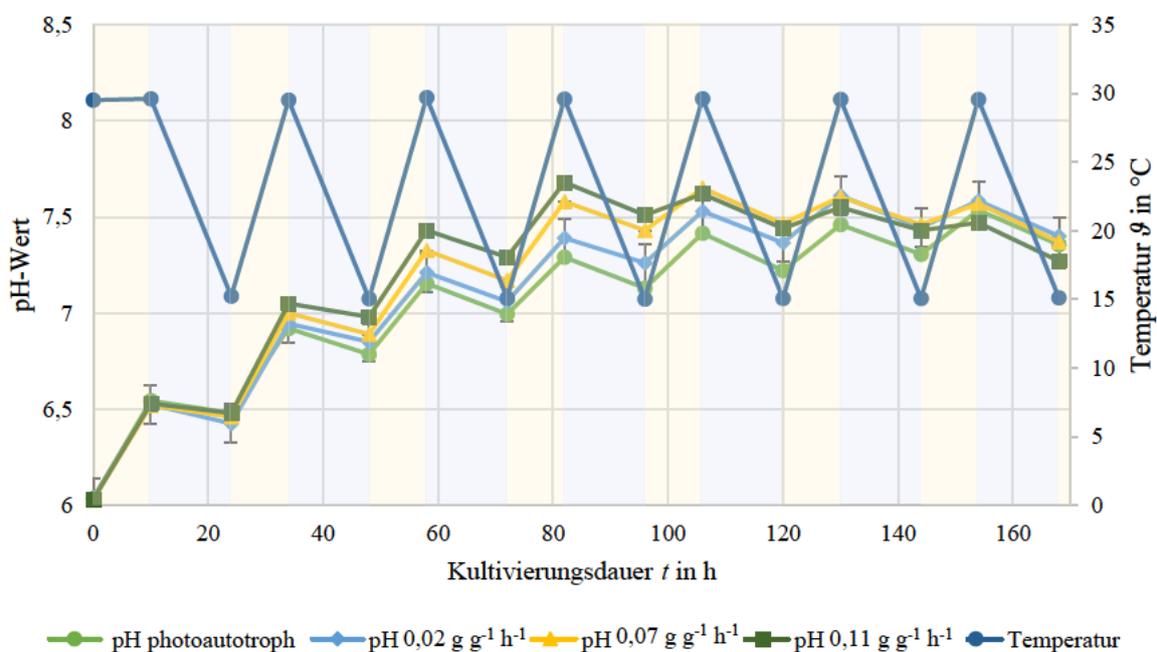


Abbildung 4.3: Verlauf des pH-Werts und der Temperatur während der Kultivierungen im Multi-Cultivator bei diskontinuierlicher Zugabe unterschiedlicher Mengen an Glucose vor der Dunkelperiode.

Die Entwicklung der Gesamtzellzahlen, die zusätzlich in Algen- und Bakterienzellzahl unterteilt ist, ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

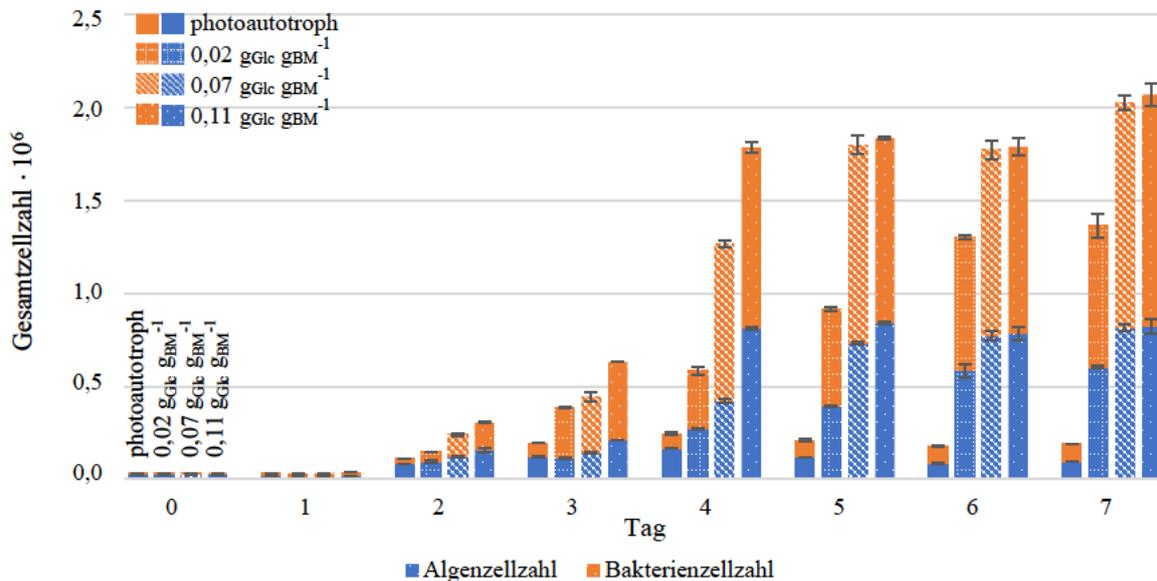


Abbildung 4.4: Entwicklung der Gesamtzellzahlen der Kultivierungen im Multi-Cultivator, welche in Algen- und Bakterienzellzahl unterteilt werden.

Die Gesamtzellzahlen ergaben sich aus Zählungen der Algen- und Bakterienzellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer.

Zu erkennen ist, dass sowohl die Algenzellzahlen als auch die Bakterienzellzahlen über den gesamten Kultivierungsverlauf ansteigen. Die Stagnation der Kultivierungen bei 0,07 und 0,11 $\text{gGlc g}_{\text{BM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ Glucose-Zugabe durch das Erreichen der maximalen Zellkonzentration wird jedoch auch deutlich. Besonders auffällig ist der Unterschied der mixotrophen Kultivierungen im Vergleich zur photoautotrophen Kultivierung. Die Gesamtzellzahl ist hier deutlich geringer und es lässt sich kein signifikantes Bakterienwachstum beobachten. Die größten Bakterienzellzahlen werden bei 0,07 und 0,11 $\text{gGlc g}_{\text{BM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ Glucose-Zugabe gezählt. Die der 0,02 $\text{gGlc g}_{\text{BM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ Glucose-Zugabe ist etwas geringer. Betrachtet man die Algenzellzahlen im Verhältnis zu den Bakterienzellzahlen, lassen sich keine großen Unterschiede feststellen. Bei der photoautotrophen Kultivierung ist das Verhältnis ungefähr ausgeglichen. Mit den Glucose-Mengen der mixotrophen Kultivierungen steigen auch die Verhältnisse auf etwa 1:1,3 bis 1:1,5 an. Das Bakterienwachstum verstärkt sich etwa um den Faktor 12.

Über den gesamten Kultivierungsverlauf wurden Mikroskopaufnahmen für jede der vier Kultivierungen gemacht und damit die Beschaffenheit und Veränderungen der Kulturen dokumentiert. In Abbildung 4.5 werden die Kulturen der verschiedenen Kultivierungen an Tag 1, 4 und 7 abgebildet.

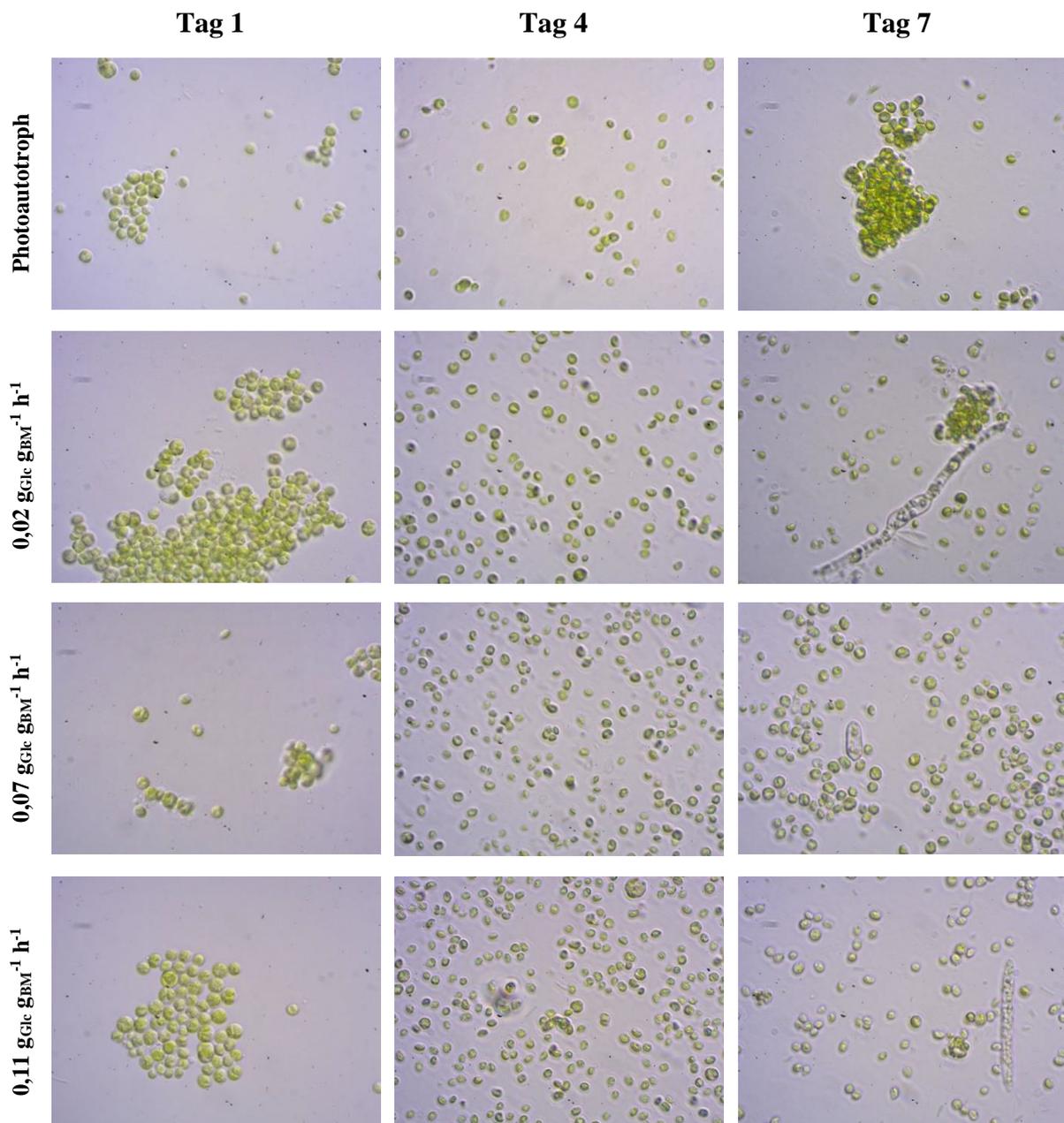


Abbildung 4.5: Lichtmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Kulturen aus den Kultivierungen in Multi-Cultivator von *C. sorokiniana* nach Tag 1, 4 und 7 bei 1000facher Vergrößerung.

Bei Vergleich der lichtmikroskopischen Aufnahmen der verschiedenen Kulturen werden vor allem an Tag 4 Unterschiede in der Zellanzahl sichtbar. Je höher die hinzugefügte Menge an Glucose ist, desto mehr Mikroalgen sind erkennbar. Auffällig ist zudem, dass sich die Mikroalgen an Tag 1 oft als Agglomerate zusammenlagern. Bei der photoautotrophen Kultivierung sind solche Agglomerate auch am Ende noch vorzufinden. Auch bei der geringsten Glucose-Menge der mixotrophen Kultivierung können noch Agglomerate beobachtet werden. Bei der Zugabe höherer Glucose-Mengen liegen hauptsächlich einzelne Zellen vor.

Eine weitere Auffälligkeit ist das Vorhandensein von Kontaminationen in den mixotrophen Kulturen der 0,07 und 0,11 $\text{g}_{\text{Glc}} \text{g}_{\text{BM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ Glucose-Zugabe. Oftmals handelt es sich bei den Kontaminationen um durchsichtige Organismen, die einige Mikroalgenzellen in ihr Inneres aufnehmen. Zu beobachten ist, dass auch im Falle der Glucose-Zugabe von 0,02 $\text{g}_{\text{Glc}} \text{g}_{\text{BM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ diese Kontaminationen gefunden werden, jedoch in geringerem Umfang als bei den höheren Glucose-Mengen. Dort sind noch weitere Formen von Organismen zu finden. Auch die Anzahl der Bakterien erhöht sich.

Nach der Kultivierung im Multi-Cultivator wurden zusätzlich Aufnahmen von den Kulturgefäßen und den Filtern der Biotrockenmasse-Bestimmung gemacht. Diese sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

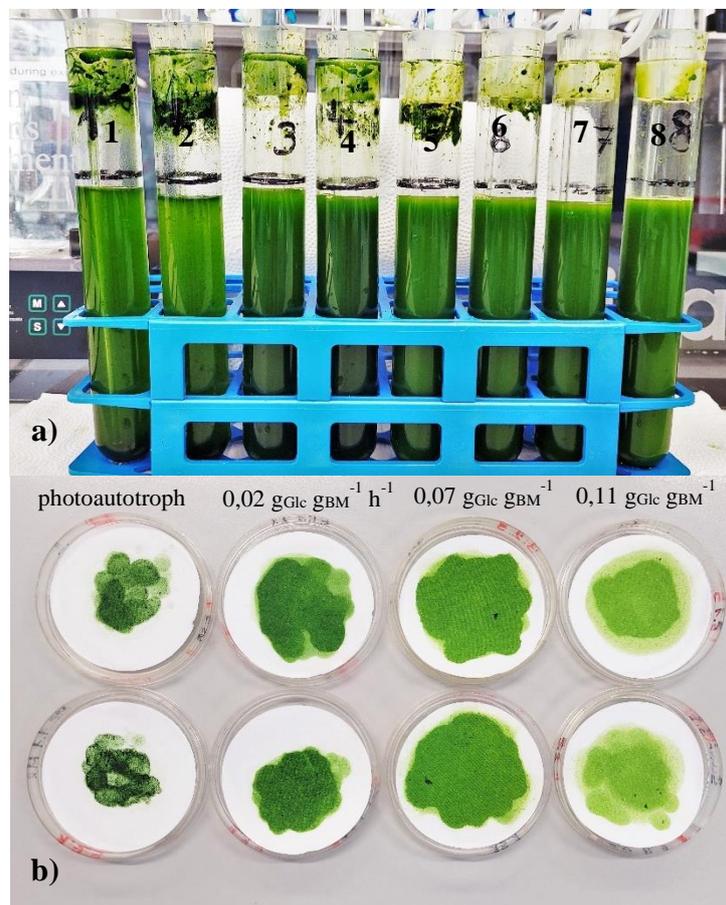


Abbildung 4.6: Aufnahmen der Kulturgefäße (a) und der Filter der Biotrockenmasse-Bestimmung (b) nach der Kultivierung von *Chlorella sorokiniana* im Multi-Cultivator. Die Kulturgefäße und Filter wurden in der entsprechenden Reihenfolge (Kulturgefäß 1 bis 8) aufgereiht. Die den Kulturen hinzugefügten Glucose-Mengen während der Kultivierung nehmen von rechts nach links zu.

Auffällig sind hier die Farben der unterschiedlichen Kultivierungen auf den Filtern (Abb. 4.6 b). Während die Mikroalgen bei der photoautotrophen Kultivierung eine dunkelgrüne Farbe aufweisen, ist diese bei der höchsten hinzugefügten Glucose-Menge hellgrün bis gelblich. Bei der photoautotrophen Kultivierung lässt sich auf den Filtern die vorher beschriebene Agglomerat-Bildung erkennen. Die Farbe der Kulturen 3 und 4 bei $0,02 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose-Zugabe ähneln in der Farbe der photoautotrophen Kultur. Dies ist auch an den Kulturgefäßen zu erkennen (Abb. 4.6a). Die Kulturen in den Gefäßen 3 und 4 sind sichtlich dunkler als alle anderen Kulturen. Die Farbe der Kulturen 5 und 6 der $0,07 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose-Zugabe ist farblich zwischen den anderen beiden mixotrophen Kulturen einzuordnen.

4.2 Kultivierung im FPA

Auf Grundlage der Ergebnisse aus dem vorangegangenen Versuch im Multi-Cultivator wurde eine photoautotrophe und eine mixotrophe Kultivierung in einem 30 L FPA durchgeführt. Das Ziel, nur so viel Glucose hinzuzufügen, dass diese vollständig von den Mikroalgen während der 14-stündigen Dunkelphase verbraucht wird, konnte mit einer Glucose-Zugabe von $0,02 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht werden. Die Kontaminationsrate und das Bakterienwachstum waren ebenfalls geringer als bei den anderen beiden mixotrophen Kultivierungen und die Beschaffenheit der Kulturen änderte sich kaum.

Die Kultivierungsbedingungen wurden in Kapitel 3.5.2 beschrieben und decken sich überwiegend mit den Bedingungen der Kultivierung im Multi-Cultivator. Die Kultivierungsdauer betrug ebenfalls sieben Tage bzw. 168 Stunden.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Kultivierungen im FPA dargestellt. Diese umfassen, wie im vorherigen Kapitel, die Verläufe der Zellkonzentrationen, der Glucosekonzentrationen und eine Übersicht der Entwicklung der Gesamtzellzahlen, die sich aus Bakterien- und Algenzellen zusammensetzen. Die Kultur, der diskontinuierlich $0,02 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose vor der Dunkelphase hinzugefügt wurde, wird nachfolgend „mixotroph“ bezeichnet.

Abbildung 4.7 zeigt die Verläufe der Zellkonzentrationen der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung. In Abbildung 4.8 sind die initialen Glucosekonzentrationen dargestellt. Die Probenahme erfolgte jeweils zum Anfang und zum Ende der Dunkelphase und damit alle 14 bzw. 10 Stunden. Die Hellphasen sind im Diagramm durch einen gelben, die Dunkelphasen durch einen blauen Hintergrund gekennzeichnet.

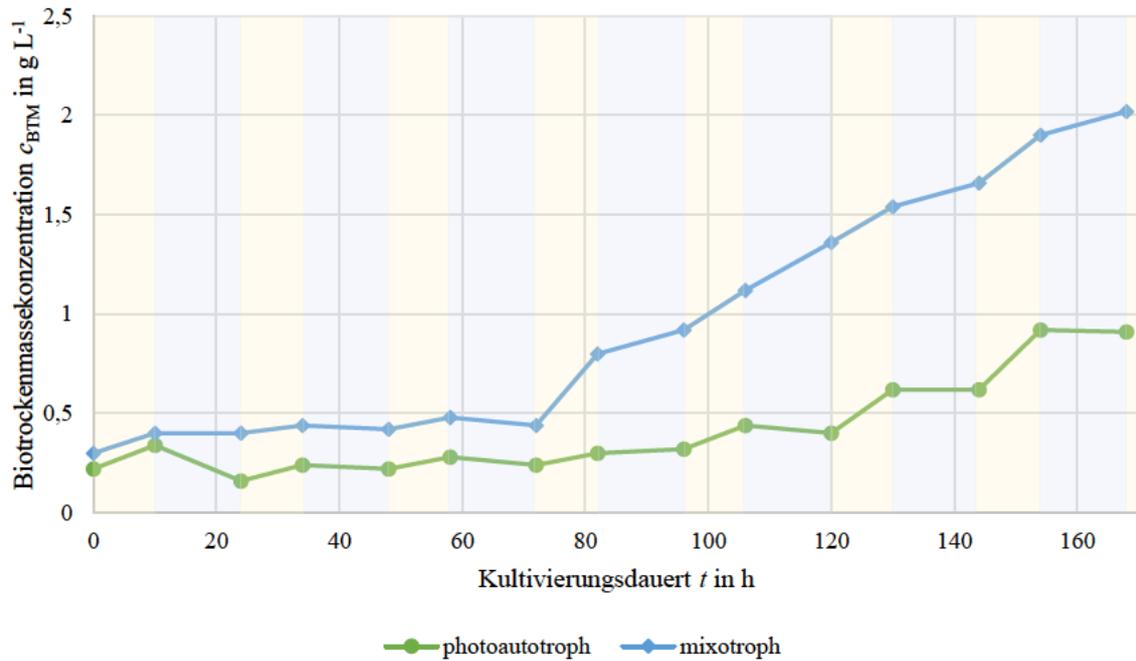


Abbildung 4.7: Verlauf der Biotrockenmassekonzentrationen während der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung im FPA.

Die mixotrophe Kultivierung erfolgte durch eine diskontinuierliche Zugabe von $0,02 \text{ g}_{Glc} \text{ g}_{BM}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose vor der 14-stündigen Dunkelphase. Die Dunkelphasen werden durch einen blauen Hintergrund und die Hellphasen durch einen gelben Hintergrund gekennzeichnet.

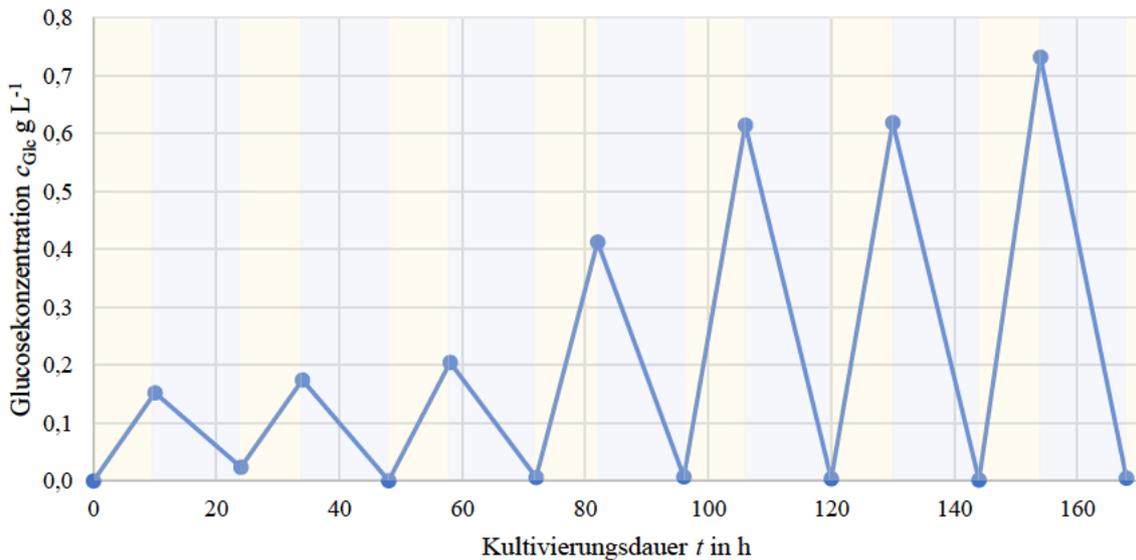


Abbildung 4.8: Verlauf der Glucosekonzentrationen während der mixotrophen Kultivierung im FPA.

Es erfolgte eine diskontinuierliche Zugabe von $0,02 \text{ g}_{Glc} \text{ g}_{BM}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose vor der 14-stündigen Dunkelphase. Die initialen Glucosekonzentrationen vor und nach der Dunkelphase wurden mithilfe eines enzymatischen Testkits bestimmt. Die Dunkelphasen werden durch einen blauen Hintergrund und die Hellphasen durch einen gelben Hintergrund gekennzeichnet.

Die Biotrockenmassekonzentrationen wurden durch die Bestimmung der Trockenmasse nach Kapitel 3.8.2 ermittelt. Die Startkonzentration der photoautotrophen Kultivierung liegt bei $0,22 \text{ g L}^{-1}$ und die der mixotrophen Kultivierung bei $0,30 \text{ g L}^{-1}$. An den Verläufen ist zu erkennen, dass die Mikroalgen erst nach etwa drei Tage höhere Wachstumsraten erreichen. Während der ersten Nacht der photoautotrophen Kultivierung geht ein erheblicher Teil der Mikroalgen verloren. In fast jeder Dunkelphase sind bei dieser Kultivierung Biomasseverluste zu verzeichnen. Diese liegen im Durchschnitt bei etwa 14 %. Die Kultur erreicht eine durchschnittliche Produktivität von $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und nach sieben Tagen eine Endkonzentration von $0,91 \text{ g L}^{-1}$. Unter photoautotrophen Bedingungen kann die *Chlorella sorokiniana* damit ihre Biomasse etwa vervierfachen. Während der mixotrophen Kultivierung wird trotz der nächtlichen Glucose-Zugabe in zwei Nächten ein Biomasseverlust festgestellt. Diese sind jedoch innerhalb der ersten drei Tage bei geringerer Wachstumsrate zu verzeichnen. Ab einer Kultivierungsdauer von 72 h stieg das Wachstum signifikant an. Während der Dunkelphasen ist ebenfalls ein Wachstum zu verzeichnen, welches mit der Hellphase vergleichbar ist. Der Verlauf der Zellkonzentration ist dort nahezu linear. Die Kultur erreicht eine durchschnittliche Produktivität von $0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und eine Endkonzentration von $2,02 \text{ g L}^{-1}$. Unter mixotrophen Bedingungen kann die *Chlorella sorokiniana* somit ihre Biomasse um den Faktor 12,6 steigern. Das Zellwachstum kann im Vergleich zur photoautotrophen Kultivierung mehr als verdoppelt werden.

Die Menge der vor der Dunkelphase hinzugefügten Glucose wurde mithilfe der OD und des Korrelationsfaktors der Kalibriergeraden für *C. sorokiniana* ermittelt. Die Glucosekonzentrationen wurden jeweils vor und nach der Dunkelphase mithilfe eines enzymatischen Testkits bestimmt. Die Glucose wird von den Mikroalgen fast über den gesamten Kultivierungsverlauf vollständig während der Dunkelphasen verbraucht. Nur nach der ersten Nacht kann eine sehr geringe Konzentration an Glucose gemessen werden. Auch hier bestätigen sich die Ergebnisse der Kultivierungen im Multi-Cultivator.

In Abbildung 4.9 sind der Verlauf des pH-Werts, im Bereich von 6 bis 8,5 und die durchschnittliche Temperatur über die gesamte Kultivierungsdauer der photoautotrophen und der mixotrophen Kultivierung dargestellt.

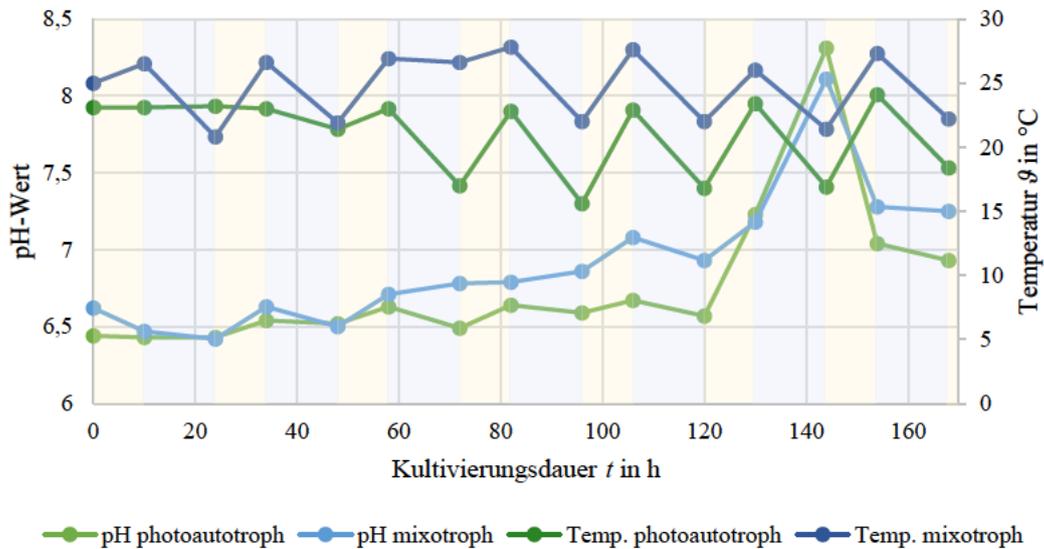


Abbildung 4.9: Verlauf des pH-Werts und der Temperatur während der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung im FPA.
Die Dunkelphasen werden durch einen blauen Hintergrund und die Hellphasen durch einen gelben Hintergrund gekennzeichnet.

Zu Beginn liegt der pH-Wert der photoautotrophen Kultivierung bei 6,44 und der der mixotrophen Kultivierung bei 6,62. Bei fortlaufender Kultivierung steigt dieser insgesamt an, bei der mixotrophen Kultivierung dabei höher als bei der photoautotrophen Kultivierung. In den meisten Dunkelphasen, vor allem in denen der photoautotrophen Kultivierung, fällt der pH-Wert wieder ab. Besonders auffällig ist der Anstieg des pH-Werts beider Kulturen nach 144 Stunden auf über 8 und der anschließende rasante Abfall während der Dunkelphase. Der pH-Wert der photoautotrophen Kultivierung erreicht am Ende der Kultivierung einen Wert von 6,93 und der der mixotrophen Kultivierung einen Wert von 7,25.

Die Temperaturverläufe sind unregelmäßig. Die Temperaturen während der mixotrophen Kultivierung liegen höher als die der photoautotrophen Kultivierung.

Die Entwicklung der Gesamtzellzahlen beider Kultivierungen, die zusätzlich in Algen- und Bakterienzellzahl unterteilt wurden, ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

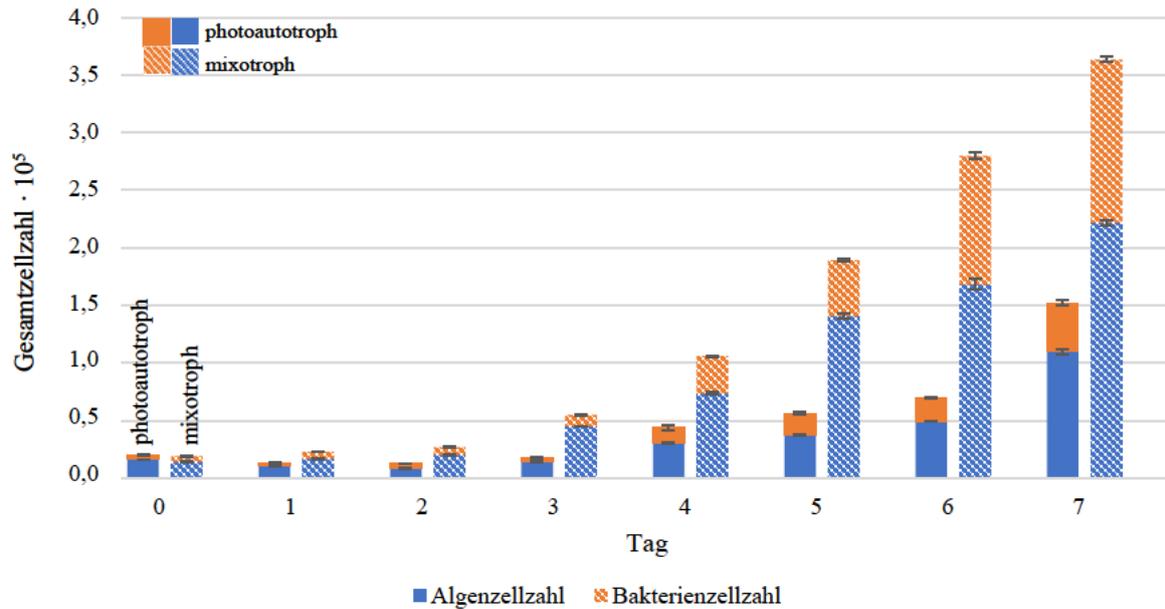


Abbildung 4.10: Entwicklung der Gesamtzellzahlen der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung im FPA, welche in Algen- und Bakterienzellzahl unterteilt werden.

Die Gesamtzellzahlen ergaben sich aus Zählungen der Algen- und Bakterienzellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer.

Zu erkennen ist, dass sich sowohl die Algen als auch die Bakterien über den gesamten Kultivierungsverlauf vermehren. Der Unterschied der Gesamtzellzahlen zwischen photoautotropher und mixotropher Kultivierung wird dabei deutlich. Zu jedem Zeitpunkt der Kultivierungen werden mehr Algen als Bakterien gezählt. Das Verhältnis von Algen zu Bakterien ist bei der photoautotrophen Kultivierung geringer als bei der mixotrophen Kultivierung. Der Unterschied ist jedoch mit 1:0,4 und 1:0,7 nicht erheblich. Unter Berücksichtigung der Mikroalgenkonzentration steigert sich das Bakterienwachstum um den Faktor 1,7.

Über den gesamten Kultivierungsverlauf wurden lichtmikroskopische Aufnahmen beider Kulturen gemacht und damit die Beschaffenheit und Veränderungen dokumentiert. In Abbildung 4.11 werden die Kulturen der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung an Tag 1, 4 und 7 abgebildet.

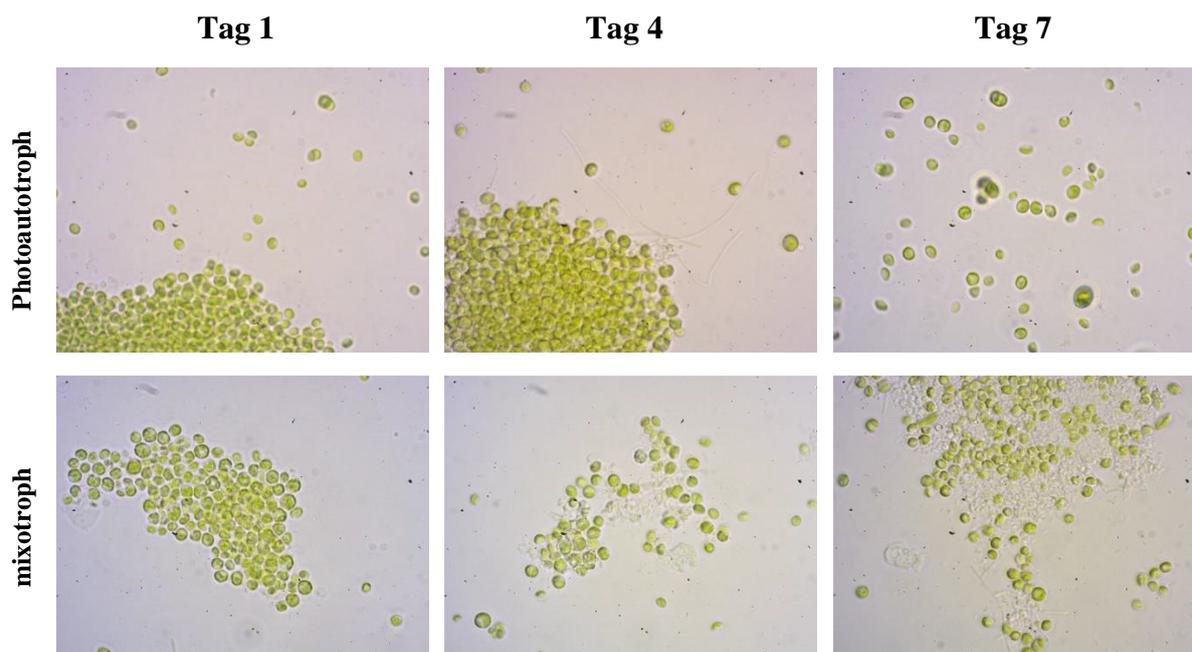


Abbildung 4.11: Lichtmikroskopische Aufnahmen der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung von *C. sorokiniana* im FPA nach Tag 1, 4 und 7 bei 1000facher Vergrößerung.

Bei Vergleich der lichtmikroskopischen Aufnahmen fallen vor allem die Agglomerate der mixotrophen Kultivierung an Tag 7 auf, die nicht nur aus den grünen Zellen zusammengesetzt sind, sondern teilweise aus farb- und strukturloser Substanz. Die Entwicklung der Mikroalgen in beiden Kultivierungen verhält sich ähnlich. Jedoch werden während der mixotrophen Kultivierung nach dem dritten Tag einzelne Kontaminationen durch andere Mikroalgenarten und Organismen festgestellt. Diese Kontaminationen treten im weiteren Verlauf der Kultivierung häufiger auf und es bilden sich solche Agglomerate aus, wie sie an Tag 7 zu sehen sind.

4.3 Bestimmung der Zellzusammensetzung

Im Anschluss an die photoautotrophe und mixotrophe Kultivierung der Mikroalge *Chlorella sorokiniana* im FPA erfolgte die Bestimmung der Zellzusammensetzung der geernteten und gefriergetrockneten Biomasse. Es wurden dafür verschiedene Analysen durchgeführt, mit denen der Gehalt an Proteinen, Sacchariden, Lipiden, Pigmenten und anorganischen Bestandteilen in den Mikroalgen ermittelt werden konnte. Neben dem Anteil an Lipiden wurde auch die Zusammensetzung der Fettsäuren analysiert. Die einzelnen Methoden wurden in Kapitel 3.8 beschrieben. Die Ergebnisse der Analysen beider Kultivierungsarten werden nachfolgend dargestellt.

In Abbildung 4.12 sind die Zellzusammensetzungen aus der photoautotrophen und der mixotrophen Kultivierung abgebildet. Zum direkten Vergleich, wie sich die Anteile der einzelnen Bestandteile von photoautotropher zu mixotropher Kultivierung verändern, wurden die Ergebnisse beider Kulturen für jede Komponente gegenübergestellt (Abb. 4.12a). Zudem wurden die Zellbestandteile getrennt für jede Kultivierung zusammengetragen, um einen Überblick über die Zusammensetzung der phototroph und mixotroph kultivierten Mikroalgen zu schaffen (Abb. 4.12b). Die Anteile der einzelnen biochemischen Komponenten beziehen sich auf die Biotrockenmasse. Der ermittelte Wassergehalt der Proben wurde für jede Komponente herausgerechnet.

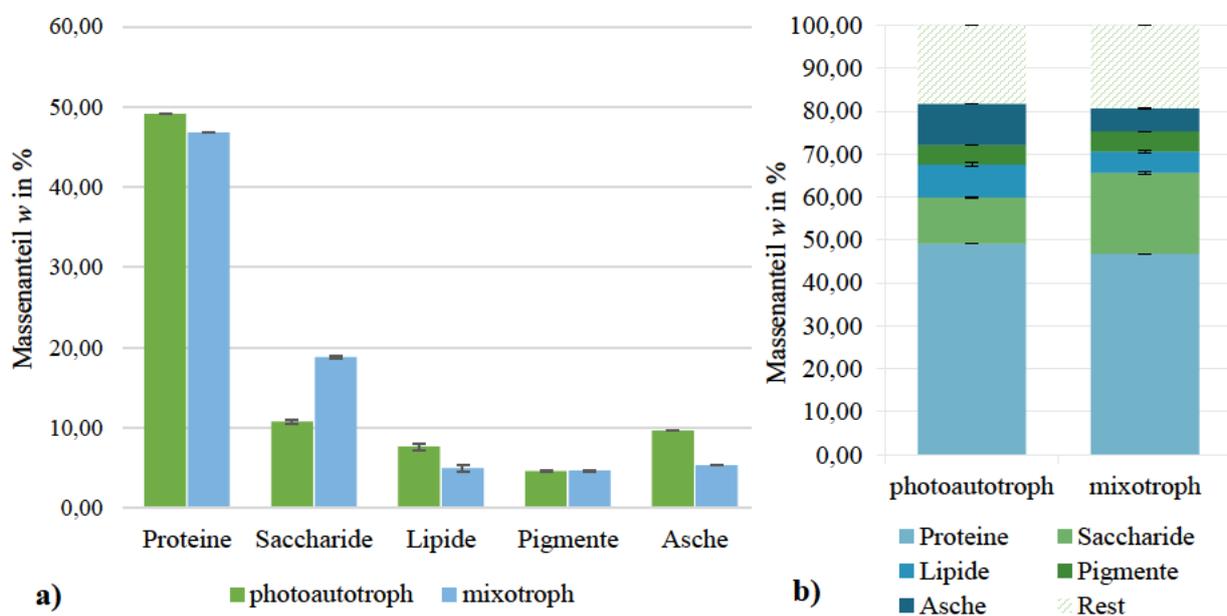


Abbildung 4.12: Zellzusammensetzung der Biomasse von *C. sorokiniana* nach photoautotropher und mixotropher Kultivierung im FPA.

Die prozentualen Anteile der einzelnen biochemischen Komponenten aus photoautotropher und mixotropher Kultivierung wurden gegenübergestellt (a) und die Zusammensetzung der Mikroalgen der jeweiligen Kultivierung zusammengetragen (b).

Tabelle 4.1 gibt Aufschluss über die genaue prozentuale Verteilung der einzelnen biochemischen Komponenten der *Chlorella sorokiniana*.

Tabelle 4.1: Zellzusammensetzung der Biomasse von *C. sorokiniana* nach photoautotropher und mixotropher Kultivierung im FPA.

Kultivierung	Massenanteil <i>w</i> in %					
	Proteine	Saccharide	Lipide	Pigmente	Asche	Rest
photoautotroph	49,13	10,76	7,65	4,61	9,65	18,19
mixotroph	46,84	18,81	4,97	4,67	5,38	19,34

Insgesamt können zu über 80 % der Biomasse von *C. sorokiniana* in den Analysen der biochemischen Komponenten bestimmt werden. Vergleicht man die Anteile der einzelnen Komponenten aus der phototrophen und mixotrophen Kultivierung miteinander, sind einige Unterschiede erkennbar. Der Saccharidgehalt der mixotrophen Kultur ist mit 18,81 % deutlich höher, als der der photoautotrophen Kultur mit 10,76 %. Der Lipidgehalt sinkt von 7,65 % auf 4,97 % und auch der Aschehalt nimmt von 9,65 auf 5,38 % ab. Der Proteingehalt der photoautotrophen Kultur liegt mit 49,13 % etwas höher als der Gehalt von 46,84 % der mixotrophen Kultur. Die Pigmentanteile von 4,61 und 4,76 % sind nahezu gleich. Die Analyse ergibt für die mixotrophe Kultur einen geringfügig höheren Pigmentanteil. Der Anteil an Komponenten, der nicht durch die Analysen erfasst werden konnte, ist ebenfalls in beiden Kulturen ähnlich.

Die Analyse der Fettsäuren erfolgte nach Kapitel 3.8.10.4. In der Probe der photoautotrophen Kultivierung wurde ein Fettsäureanteil von etwa 5,62 mg g⁻¹ nachgewiesen, in der Probe der mixotrophen Kultivierung ein Anteil von etwa 5,55 mg g⁻¹. In Abbildung 4.13 wird die prozentuale Verteilung der einzelnen Fettsäuren zwischen photoautotropher und mixotropher Kultivierung verglichen (Abb. 4.13a) und die Zusammensetzung der Fettsäuren in den jeweiligen Proben dargestellt (Abb. 4.13b). Die Bezeichnungen der einzelnen Fettsäuren sind in Tabelle 4.2 zu finden. Die genaue prozentuale Verteilung kann in Anhang C eingesehen werden.

Tabelle 4.2: Bezeichnungen der mittels FAME-Analyse nachgewiesenen Fettsäuren in den Proben der phototrophen und mixotrophen Kultivierung.

Anzahl der C-Atome: Doppelbindungen	Chemische Bezeichnung	Trivialname
16:0	Hexadecansäure	Palmitinsäure
16:1	cis-9-Hexadecensäure	Palmitoleinsäure
17:0	Heptadecansäure	Margarinsäure
18:0	Octadecansäure	Stearinsäure
18:1 n9 trans	trans-9-Octadecensäure	Elaidinsäure
18:1 n9 cis	cis-9-Octadecensäure	Ölsäure
18:1 n7	11-Octadecensäure	Vaccensäure
18:2 n6 cis	cis-9,cis-12-Octadecadiensäure	Linolsäure
18:3 n6	cis,cis,cis-6,9,12-Octadecatriensäure	γ-Linolensäure
18:3 n3	cis,cis,cis-9,12,15-Octadecatriensäure	α-Linolensäure
24:0	Tetracosansäure	Lignocerinsäure

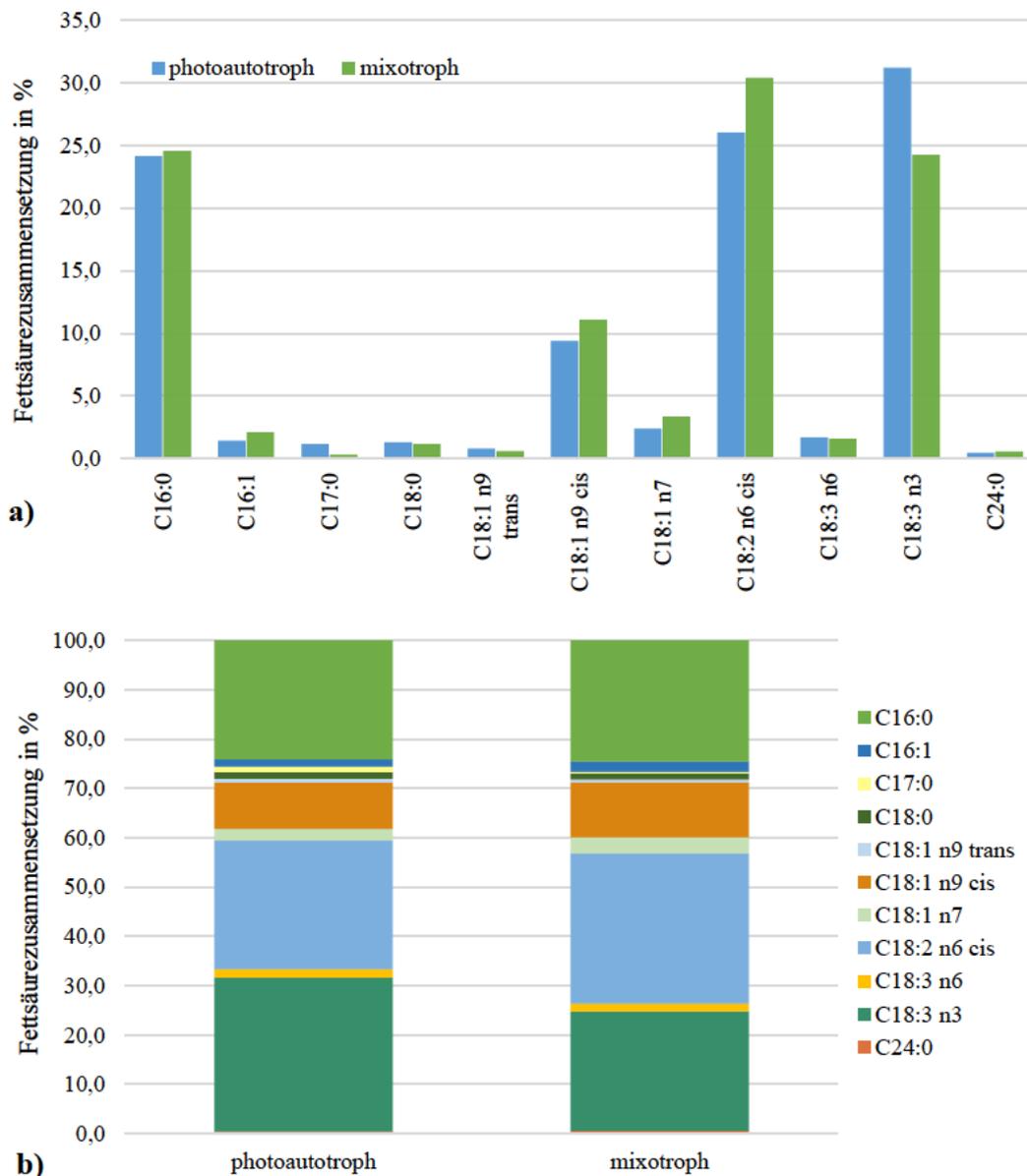


Abbildung 4.13: Fettsäurezusammensetzung von *C. sorokiniana* nach photoautotropher und mixotropher Kultivierung im FPA.

Die prozentualen Anteile der einzelnen Fettsäuren aus photoautotropher und mixotropher Kultivierung wurden gegenübergestellt (a) und die Zusammensetzung der Fettsäuren in den jeweiligen Proben dargestellt (b).

Es konnte ein Anteil der Fettsäuren von $5,62 \text{ mg g}^{-1}$ der Trockenmasse in der photoautotrophen und $5,55 \text{ mg g}^{-1}$ in der mixotrophen Kultur nachgewiesen werden. Die am häufigsten vorkommenden Fettsäuren sind Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure und α -Linolensäure. Bei Vergleich der einzelnen Fettsäuren fallen vor allem Unterschiede in den Anteilen von Linolsäure (18:2 n6 cis) und α -Linolensäure (18:3 n3) auf. In der Probe der photoautotrophen Kultivierung wurde mit 31,2 % mehr α -Linolensäure nachgewiesen, als in der mixotrophen Kultivierung mit einem Anteil von 24,2 %. Hingegen lässt sich in der Probe der mixotrophen

Kultivierung ein größerer Anteil von Linolsäure in Höhe von 30,4 % feststellen. Der Anteil der photoautotrophen Kultivierung beträgt 26,0 %.

In Tabelle 4.3 ist die prozentuale Verteilung der gesättigten (SFA) sowie der einfach (MUFA) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Prozentuale Verteilung der gesättigten sowie der einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

SFA = saturated fatty acids, MUFA = monounsaturated fatty acids, PUFA = polyunsaturated fatty acids.

Fettsäuren	Photoautotroph	mixotroph
SFA	27,05 %	26,62 %
MUFA	14,03 %	17,17 %
PUFA	58,92 %	56,22 %

Die Aufteilung der SFA, MUFA und PUFA bleibt für beide Proben annähernd gleich. Insgesamt ist der Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in beiden Proben am größten, der Anteil an einfach ungesättigten Fettsäuren am geringsten.

5 Diskussion

Nachfolgend werden die in Kapitel 4 vorgestellten Ergebnisse interpretiert und verglichen. Besonders im Fokus stehen hierbei die im FPA durchgeführten Kultivierungen von *Chlorella sorokiniana* in Bezug auf das Bakterienwachstum und die Veränderungen der Zellzusammensetzung durch die diskontinuierliche Zugabe von Glucose, durch welche die nächtlichen Biomasseverluste der photoautotrophen Kultivierung ausgeglichen werden konnten.

5.1 Kultivierung im Multi-Cultivator MC-1000

Die Kultivierung im Multi-Cultivator diente der Untersuchung der Glucose-Aufnahmerate von *Chlorella sorokiniana* für den Zeitraum von 14 Stunden während der Dunkelperiode. Ziel war es, dass die gesamte hinzugegebene Glucose über Nacht von der Mikroalge verstoffwechselt wurde. Das Wachstum war damit während der Dunkelperiode heterotroph und während der Hellperiode photoautotroph. Einen Vergleichswert der Glucose-Aufnahmerate von *Chlorella sorokiniana* gaben Ogbonna und Tanaka [1996] in ihrer Arbeit an. Sie ermittelten eine Aufnahmerate von $0,11 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Die Ergebnisse zeigen den Verlauf der Zellkonzentration und der Glucosekonzentration während der verschiedenen Kultivierungen (Abb. 4.1, Abb. 4.2). Es wird ersichtlich, dass die Zugabe von Glucose eine deutliche Steigerung des Wachstums und der Produktivität der Mikroalgen erreicht und nächtliche Biomasseverluste ausgeglichen werden. Die durchschnittlichen Biomasseverluste der durchgeführten photoautotrophen Kultivierung entsprachen dabei den erwarteten Biomasseverlusten von 10 bis 15 % [Ogbonna & Tanaka, 1996]. Bei der photoautotrophen Kultivierung wurde nach etwa vier Tagen ein Rückgang der Zellkonzentration festgestellt. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ein Teil der Biomasse über die Abluftschläuche der Kultivierungsgefäße verloren gegangen ist und die Kultur am oberen Rand der Kultivierungsgefäße haften blieb. Dies lässt sich auch in Abbildung 4.6a erkennen.

Der pH-Wert stieg im Verlauf der Kultivierung in jeder Kultur an (Abb. 4.3). In jeder Nacht war ein Abfall des pH-Werts zu verzeichnen. Der Anstieg im Verlauf der Kultivierung resultierte aus der Verstoffwechslung von Stickstoff sowie aus der photosynthetischen CO_2 -Fixierung durch den Abbau von Hydrogencarbonaten (HCO_3^-), wobei sich Hydroxid-Ionen

(OH⁻) im Medium anreicherten. Der nächtliche Abfall des pH-Werts ist vermutlich auf die konstante CO₂-Begasung, das durch die Zellatmung entstandene CO₂ und die abgestorbenen Zellen zurückzuführen. Bei den mixotrophen Kultivierungen kann auch die Zugabe und Verstoffwechslung von Glucose den pH-Wert herabsetzen [Richmond, 2013; Huang et al., 2016].

Neben dem Anstieg der Glucosekonzentration konnte auch ein Anstieg des Bakterienwachstums beobachtet (Abb. 4.4) werden, da Bakterien organischen Kohlenstoff als Energie- und Kohlenstoffquelle verstoffwechseln [Deschênes, 2016]. Besonders der Unterschied der Gesamtzellzahlen im Vergleich zur photoautotrophen Kultivierung wird hier deutlich. Während der Kultivierungen, bei denen vor jeder Dunkelphase 0,07 g_{Glc} g_{BM}⁻¹ h⁻¹ und 0,11 g_{Glc} g_{BM}⁻¹ h⁻¹ hinzugegeben wurde, akkumulierte sich die Glucose in den Kulturen. Somit stand den Mikroalgen und Bakterien nach kurzer Zeit auch während der Hellphase Glucose zur Verfügung. Diese Kulturen erreichten nach einigen Tagen ihr Konzentrationsmaximum und das Wachstum stagnierte, wohingegen bei den Bakterien noch am Ende der Kultivierung ein Wachstum zu verzeichnen war.

Das Vorhandensein von Glucose wird ebenfalls in der Farbe der Kulturen deutlich (Abb. 4.6). Da die Mikroalgen weniger auf das Licht angewiesen sind, um ihre Biomasse aufzubauen, wurden weniger photosynthetische Pigmente synthetisiert [Cheirsilp & Torpee, 2012].

Es wurden außerdem über den Kultivierungsverlauf immer mehr Kontaminationen durch andere Organismen festgestellt, denen mit der Glucose eine Wachstumsgrundlage geschaffen wurde (Abb. 4.5). Da nicht steril gearbeitet wurde, konnten die Organismen aus der Umgebung in das Kultivierungssystem gelangen. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Agglomeration der *Chlorella sorokiniana* abnahm. Dies könnte zum einen mit dem fortschreitenden Wachstum der Kultur und der damit verbundenen Nährstoffabnahme begründet werden. Die Agglomeration wird durch eine höhere Konzentration gelöster Salze begünstigt, die die Ladungen der Mikroalgenzellen ausgleichen. Zum anderen kann damit die Agglomeration durch im Medium enthaltene Zucker beeinträchtigt werden, wie in diesem Fall durch die hohe Konzentration an Glucose [Li et al., 2021].

Bei einer Glucose-Zugabe von 0,02 g_{Glc} g_{BM}⁻¹ h⁻¹ konnte die gesamte Glucose während der Dunkelphase von den Mikroalgen verstoffwechselt werden und führte zu einem Ausgleich der nächtlichen Biomasseverluste. Zum Ende der Kultivierung wurde jedoch eine leichte Akkumulation der Glucose im Medium verzeichnet. Diese ist darauf zurückzuführen, dass die tatsächliche Biomassekonzentration deutlich geringer war als die über die OD ermittelte

Biomassekonzentration. Am Ende der Kultivierung wurde eine Biotrockenmassekonzentration von $4,13 \text{ g L}^{-1}$ mittels Trockenmassebestimmung ermittelt, wohingegen mit der OD eine Konzentration von $5,35 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt wurde. Die Berechnungen der Glucose-Menge erfolgten somit für eine höhere Biomassekonzentration. Die hinzugegebene Glucose kann dadurch nicht mehr vollständig von den Mikroalgen aufgebraucht werden.

Die von Ogonna und Tanaka [1996] ermittelte Glucose-Aufnahmerate von $0,11 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ von *Chlorella sorokiniana* konnte nicht bestätigt werden, sondern war in diesem Versuch um ein Vielfaches geringer. Mögliche Gründe für diese Abweichung können darin liegen, dass ein anderer *Chlorella sorokiniana* Stamm für die Kultivierung verwendet wurde und andere Kultivierungsbedingungen herrschten. So unterscheidet sich im Vergleich der Versuche von Ogonna und Tanaka [1996] die Zusammensetzung des Mediums und das Kultivierungssystem. Während der Dunkelphase betrug die Temperatur $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Beleuchtungsstärke während der Hellphasen war geringer.

Das Bakterienwachstum bei einer Glucose-Zugabe von $0,02 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ war im Vergleich zu den höheren Glucose-Konzentrationen weniger stark ausgeprägt, da die Glucose nur während der Dunkelphase zur Verfügung stand. Während der Hellphase waren die Mikroalgen für ihr Wachstum weiterhin auf das Licht angewiesen. Dies macht sich auch im Vergleich der Farbe bemerkbar. Da die Mikroalgen weiterhin auf ihre photosynthetischen Pigmente angewiesen sind, blieb die intensivgrüne Farbe erhalten.

5.2 Kultivierung im FPA

Die Kultivierungen im FPA dienten der Verifizierung der Ergebnisse aus der Kultivierung im Multi-Cultivator und der Untersuchung dieser im größeren Maßstab. Gleichzeitig wurde eine ausreichende Menge an Biomasse erzeugt, um anschließend die Auswirkungen der diskontinuierlichen Glucose-Zugabe auf die Zellzusammensetzung mithilfe der entsprechenden Analysen untersuchen so können. Die Kultivierungsbedingungen änderten sich im Vergleich zu der Kultivierung im Multi-Cultivator insofern, dass während der Hellphase bei Raumtemperatur kultiviert wurde, die durch äußere Bedingungen, wie Sonneneinstrahlung oder die Außentemperatur, beeinflusst wurde. Während der Nacht konnte die Kultur durch das Wasserbad abgekühlt werden, wurde jedoch morgens an einigen Tagen durch die Sonne aufgeheizt. Der Begasungsfluss war zudem geringer, die Zusammensetzung aus Druckluft und $10 \text{ } \%$ (v/v) CO_2 blieb jedoch gleich.

Die Ergebnisse der Kultivierung im Multi-Cultivator können für die photoautotrophe und die mixotrophe Kultivierung bei $0,02 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose-Zugabe bestätigt werden. Der Verlauf der Biotrockenmassekonzentrationen (Abb. 4.7) verhielt sich ähnlich wie im Multi-Cultivator und die hinzugegebene Glucose wurde in jeder Nacht vollständig verstoffwechselt (Abb. 4.8). Jedoch befanden sich die Mikroalgen am Anfang der Kultivierung in einer Lag-Phase, die etwa drei Tage andauerte. Werden Organismen mit einer neuen Umgebung konfrontiert, stellen sie ihr Wachstum ein und passen sich der neuen Situation an, bevor sie ihr exponentielles Wachstum einleiten [Vermeersch et al., 2019]. Nach drei Tagen stieg das Zellwachstum, besonders bei der mixotrophen Kultur, rasant an. Die durchschnittliche volumetrische Produktivität beider Kultivierungen und die Endkonzentration der Biomasse waren durch die anfängliche Lag-Phase vergleichsweise gering und nur etwa halb so hoch, wie die der Kultivierungen im Multi-Cultivator. Die durchschnittlichen nächtlichen Biomasseverluste der photoautotrophen Kultivierung entsprachen mit 14 % auch hier den erwarteten Biomasseverlusten von 10 bis 15 % [Ogbonna & Tanaka, 1996]. Durch die Zugabe der Glucose wurden diese Biomasseverluste ausgeglichen. In den Nächten nach der Lag-Phase wurde ein Zellwachstum mit durchschnittlichen Biomassegewinnen von etwa 11 % erreicht.

Die gemessenen Temperaturen der Kultivierungen waren abhängig von der Umgebungstemperatur und der morgendlichen Sonneneinstrahlung, durch welche an manchen Tagen das Wasserbad erwärmt wurde. Deshalb entsprach die gemessene Temperatur am Ende der Dunkelphase nicht immer der tatsächlichen Temperatur während der Dunkelphase. Je nach Umgebungstemperatur variierte zudem die Temperatur der Kultur während der Dunkelphase und lag meist zwischen 15 und 24 °C. Während der Hellphase wurden Temperaturen von bis zu 28 °C erreicht. Während der mixotrophen Kultivierung waren auch die Außentemperaturen höher als während der photoautotrophen Kultivierung.

Die Unregelmäßigkeiten finden sich auch im pH-Wert wieder (Abb. 4.9). Während der Lag-Phase waren keine starken Veränderungen des pH-Werts festzustellen. Besonders auffällig war der pH-Wert-Anstieg nach der Kultivierungsdauer von 120 Stunden. Die Kultur befand sich dort in der exponentiellen Wachstumsphase. Dieser Anstieg wurde in beiden, voneinander unabhängigen Kultivierungen verzeichnet und ist möglicherweise auf die Akkumulation bestimmter Nebenprodukte aus Stoffwechselprozessen oder andere Reaktionen der Zellen während des erhöhten Wachstums zurückzuführen.

Das Bakterienwachstum der mixotrophen Kultivierung war auch in diesen Kultivierungen deutlich höher als bei der photoautotrophen Kultivierung (Abb. 4.10). Bei Vergleich der Verhältnisse zwischen den Algen und Bakterien wurden in diesen Kultivierungen weniger Bakterien gezählt als bei der Kultivierung im Multi-Cultivator. Ein Grund dafür könnte die spätere Akkumulation der Glucose während der Kultivierung im Multi-Cultivator sein, sodass die Bakterien auch nach dem Ende der Dunkelphase weiterwachsen konnten.

Die Verhältnisse der Algen- und Bakterienzellzahlen der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung im FPA unterschieden sich nicht erheblich. Die Bakterienzellzahl am Ende der mixotrophen Kultivierung war insgesamt etwa dreimal so hoch wie die der photoautotrophen Kultivierung. Die Algenzellzahl hingegen war etwa zweifach so hoch. Dieser Unterschied ist, wie bereits in Kapitel 5.1 beschrieben, auf das Vorhandensein der Glucose zurückzuführen. Auch in dieser Kultur wurden, wie schon im Multi-Cultivator, andere Organismen und Mikroalgenarten unter dem Mikroskop beobachtet, die aus der Umgebung in das Kultivierungssystem gelangt sind und sich über den Verlauf der Kultivierung vermehrten.

Bei Betrachtung der lichtmikroskopischen Aufnahmen fiel besonders die Zusammensetzung der Agglomerate in der mixotrophen Kultur auf (Abb. 4.11). Bei der farb- und strukturlosen Substanz, die in den Agglomeraten zu finden war, könnte es sich um abgestorbene Zellen handeln. Das Absterben der Zellen kann eine Reaktion auf biotische oder abiotische Stressfaktoren sein, beispielsweise durch bestimmte Kontaminationen, die negativ mit der *Chlorella* wechselwirken, oder auf den extremen pH-Anstieg zum Ende der Kultivierung [Bellucci et al., 2021]. Während der Kultivierung im Multi-Cultivator wurde eine solche Reaktion der Zellen nicht beobachtet. Dort wurden weniger verschiedene Kontaminationen festgestellt und der Verlauf des pH-Werts blieb gleichmäßig. Die Schwankung des pH-Werts während der photoautotrophen Kultivierung im FPA waren weniger stark ausgeprägt. Die farblose Substanz war ebenfalls vereinzelt und in einer sehr geringen Menge in den Agglomeraten vorzufinden. Kontaminationen der Kultur wurden kaum beobachtet. Rückschließend könnte das Absterben der Mikroalgen durch beide, zuvor genannten Stressfaktoren bedingt worden sein.

5.3 Vergleich der Zellzusammensetzung

Der Gehalt an Proteinen, Sacchariden, Lipiden, Pigmenten sowie die Zusammensetzung der Fettsäuren der im FPA kultivierten *Chlorella sorokiniana* Kulturen wurde analysiert und verglichen. Die Auswirkungen der diskontinuierlichen Zugabe von Glucose auf die Zusammensetzung der biochemischen Komponenten konnten so untersucht werden. Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Analysen beurteilt.

Über 80 % der Biotrockenmasse konnten in beiden Proben durch die durchgeführten Analysen zur Bestimmung der Zellzusammensetzung erschlossen werden (Abb. 4.12b). Die Anteile der biochemischen Komponenten in der photoautotrophen Kultur stimmen nur teilweise mit den Literaturwerten überein. Nach dem Vergleich des Saccharid- und Lipidgehalts für *Chlorella sorokiniana* aus anderen Arbeiten, wurde ein höherer Anteil der Komponenten in den Proben erwartet. Der Saccharidgehalt liegt mit 10,76 % im allgemeinen Durchschnitt des Saccharidgehalts von 10 % in Mikroalgen [Villarruel-López et al., 2017]. In anderen Untersuchungen, wie beispielsweise der von Becker [2007] und Belkoura et al. [1997], wurden jedoch deutlich höhere Gehalte von etwa 26 % und 30 % der Trockenmasse ermittelt. Bei Vergleich des Saccharidgehalts mit anderen Zellanalysen, die am Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft für *C. sorokiniana* durchgeführt wurden, konnten ebenfalls höhere Saccharidgehalte mit 18,7 % und 30,5 % ermittelt werden [Wieczorek, 2018; Maubach, 2021]. Es wurde ein Lipidanteil von 7,65 % ermittelt. Vergleichswerte zeigen höhere Lipidgehalte von etwa 18 und 20 % [Belkoura et al., 1997; Lizzul et al., 2018]. Becker [2007] hingegen ermittelte einen deutlich geringeren Anteil von 2 %. Die von Wieczorek [2018] und Maubach [2021] ermittelten Werte lagen bei durchschnittlich 6,3 % und 13,0 %. Der in dieser Arbeit ermittelte Lipidgehalt ordnet sich somit in die Vergleichswerte ein.

Der Proteingehalt nähert sich mit 49,13 % sehr gut dem Anteil von 57 % nach Becker [2007]. Mit etwa 43 % wurden bei Wieczorek [2018] und Maubach [2021] und mit etwa 40 % von Belkoura et al. [1997] geringere Proteinanteile erreicht.

Der Pigmentgehalt von 4,61 % deckt sich mit dem Pigmentgehalt von 4,5 % nach Villarruel-López et al. [2017] und findet sich in den Werten von 5,2 und 3,8 % nach Wieczorek [2018] und Maubach [2021] wieder.

Es ist zu vermuten, dass die Höhe der Anteile der biochemischen Komponenten von der Wachstumsphase abhängig ist, in der sich die Kulturen zum Zeitpunkt der Ernte befanden [Gifuni et al., 2018]. Zudem unterscheiden sich die Kultivierungsparameter und -systeme aller

verglichenen Arbeiten und teilweise die einzelnen Analysemethoden und eingesetzten Lösungsmittel voneinander und können so zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Möglicherweise konnte das eingesetzte Lösungsmittel nicht den gesamten Anteil der Lipide aus der Biomasse lösen. Ein Einfluss durch unterschiedliche Probenbehandlung, wie die Trocknungsmethode oder ein Zellaufschluss, sind ebenfalls nicht auszuschließen. Zu berücksichtigen ist ebenfalls die verkürzte Beleuchtungsdauer von 10 Stunden bzw. die verlängerte Dunkelphase von 14 Stunden. In vielen Kultivierungen betragen die Beleuchtungsdauern 12 oder 14 Stunden [Kong et al., 2013; Huang et al., 2016; Edmundson & Huesemann, 2015].

Werden nun die Unterschiede der Zellzusammensetzung aus der photoautotrophen Kultivierung mit der mixotrophen Kultivierung verglichen, fallen besonders die Änderungen des Saccharid- und Lipidanteils bei einer gleichzeitigen Verringerung des Gehalts an anorganischen Bestandteilen auf (Abb. 4.12b). Der Saccharidgehalt stieg von 10,76 auf 18,8 %. Der Lipidanteil hingegen sank von 7,65 auf 4,97 %. Viele bisherige Untersuchungen zeigen, dass sowohl der Saccharid- als auch der Lipidgehalt bei der Zugabe eines organischen Substrats, wie Glucose, gesteigert werden können [Kong et al. 2013; Cheirsilp & Torpee, 2012; Kong et al., 2020]. Huang et al. [2016] erreichten bei Zugabe von Glucose eine Steigerung des Lipidgehalts auf etwa 45 %, wohingegen der Saccharidgehalt abnahm. Die Steigerung des Saccharidgehalts in dieser Arbeit deckt sich dementsprechend mit den Ergebnissen anderer Arbeiten. Die Abnahme des Lipidgehalts entspricht diesen nicht. Auch bei diesen Ergebnissen sind Unterschiede der Probenbehandlung, der Kultivierungsparameter und -systeme aller verglichenen Arbeiten sowie die verwendeten Analysemethoden und eingesetzten Lösungsmitteln zu berücksichtigen. Da die Lipidextraktionen der Proben aus der phototrophen und mixotrophen Kultivierung zudem getrennt durchgeführt wurden, konnten auch hier einzelne Parameter, wie die Spüldauer, variieren und sich auf die Ergebnisse auswirken.

Der Proteinanteil von *C. sorokiniana* sank ebenfalls leicht von 49,13 auf 46,84 %. Die Abnahme des Proteingehalts während einer mixotrophen Kultivierung wurde bereits in anderen Versuchen beobachtet [Kong et al., 2020; Kong et al., 2013]. Der Pigmentanteil blieb mit 4,61 % in der photoautotrophen und 4,67 % in der mixotrophen Kultur annähernd gleich. Da die Mikroalgen bei der diskontinuierlichen Glucose-Zugabe tagsüber noch ihre gesamte Energie aus dem Licht beziehen, waren sie weiterhin auf die photosynthetischen Pigmente angewiesen [Cheirsilp & Torpee, 2012]. Die mixotrophe Kultivierung bei diskontinuierlicher Zugabe von Glucose würde sich somit besonders für die Produktion von Pigmenten eignen, da

die Wachstumsrate bei gleichbleibendem Pigmentgehalt der Mikroalgen erhöht wird. Gleichzeitig kann die Saccharidproduktion der Zellen gesteigert werden.

Die in den Proben nachgewiesenen Fettsäuren wurden ebenfalls miteinander verglichen (Abb. 4.13). Die Fettsäureanteile in den Proben waren mit $5,62 \text{ mg g}^{-1}$ in der photoautotrophen Kultur und $5,55 \text{ mg g}^{-1}$ in der mixotrophen Kultur vergleichbar. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich auch die tatsächlichen Lipidanteile der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung kaum unterscheiden, mit der mixotrophen Kultivierung also möglicherweise keine Verringerung des Lipidanteils einhergegangen ist.

Besonders auffällig waren die Änderungen der Anteile von Linolsäure (18:2 n6 cis) und α -Linolensäure (18:3 n3) von photoautotropher zu mixotropher Kultivierung. Bei Betrachtung des Aspekts der menschlichen Ernährung ist vor allem ein höherer Anteil an α -Linolensäure (ALA) als Vorstufe aller anderen Omega-3-Fettsäuren von Vorteil. Linolsäure (LA) stellt die Vorstufe der Omega-6-Fettsäuren dar und sollte in geringeren Mengen aufgenommen werden, da entzündliche Reaktionen im Körper durch große Mengen der Omega-6-Fettsäuren begünstigt werden können. ALA hingegen wirkt entzündungshemmend [Nagy & Tiuca, 2017]. Da der Anteil an LA von 26,0 % in der phototrophen zu 30,4 % in der mixotrophen Kultivierung zunahm und gleichzeitig der Anteil der ALA von 31,2 auf 24,2 % sank, ist die mixotrophe Kultivierung für die Synthese der bevorzugten Omega-3-Fettsäuren unvorteilhaft.

Die Ergebnisse der Fettsäureanalyse wurden außerdem Vergleichswerten anderer Arbeiten gegenübergestellt. Diese sind in Anhang C zu finden. Sowohl die Zusammensetzung nach Li et al. [2014] als auch die Zusammensetzung nach Bellou & Aggelis [2012] ähneln der Zusammensetzung der kultivierten *C. sorokinana*. Li et al. [2014] ermittelten jedoch geringere Anteile an LA, nach Bellou & Aggelis [2012] lag der Anteil höher. Bei den Vergleichswerten ist zu berücksichtigen, dass in den anderen Arbeiten auch zusätzlich andere Fettsäuren analysiert wurden. Diese wurden jedoch nicht abgebildet, da damit kein direkter Vergleich zu den einzelnen ermittelten Fettsäureanteilen dieser Arbeit gezogen werden kann.

Bei Vergleich der Zusammensetzung von ungesättigten sowie einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren stimmten diese in beiden Proben ungefähr überein (Tab. 4.3). Der Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist dabei am größten und nahm von photoautotropher zu mixotropher Kultivierung leicht ab. Eine ähnliche Zusammensetzung findet sich auch in den Vergleichswerten von Bellou und Aggelis [2012] und Li et al. [2014]. Betrachtet man auch hier wieder den Aspekt der menschlichen Ernährung ist ein höherer Anteil an ungesättigten Fettsäuren von Vorteil, da diese im Körper die Konzentration des High-

Density-Lipoproteins HDL-Cholesterin erhöhen, welches überschüssiges Cholesterin für den Abbau zur Leber transportiert. Gesättigte Fettsäuren hingegen erhöhen die Konzentration des Low-Density Lipoproteins LDL-Cholesterins, welches die Zellen mit Cholesterin beliefert und die Aktivität des LDL-Rezeptors hemmt. Eine zu hohe Konzentration des LDL-Cholesterins kann Herz-Kreislauf-Erkrankungen begünstigen. Besonders Palmitinsäure nimmt auf die genannte Aktivität des LDL-Cholesterins einen Einfluss [Siri-Tarino, 2010]. Der deutlich höhere Anteil der ungesättigten Fettsäuren der *C. sorokiniana* mit etwa 27 %, gegenüber dem Anteil der ungesättigten Fettsäuren mit etwa 57 %, ist rückschließend für beide Kultivierungsmethoden insgesamt vorteilhaft. Weniger vorteilhaft ist jedoch der Anteil an Palmitinsäure, der mit 24,1 und 24,5 % in beiden Proben ähnlich hoch liegt.

Einen weiteren Aspekt stellt der Einsatz der gewonnenen Lipide in der Biodieselproduktion dar. Bisherige Untersuchungen zeigen, dass die Qualität des Kraftstoffs von der Zusammensetzung der ungesättigten und gesättigten Fettsäuren abhängt. Vorteilhaft ist ein hoher Anteil an gesättigten und ein geringer Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Da *Chlorella* eine hohe Produktivität der Lipid- und Fettsäuresynthesen, bei Anteilen von etwa 22 bis 29 % an ungesättigten und etwa 36 bis 45 % an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vorweisen, bieten sie sich für die Biodieselproduktion an. Sie ermittelten Lipidgehalte von etwa 11 bis 18 %. Die Studien zeigten eine hohe Stabilität des aus *Chlorella* gewonnenen Kraftstoffs [Talebi et al. 2013; Hoekman et al., 2012]. Der in dieser Arbeit ermittelte Anteil der ungesättigten Fettsäuren entspricht mit etwa 27 % den Untersuchungen nach Talebi et al. [2013]. Der Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in dieser Arbeit liegt mit etwa 57 % etwas höher. Die Verhältnisse der Fettsäuren der *C. sorokiniana* stimmen mit den Verhältnissen von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren überein. Die Fettsäurezusammensetzung der *C. sorokiniana* würde sich demnach für die Biodieselproduktion anbieten. Der Lipidgehalt von 7,65 und 4,97 % der kultivierten Mikroalgen wäre für diese Anwendung zu gering. Da hohe Biomasseausbeuten für die Biodieselproduktion benötigt werden, bietet sich jedoch eine mixotrophe Kultivierung an.

5.4 Fehlerbetrachtung

In diesem Kapitel werden mögliche Fehlerquellen der verwendeten Methoden und die Einflüsse auf die zuvor dargestellten Ergebnisse erörtert.

In jedem Versuch wurden die Biomassekonzentrationen mithilfe des Korrelationsfaktors der Kalibriergeraden und der gemessenen OD bestimmt. Die Kalibriergerade ergibt sich aus einer linearen Regression der OD in Abhängigkeit der Biotrockenmasse, die für die Vorkultur der *C. sorokiniana* erstellt wurde. Folglich handelt es sich bei der Konzentrationsbestimmung um eine indirekte Messung, die zu Fehlern führen kann. Da sich die Zusammensetzung der Kultur und das Wachstumsverhalten der *C. sorokiniana* im Verlauf einer Kultivierung verändern, verändert sich auch der Zusammenhang der gemessenen OD und der Biotrockenmasse [Gifuni et al., 2019].

Während der Kultivierungen im Multi-Cultivator kann es zu leichten Unterschieden des Begasungsdrucks in den einzelnen Kulturgefäßen gekommen sein. Die Begasung wurde für jedes Kultivierungsgefäß über Begasungsventile geregelt. So konnte es zu leichten Abweichungen durch unterschiedlich weit geöffnete Ventile kommen. Da die Begasung die Durchmischung der Kulturen sicherstellt, kann es auch hier Abweichungen gegeben haben. Während des Versuchs wurde zudem beobachtet, dass in einigen Kulturen ein Teil der Biomasse über die Abluftschläuche verloren gegangen ist oder am oberen Rand der Kultivierungsgefäße gehaftet hat, was jeweils zu einer geringeren Zellkonzentration geführt hat.

Während der Kultivierungen im FPA wurde ebenfalls beobachtet, dass ein Teil der Biomasse am oberen Teil des Reaktors haftete und es teilweise zu Ablagerungen in den Kammern des Reaktors kam. Die Ablagerungen resultierten daraus, dass die Durchmischung durch die Begasung an diesen Stellen nicht gewährleistet werden konnte. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Lichtquelle die Kultur nicht vollständig und gleichmäßig beleuchten konnte. Die Lichtstärke war in der Mitte des Reaktors am größten und nahm nach außen hin ab. Der untere Teil des Reaktors befand sich zudem durchgehend im Wasserbad und wurde zu keiner Zeit beleuchtet. Die Lichtverfügbarkeit für die Photosyntheseleistung der Zellen war dementsprechend eingeschränkt.

Grundsätzlich fand keiner der Versuche unter sterilen Bedingungen statt, sodass andere Organismen in die Kultivierungssysteme eingetragen und somit Kontaminationen beobachtet wurden. Die Organismen können sowohl einen positiven als auch negativen oder keinen

nennenswerten Einfluss auf die Kultivierungen haben [Edmundson & Huesemann, 2015; Bai et al., 2014].

Während der analytischen Methoden stellen Pipettierfehler eine mögliche Fehlerquelle bei dem Ansetzen von Verdünnungen oder Lösungen dar. Diese Fehler können besonders bei kleinen Volumina eine größere Auswirkung auf das Ergebnis haben. Besonders bei den Zellzählungen oder den Nährstofftests, bei denen 1:50 oder 1:100 Verdünnungen angesetzt wurden, kann es zu solchen Abweichungen kommen.

Während der Bestimmung der Algen- und Bakterienzellzahlen kann es zudem zu Fehlern während des Zählens gekommen sein, wenn beispielsweise eine Zelle übersehen oder doppelt gezählt wurde.

Bei der Lipidextraktion können leichte Abweichungen in der Temperatur, die über einen analogen Regler eingestellt wurden, aufgetreten sein. Die einzelnen Extraktionsvorrichtungen brauchten zudem unterschiedlich lange, um die entsprechende Temperatur zu erreichen. Eine weitere Abweichung wurde in den Spülzeiten der Proben beobachtet, die davon abhängig war, nach welcher Zeit das Lösungsmittel vollständig verdampft war. Dies hing zusätzlich damit zusammen, wie fest die Extraktionsbecher an die Apparatur geschraubt wurden und wie gut das Lösungsmittel dadurch entweichen konnte. Diese Parameter können zu unterschiedlichen Extraktionserfolgen geführt haben.

6 Zusammenfassung und Fazit

Aufgrund der Zellatmung kann es bei photoautotrophen Mikroalgen während der Abwesenheit von Licht zu Biomasseverlusten kommen. Da einige Mikroalgen neben dem phototrophen auch einen hetero- oder mixotrophen Stoffwechsel betreiben können, kann das Zellwachstum durch die Zugabe eines organischen Substrats gesteigert und die nächtlichen Biomasseverluste ausgeglichen werden. Bei der Zugabe von organischem Substrat steigt jedoch auch das Bakterienwachstum deutlich an und das Risiko einer Überwucherung der Mikroalgen besteht. In dieser Arbeit wurde daher für die Mikroalge *Chlorella sorokiniana* untersucht, wie sich eine diskontinuierliche Zugabe von Glucose auf das Bakterienwachstum und die Zellzusammensetzung auswirkt, um gleichzeitig die nächtlichen Biomasseverluste auszugleichen. Die hinzugefügte Glucose sollte dabei vollständig während der 14-stündigen Dunkelphase von den Mikroalgen verstoffwechselt werden.

Um die Glucose-Aufnahmerate der *C. sorokiniana* zu untersuchen, wurde im Multi-Cultivator kultiviert. Es wurden simultan eine photoautotrophe und drei mixotrophe Kultivierungen durchgeführt. Den mixotrophen Kulturen wurden vor jeder Dunkelphase in Abhängigkeit der Biomasse Mengen von $0,02 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $0,07 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $0,11 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose hinzugefügt. Die Ergebnisse zeigen, dass die gesamte Glucose bei einer Zugabe-Menge von $0,02 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ von den Mikroalgen verstoffwechselt werden kann. Die Bakterienzellzahl stieg analog zu höheren Glucosekonzentrationen an.

Um die Ergebnisse des Versuchs zu verifizieren, wurde im FPA eine photoautotrophe und eine mixotrophe Kultivierung bei $0,02 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{BM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glucose-Zugabe durchgeführt. Während der photoautotrophen Kultivierung traten während der Dunkelphase Biomasseverluste von etwa 14 % auf. Mit der diskontinuierlichen Glucose-Zugabe in der mixotrophen Kultivierung konnten die Biomasseverluste ausgeglichen und das Zellwachstum mehr als verdoppelt werden. Die Bakterienkonzentration steigerte sich um den Faktor 1,7 und liegt damit deutlich niedriger als in mixotrophen Kultivierungen, denen Glucose zum Anfang der Kultivierung in höherer Konzentration hinzugegeben wird. In der herkömmlichen mixotrophen Kultivierung kann sich das Bakterienwachstum um einen Faktor von ca. 11 steigern [Maubach, 2021].

Die Zellzusammensetzung der Biomasse aus der photoautotrophen und mixotrophen Kultivierung wurde analysiert. Es wurde eine hohe Ausbeute an Proteinen erzielt. Durch die

diskontinuierliche Zugabe von Glucose wurde eine Steigerung des Saccharidgehalts erreicht. Der Pigmentgehalt änderte sich nicht nennenswert. Der Lipidanteil nahm ab.

Die mixotrophe Kultivierung bei diskontinuierlicher Glucose-Zugabe würde sich daher besonders für Kultivierungen eignen, die der Produktion von Pigmenten dienen, die unter anderem als natürliche Farbstoffe in der Nahrungsmittelindustrie Anwendung finden [Spolaore et al., 2006]. Es wird zudem ein gesteigerter Anteil an Sacchariden gewonnen, die für die Biokraftstoffproduktion eingesetzt werden können [Debnath et al., 2021]. Gleichzeitig erhöht sich die Produktivität der Mikroalgen und damit die Ausbeuten der Produkte.

7 Ausblick

Die durchgeführten Versuche konnten zeigen, dass bei einer diskontinuierlichen Zugabe von Glucose die nächtlichen Biomasseverluste ausgeglichen und das Wachstum der *Chlorella sorokiniana* gesteigert werden kann.

Um das Potenzial dieser Kultivierungsmethode besser beurteilen zu können, wäre eine Kultivierung über einen längeren Zeitraum sinnvoll. So können die Wachstumsrate der Mikroalgen und das Wachstum der Bakterien weiter beobachtet werden. Auch ein möglicher Einfluss bestimmter Kontaminationen auf die Mikroalgen könnte untersucht werden.

Die Zellzusammensetzung der *Chlorella sorokiniana* bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen, besonders in Bezug auf den Saccharidgehalt und die Lipidproduktion. Eine Analyse der biochemischen Komponenten bei einem fortgeschritteneren Wachstum der Mikroalgen wäre sinnvoll, da sich die Zellzusammensetzung während des Wachstumsverlaufs verändert. Möglicherweise kann auch mit dieser Kultivierungsmethode in einem weiteren Versuch eine Steigerung des Lipidgehalts erreicht werden.

Die Ergebnisse der Pigmentbestimmung sind bisher vielversprechend, da kein Verlust der Pigmente auftritt. Jedoch muss auch hier eine Untersuchung über einen längeren Kultivierungszeitraum durchgeführt werden.

Darüber hinaus können die Auswirkungen auf das Wachstum und die Zellzusammensetzung durch die Zugabe weiterer organischer Substrate, wie Acetat, im weiteren Verlauf untersucht und einzelne Kultivierungsparameter, z.B. die Lichtstärke, variiert werden.

8 Literaturverzeichnis

- Acién Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M., & Molina Grima, E. (2013). Photobioreactors for the production of microalgae. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(2), 131–151. DOI:10.1007/s11157-012-9307-6.
- Amos Richmond (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, 2 Photosynthesis of Microalgae. DOI:10.1002/9780470995280.
- Bai, X., Lant, P., & Pratt, S. (2014). The contribution of bacteria to algal growth by carbon cycling. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(4), 688–695. DOI:10.1002/bit.25475.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2), 207–210. DOI:10.1016/j.biotechadv.2006.11.002.
- Belkoura, M., Benider, A., Dauta, A. (1997). Effects of temperature, light intensity and growth phase on the biochemical composition of *Chlorella sorokiniana*. *Shihira & Krauss. Ann. Limnol. Int. J. Limnol.* 1997, 33, 3–11.
- Bellou, S., Baeshen, M. N., Elazzazy, A. M., Aggeli, D., Sayegh, F., & Aggelis, G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 32(8), 1476–1493. DOI:10.1016/j.biotechadv.2014.10.003.
- Bellucci, M., Marazzi, F., Musatti, A., Fornaroli, R., Turolla, A., Visigalli, S., Bargna, M., Bergna, G., Canziani, R., Mezzanotte, V., Rollini, M., Ficara, E. (2021). Assessment of anammox, microalgae and white-rot fungi-based processes for the treatment of textile wastewater. *PLOS ONE*, 16(3), p. e0247452. DOI:10.1371/journal.pone.0247452.
- Bioökonomie.de (2020). Auf dem Weg zur aquatischen Bioraffinerie. <https://biooekonomie.de/foerderung/foerderbeispiele/auf-dem-weg-zur-aquatischen-bioraffinerie> (letzter Aufruf: 25.07.2022).
- Borowitzka, M. A. (2018). Biology of Microalgae. *Microalgae in Health and Disease Prevention*, 23–72. DOI:10.1016/b978-0-12-811405-6.00003-7.
- Cheirsilp, B., & Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 110, 510–516. DOI:10.1016/j.biortech.2012.01.125.
- Chojnacka, K., Marquez-Rocha, F.-J. (2004). Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. *Biotechnology*, 3 (1):21-34, 2004. DOI:10.3923/biotech.2004.21.34.
- Christaki, E., Bonos, E., Florou-Paneri, P. (2015) *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. 14 Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition. Academic Press.
- Debnath, C., Bandyopadhyay, T. K., Bhunia, B., Mishra, U., Narayanasamy, S., & Muthuraj, M. (2021). Microalgae: Sustainable resource of carbohydrates in third-generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 150, 111464. DOI:10.1016/j.rser.2021.111464

- Deschênes, J.-S. (2016). A bacteriostatic control approach for mixotrophic cultures of microalgae. *IFAC-PapersOnLine*, 49(7):1074–1078.
DOI:10.1016/j.ifacol.2016.07.345.
- DIN Deutsches Institut für Normung e. V. (n.d.). DIN 38409-1. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H); Bestimmung des Gesamttrockenrückstandes, des Filtratrockenrückstandes und des Glührückstandes (H 1).
<https://www.din.de/de/mitwirken/normenausschuesse/naw/wdc-beuth:din21:1334102>
(letzter Aufruf: 31.07.2022).
- Edmundson, S. J. und Huesemann, M. H. (2015). The dark side of algae cultivation: characterizing night biomass loss in three photosynthetic algae, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis salina* and *Picochlorum* sp. *Algal research*, 12:470–476.
DOI:10.1016/j.algal.2015.10.012.
- Eichler, H.J., Kronfeldt, H.-D. and Sahm, J. (2016). *Das neue Physikalische Grundpraktikum*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).
DOI:10.1007/978-3-662-49023-5.
- Enamala, M.K., Enamala, S., Chavali, M., Donepudi, J., Yadavalli, R., Kolapalli, B., Aradhyulaf, T.V., Velpuri, J., Kuppam, C. (2018). Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94, 49–68.
DOI:10.1016/j.rser.2018.05.012.
- Francke, L. (2018). Downstream processing of freshwater unicellular chlorophyta with focus on flocculation and the extraction of pigments. *Cultivation in Multi-Cultivator MC 1000*. Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft, TUHH.
- Francke, L. (n.d.). *Bedienung des Multi-Cultivators*. Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft, TUHH.
- Friderich, H., Scholz, A. (2009). *Bestimmung des Glühverlustes*. Version 01. Technische Universität Hamburg.
- Friedl, T., Rybalka, N., & Kryvenda, A. (2013). 2 Phylogeny and systematics of microalgae: An overview. *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*.
DOI:10.1515/9783110225020.11.
- Gifuni, I., Pollio, A., Safi, C., Marzocchella, A., & Olivieri, G. (2019). Current Bottlenecks and Challenges of the Microalgal Biorefinery. *Trends in Biotechnology*, 37(3), pp. 242–252. DOI:10.1016/j.tibtech.2018.09.006.
- González López, C. V., García, M. del C. C., Fernández, F. G. A., Bustos, C. S., Chisti, Y., & Sevilla, J. M. F. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*, 101(19), 7587–7591.
DOI:10.1016/j.biortech.2010.04.077.
- Grabl, E. et al., (2010). *Innovationsmanagement in der Praxis*. Innovationspotenzial von Biokraftstoff aus Algen. *CAMPUS 02, Beiträge zur wirtschaftswissenschaftlichen und technisch-wissenschaftlichen Forschung*, Band 5.

- Graham, D. (1980). *Metabolism and Respiration - A Comprehensive Treatise*. 13 - Effects of Light on “Dark” Respiration. Academic Press, pp. 525–579. DOI:10.1016/B978-0-12-675402-5.50019-2.
- Hach Lange GmbH (2019). LCK 339 Nitrat. DOC312.72.94016. Hach Company, 10/2019, Edition 1.
- Hach Lange GmbH (2019). LCK 349 Phosphor gesamt/Phosphor ortho. DOC312.72.94021. Hach Company, 11/2020, Edition 4.
- Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., Danquah, M.K. (2010) ‘Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects’, *International Journal of Chemical Engineering*, 2010. DOI:10.1155/2010/391632.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54(4), 621–639. DOI:10.1111/j.1365-313x.2008.03492.x.
- Huang, A., Sun, L., Wu, S., Liu, C., Zhao, P., Xie, X., & Wang, G. (2016). Utilization of glucose and acetate by *Chlorella* and the effect of multiple factors on cell composition. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 23–33. DOI:10.1007/s10811-016-0920-6.
- Kaltschmitt, M.; Hartmann, H.; Hofbauer, H. (2016). *Energie aus Biomasse. Kapitel 5 Aquatische Biomasse*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2016. DOI:10.1007/978-3-662-47438-9.
- Kleberg, K. (n.d.). Bestimmung des Fettsäuremusters in Algen, Algenöl und anderen Fetten mittels GC/FID. ODOCON GbR.
- Kong, W.-B., Yang, H., Cao, Y.-T., Song, H., Hua, S.-F., Xia, C.-G. (2013). Effect of Glycerol and Glucose on the Enhancement of Biomass, Lipid and Soluble Carbohydrate Production by *Chlorella vulgaris* in Mixotrophic Culture. *Food Technology and Biotechnology* 51 (2013), 1, pp. 62–69.
- Kong, W., Yang, S., Wang, H., Huo, H., Guo, B., Liu, N., Zhang, A., Niu, S. (2020). Regulation of biomass, pigments, and lipid production by *Chlorella vulgaris* 31 through controlling trophic modes and carbon sources. *Journal of Applied Phycology*, 32(3), pp. 1569–1579. DOI:10.1007/s10811-020-02089-1.
- Krienitz, L., Hegewald, E. H., Hepperle, D., Huss, V. A. R., Rohr, T., & Wolf, M. (2004). Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia*, 43(5), 529–542. DOI:10.2216/i0031-8884-43-5-529.1.
- Li, T., Zheng, Y., Yu, L., & Chen, S. (2014). Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, 66, 204–213. DOI:10.1016/j.biombioe.2014.04.010.
- Li, T., Hu, J. and Zhu, L. (2021). Self-Flocculation as an Efficient Method to Harvest Microalgae: A Mini-Review. *Water*, 13(18), p. 2585. DOI:10.3390/w13182585.
- Lizzul, A.M, Lekuona-Amundarain, A., Purton, S. Campos L.C. (2018). Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. *Biology*, 7(2), p. 25. DOI:10.3390/biology7020025.

- Matos, Â. P. (2017). The Impact of Microalgae in Food Science and Technology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(11), 1333–1350. doi:10.1007/s11746-017-3050-7.
- Maubach, F. (2021). Mixotrophe Kultivierung der Mikroalge *Chlorella sorokiniana* – Auswirkungen auf Produktivität, Zellzusammensetzung und bakterielle Kontamination. Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft, TUHH.
- Mayerhöfer, T.G., Pahlow S., Popp, J. (2020). The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure. *ChemPhysChem* 2020,21, 2029–2046, Wiley Online Library. DOI:10.1002/cphc.202000464.
- Müller-Esterl, W., (2018). Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, pp. 587-637. DOI: 10.1007/978-3-662-54851-6_39.
- Nagy, K., Tiuca, I.-D. (2017). Importance of Fatty Acids in Physiopathology of Human Body. *Fatty Acids*. DOI:10.5772/67407.
- Nair, A. und Chakraborty, S. (2020). Synergistic effects between autotrophy and heterotrophy in optimization of mixotrophic cultivation of *Chlorella sorokiniana* in bubble-column photobioreactors. *Algal Research*, 46:101799.
- National Human Genome Research Institute (2022). Protein. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Protein> (letzter Aufruf: 25.07.2022).
- Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (2019). Zählkammer.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36. DOI:10.1016/j.watres.2010.08.037.
- Peterhansel, C., Horst, I., Niessen, M., Blume, C., Kebeish, R., Kürkcüoglu, S., Kreuzalerb, F. (2010). Photorespiration. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 8, p. e0130. DOI:10.1199/tab.0130.
- Pflanzenforschung.de (n.d.). Dunkelreaktion (Photosynthese). <https://www.pflanzenforschung.de/de/pflanzenwissen/lexikon-a-z/dunkelreaktion-photosynthese-292> (letzter Aufruf: 22.07.2022).
- Plantafert (2020). FERTY® 2 Basisdünger. <https://plantafert.de/produkte/professioneller-gartenbau/ferty-basisduenger/ferty-2-basisduenger/> (letzter Aufruf: 27.07.2022).
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. (2022). *Duale Reihe Biochemie*. Hrsg. 5. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2022. DOI:10.1055/b000000425.
- R-Biopharm AG (2017). Enzytec™ Liquid D Glucose. Enzymatische Bestimmung von D-Glucose in Lebensmitteln und anderen Probematerialien. https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/2017/05/E-Liquid_IFU_E8140_Glucose_EN.pdf (letzter Aufruf: 29.07.2022).

- Richmond, A. (2013). Biological Principles of Mass Cultivation of Photoautotrophic Microalgae. *Handbook of Microalgal Culture*, 169–204. DOI:10.1002/9781118567166.ch11.
- Romero, N., Visentini Flavia, F., Márquez Vanina, E., Santiago Liliana, G., Castro Guillermo, R., Gagnet Ana, M. (2020). Physiological and morphological responses of green microalgae *Chlorella vulgaris* to silver nanoparticles. *Environmental Research*, 109857. DOI:10.1016/j.envres.2020.109857.
- Rosello Sastre, R., & Posten, C. (2010). Die vielfältige Anwendung von Mikroalgen als nachwachsende Rohstoffe. *Chemie Ingenieur Technik*, 82(11), 1925–1939. DOI:10.1002/cite.201000124.
- Schmidt, M., Wilhelm, C. (2014). The Structural Basis of Biological Energy Generation. Chapter 36: Green Algae., Series: *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer, Dordrecht, S 309–333. DOI: 10.1007/978-94-017-8742-0_17.
- Schöke, J. (2020). Mixotrophe Kultivierung von *Chlorella sorokiniana* unter Zugabe von Glucose und Natriumacetat im Labor- und Pilotmaßstab. Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft, TUHH.
- Scholz, M., Stahl, M. (2021). Bestimmung des Kjeldahl-Stickstoff. M02.011, Version 02. Technische Universität Hamburg, Zentrallabor Chemische Analytik. <https://www.tuhh.de/zentrallabor/methoden/ac-methoden/m02011.html> (letzter Aufruf: 30.07.2022).
- Simopoulos, A.P. (1994). Fatty Acids. I. Goldberg (ed.) *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*. Boston, MA: Springer US, pp. 355–392. DOI:10.1007/978-1-4615-2073-3_16.
- Singh, N., Batghare, A. H., Choudhury, B. J., Goyal, A., & Moholkar, V. S. (2020). Microalgae based biorefinery: Assessment of wild fresh water microalgal isolate for simultaneous biodiesel and β -carotene production. *Bioresource Technology Reports*, 100440. DOI:10.1016/j.biteb.2020.100440.
- Siri-Tarino, P. W., Sun, Q., Hu, F. B., & Krauss, R. M. (2010). Saturated Fatty Acids and Risk of Coronary Heart Disease: Modulation by Replacement Nutrients. *Current Atherosclerosis Reports*, 12(6), 384–390. DOI:10.1007/s11883-010-0131-6.
- Sorokin, C., Myers, J. (1953). A high-temperature strain of *Chlorella*. *Science* 1953, 117, 330–331.,6: Kunz, W.F. Response of the alga *Chlorella sorokiniana* to 60 Co gamma radiation. *Nature* 1972, 236, 178–179.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. DOI:10.1263/jbb.101.87
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M.M.C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N.-M., Krüger, A., Alam, M.T., Keller, M.A., Breitenbach, M., Brindle, K.M., Rabinowitz, J.D., Ralser, M. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, 90(3), pp. 927–963. DOI:10.1111/brv.12140.

- Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Gatto jr., G.J. (2018). Stryer Biochemie. Kapitel 2 - Zusammensetzung und Struktur der Proteine. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, pp. 31-77.
- Talebi, A. F., Mohtashami, S. K., Tabatabaei, M., Tohidfar, M., Bagheri, A., Zeinalabedini, M., Mirzaei, H.H., Mirzajanzadeh, M., Shafaroudi, S.M., Bakhtiari, S. (2013). Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Research*, 2(3), 258–267. DOI:10.1016/j.algal.2013.04.003.
- Tan, J.S., Lee, S.Y., Chew, K.W., Lam, M.K, Lim, J.W, Ho, S.-H., Show, P.L. (2020). A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*, 11(1), pp. 116–129. DOI:10.1080/21655979.2020.1711626.
- Van Wageningen, J., De Francisci, D. and Angelidaki, I. (2015). Comparison of mixotrophic to cyclic autotrophic/heterotrophic growth strategies to optimize productivity of *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), pp. 1775–1782. DOI:10.1007/s10811-014-0485-1.
- Van Wychen, S., & Laurens, L. M. L. (2017). Total Carbohydrate Content Determination of Microalgal Biomass by Acid Hydrolysis Followed by Spectrophotometry or Liquid Chromatography. *Methods in Molecular Biology*. DOI:10.1007/7651_2017_106.
- Vermeersch, L., Perez-Samper, G., Cerulus, B., Jariani, A., Gallone, B., Voordeckers, K., Steensels, J., Verstrepen, K.J. (2019). On the duration of the microbial lag phase. *Current Genetics*, 65(3), pp. 721–727. DOI:10.1007/s00294-019-00938-2.
- Villarruel-López, A., Ascencio, F. and Nuño, K. (2017). Microalgae, a Potential Natural Functional Food Source – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 67(4), pp. 251–263. DOI:10.1515/pjfn-2017-0017.
- Wang, B., Lan, C. Q., & Horsman, M. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advances*, 30(4), 904–912. DOI:10.1016/j.biotechadv.2012.019.
- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. DOI:10.1016/s0176-1617(11)81192-2.
- Wieczorek, N. (2018). Kultivierung der Mikroalge *Chlorella sorokiniana* zur Gewinnung von Naturwertstoffen im Rahmen eines Bioraffineriekonzepts.
- Zhu, L.D., Li, Z.H. Hiltunen, E. (2016). Application of Biotechnology for the Production of Biomass-Based Fuels. *BioMed Research International*, Volume 2016, Article ID 8 792548. DOI:10.1155/2016/8792548.

Anhang

A Kalibriergerade der *Chlorella sorokiniana*

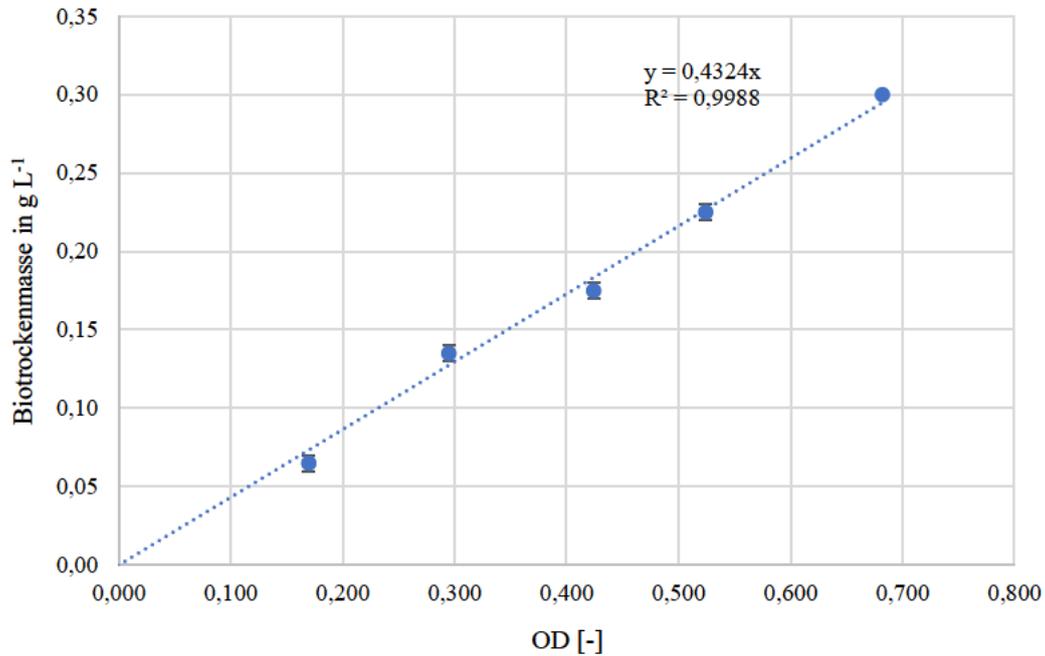


Abbildung A.1: Abhängigkeit der Biotrockenmasse und der optischen Dichte bei 750 nm von *Chlorella sorokiniana*.

Tabelle A.1: Werte der Kalibrierung für eine optische Dichte bei 750 nm in Abhängigkeit der Biotrockenmassekonzentration.

Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Probe	Mittelwert OD ₇₅₀	Mittelwert c _{BTM} in g L ⁻¹	Stabw. σ
1	0,682	0,3	0,000
2	0,524	0,225	0,005
3	0,424	0,175	0,005
4	0,2945	0,135	0,005
5	0,1695	0,065	0,005

B Kalibriergerade der Saccharidbestimmung

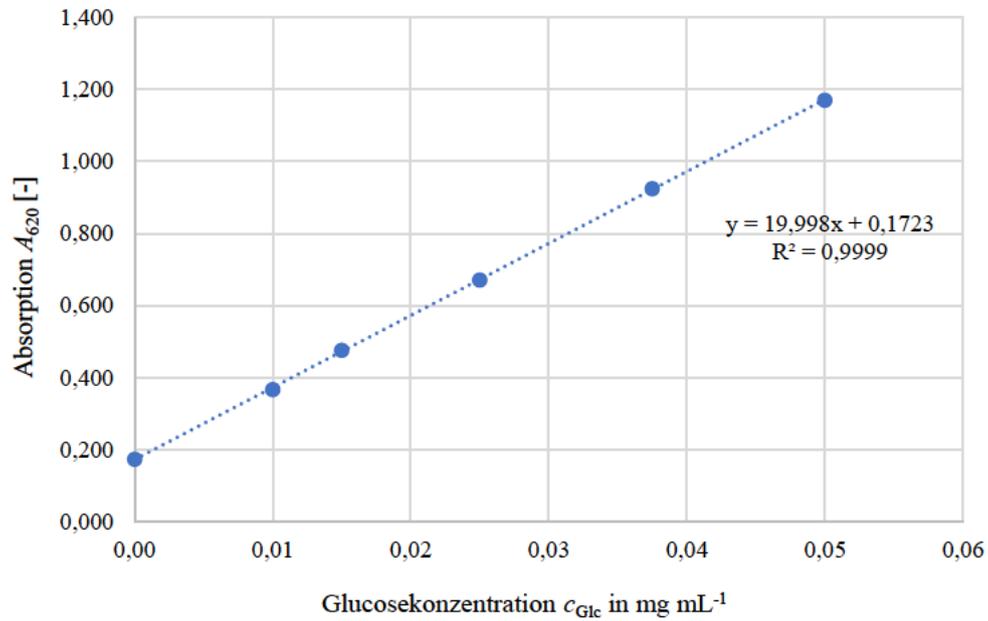


Abbildung A.2: Abhängigkeit der Glucosekonzentration und der Absorption bei 620 nm zur Bestimmung des Saccharidgehalts.

Tabelle A.2: Werte der Absorption bei 620 nm für unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen.

Glucose-Konzentration	$A_{620,1}$	$A_{620,2}$	$A_{620,3}$	Mittelwert	Stabw. σ
0,0000	0,175	0,176	0,169	0,173	0,0031
0,0100	0,368	0,367	0,366	0,367	0,0008
0,0150	0,471	0,484	0,474	0,476	0,0056
0,0250	0,666	0,67	0,678	0,671	0,0050
0,0375	0,927	0,923	0,925	0,925	0,0016
0,0500	1,162	1,172	1,177	1,170	0,0062

C Fettsäurezusammensetzung der kultivierten *Chlorella sorokiniana* und Vergleichswerte

Tabelle A.3: Zusammensetzung der Fettsäuren in *C. sorokiniana* nach photoautotropher und mixotropher Kultivierung im FPA sowie Vergleichswerte anderer Arbeiten.

Fettsäure	Chorella sorokiniana photoautotroph	Chlorella sorokiniana mixotroph	Chlorella sorokiniana Photoautotroph [Li et al., 2014]	Chlorella sorokiniana Mixotroph [Li et al., 2014]	Chlorella sp. [Bellou & Aggelis, 2012]
	Norm, %	Norm, %	Norm, %	Norm, %	Norm, %
C16:0	24,11	24,55	20,99	24,62	17
C16:1	1,43	2,10	5,56	3,05	5,6
C17:0	1,17	0,31	-	-	-
C18:0	1,29	1,18	0,33	3,00	0,5
C18:1 n9 trans	0,80	0,61			12,3
C18:1 n9 cis	9,38	11,11	2,96	7,62	
C18:1 n7	2,42	3,35			-
C18:2 n6 cis	26,01	30,37	13,79	24,50	41,3
C18:3 n6	1,71	1,61	33,31	20,54	0,3
C18:3 n3	31,20	24,24			18,9
C24:0	0,48	0,58	-	-	-
MUFA	14,03	17,17	22,60	19,47	17,90
PUFA	58,92	56,22	52,02	51,35	60,50
SFA	27,05	26,62	22,32	26,11	17,50