

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Untersuchung der Effekte spektralselektiver Bestrahlung auf Mikroalgen

Bachelorarbeit

Biotechnologie



vorgelegt von

Josi Steinke



Hamburg, 30.09.2019

Gutachter: Prof. Dr. Birger, Anspach (HAW Hamburg)

Gutachter: Dipl. Biol. Mark, Helamieh (SSC GmbH Hamburg)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt in Zusammenarbeit mit der
Firma SSC GmbH Hamburg

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Betreuer Mark Helamieh, der mich bei der Laborarbeit unterstützt und mir bei Fragen und Schwierigkeiten immer mit wertvollen Anregungen weitergeholfen hat. Ich möchte mich auch bei Annkathrin Gebhardt bedanken, die mir den Einstieg in die Laborarbeit durch ihre Erfahrungen und Ratschläge sehr erleichtert hat.

Ich danke außerdem Dr. Martin Kerner, der es mir ermöglichte meine Abschlussarbeit in Zusammenarbeit mit seinem Unternehmen Strategic Science Consult GmbH Hamburg zu schreiben und so einen Einblick in die Forschung zu erhalten.

Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. Birger Anspach bedanken, der sich bereit erklärt hat meine Bachelorarbeit zu betreuen und zu bewerten.

Besonders danke ich Jo für die vielen Erklärungen und Tipps zur statistischen Auswertung, für das Korrekturlesen und die aufbauenden Worte. Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinen Schwestern für die Unterstützung und den Glauben an mich danken.

Inhalt

| | |
|---|----|
| Zusammenfassung..... | 1 |
| Abkürzungsverzeichnis | 3 |
| 1 Einleitung..... | 4 |
| 1.1 Mikroalgen und ihre Verwendung | 4 |
| 1.2 Hintergrund und Ziel der Arbeit | 6 |
| 2 Grundlagen | 8 |
| 2.1 <i>Acutodesmus obliquus</i> | 8 |
| 2.2 Fettsäuren | 8 |
| 2.3 Fettsäuren in Chloroplasten..... | 10 |
| 2.4 Beeinflussung der Fettsäureprofile in Mikroalgen..... | 12 |
| 2.5 Gaschromatographie und Massenspektrometrie zur Analyse von Fettsäuren | 13 |
| 2.6 Hypothesen | 15 |
| 3 Material und Methoden | 16 |
| 3.1 Kultivierung | 16 |
| 3.2 Fettsäurenextraktion und Analyse mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie | 19 |
| 3.3 Datenauswertung..... | 22 |
| 4 Ergebnisse..... | 23 |
| 4.1 Fettsäuren | 23 |
| 4.2 Vorkulturen | 24 |
| 4.3 Temperatureffekte | 24 |
| 4.4 Intensitätseffekte | 29 |
| 4.5 Farbeffekte | 32 |
| 5 Diskussion | 34 |
| 5.1 Fettsäuren | 34 |
| 5.2 Temperatureffekte | 35 |
| 5.3 Intensitätseffekte | 36 |
| 5.4 Farbeffekte | 36 |

| | |
|--|----|
| 5.5 Überlagerte Effekte | 38 |
| 5.6 Produktion von Fettsäuren in <i>Acutodesmus obliquus</i> | 38 |
| 6 Fazit | 40 |
| 7 Literaturverzeichnis | 41 |
| 8 Eidesstattliche Erklärung | 44 |
| 9 Anhang..... | 45 |
| 9.1 Photonenflussdichten | 45 |
| 9.2 Transmissionsspektren der Filterfolien | 45 |
| 9.3 Fettsäureprofile..... | 46 |
| 9.4 p-Werte und Prüfgrößen | 54 |

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurde in Zusammenarbeit mit der SSC GmbH Hamburg an den laufenden Forschungsarbeiten von Mark Helamieh am „Institut für nachhaltige Chemie und Umweltchemie“ der Leuphana Universität mitgearbeitet. Untersucht wurde der Einfluss von Temperatur, Lichtintensität und Lichtspektrum auf die Fettsäurezusammensetzung in der Mikroalge *Acutodesmus obliquus*. Dazu wurden Proben aus vorhergehenden Kultivierungsversuchen analysiert, die im Praxissemester durchgeführt wurden, um den Einfluss von Temperatur und Licht auf das Wachstum der Mikroalge zu testen. Durch diese Arbeit konnten erstmalig optimale Parameter für die Produktion nahrungsmittelrelevanter Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* definiert werden.

Es wurden drei Versuche bei der gleichen Photonenflussdichte ($480 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) aber unterschiedlichen Temperaturen (20, 30 und 35 °C) und drei Versuche bei der gleichen Temperatur (30 °C) aber unterschiedlichen Photonenflussdichten ($120, 480$ und $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durchgeführt. Die Photonenflussdichte ist ein Maß für die Intensität des Lichtes. Für die Beleuchtung der Algen wurden Metall Halogen Lampen genutzt, die ein annähernd solares Spektrum erzeugt haben. In allen Versuchen wurden optische Filterfolien genutzt, um den Algen rotes (580 nm - 700 nm), grünes (450 nm - 650 nm) und blaues (380 nm - 540 nm) Licht zu applizieren. Die Kontrollgruppe (Weißlicht) wurde mit dem ungefilterten Spektrum der Lampen bestrahlt. Für die Analyse der Fettsäuren wurden Proben von den Vorkulturen und zu den Zeitpunkten 1h, 3h, 48h und 72 h nach Versuchsbeginn entnommen. Um die Fettsäuren zu extrahieren, wurde eine abgewandelte Folch Extraktion durchgeführt. Die anschließende Analyse der Fettsäuren erfolgte mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie.

Es wurden 15 verschiedene Fettsäuren in *A. obliquus* identifiziert, wobei die Fettsäuren 16:0 und 18:3 zu den größten prozentualen Anteilen enthalten waren. Da alle Vorkulturen ein sehr ähnliches Fettsäureprofil aufwiesen, waren die Versuche vergleichbar und Veränderungen in den Anteilen der Fettsäuren konnten auf Änderungen der Temperatur- oder Lichtverhältnisse zurückgeführt werden. Eine niedrige Kultivierungstemperatur hat in den Mikroalgen zu höheren Anteilen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und zu geringeren Anteilen an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren geführt. Mit steigender Lichtintensität sind die Anteile an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren gesunken. Die Anteile der mehrfach ungesättigten Fettsäuren 16:2, 16:3 und 18:2 sind ebenfalls gesunken, während die Anteile der Fettsäuren 16:4, 18:3 und 18:4 angestiegen sind. Zwischen der Bestrahlung der Algen mit weißem, grünem und blauem Licht haben sich keine signifikanten Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung ergeben. Das rote Licht hat jedoch zu signifikant höheren Anteilen der Fettsäuren 16:2, 16:3, 18:1 und 18:2 und signifikant geringeren

Zusammenfassung

Anteilen der Fettsäuren 16:4 und 18:3 in den Mikroalgen geführt. Mit steigender Kultivierungsdauer waren die Temperatur- und Lichteffekte verstärkt zu beobachten. Für die Produktion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt werden können, haben sich besonders eine hohe Lichtintensität, niedrige Temperaturen und die Bestrahlung mit weißem oder grünem Licht als geeignet erwiesen.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------|---|
| <i>A. obliquus</i> | <i>Acutodesmus obliquus</i> |
| C-Atom | Kohlenstoffatom |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| FA | Fettsäure (Fatty acid) |
| FAME | Fettsäuremethylester (fatty acid methyl ester) |
| g L ⁻¹ | Gramm pro Liter |
| GC-MS | Gaschromatographie-Massenspektrometrie |
| h | Stunde (hour) |
| H-Atom | Wasserstoffatom |
| MUFA | einfach ungesättigte Fettsäure (mono unsaturated fatty acid) |
| nm | Nanometer |
| OD | optische Dichte |
| OD-TS | Korrelation von optischer Dichte zur Trockenmasse |
| PUFA | mehrfach ungesättigte Fettsäure (polyunsaturated fatty acid) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute) |
| SFA | gesättigte Fettsäure (saturated fatty acid) |
| SSC | Strategic Science Consult |
| TAG | Triacylglycerol |
| TS | Trockensubstanz |
| μmol m ⁻² s ⁻¹ | Mikromol pro Quadratmeter und Sekunde |

1 Einleitung

1.1 Mikroalgen und ihre Verwendung

Mikroalgen sind mikroskopisch kleine, Photosynthese betreibende Organismen. Im engeren Sinne sind dies eukaryotische Einzeller, die dadurch auf zellulärer und biochemischer Ebene den Landpflanzen ähnlich sind. Wie Landpflanzen können sie Sonnenenergie nutzen, um Wasser und Kohlenstoffdioxid in Biomasse und Energie umzuwandeln (Sheehan et al. 1998). Verbreitet sind Mikroalgen sowohl in aquatischen Systemen als auch auf der Oberfläche verschiedenster Böden (Richmond 2004). Dort können sie als einzelne Zellen oder in Gruppen von mehreren Zellen auftreten (Sheehan et al. 1998). Weltweit machen Mikroalgen etwa 50 % der gesamten photosynthetischen Aktivität und 70 % der Biomasse aus (Day et al. 1999). Damit leisten sie einen bedeutenden Beitrag zur Reduzierung klimaschädlicher CO₂ Emissionen in der Luft (Behera und Varma 2019).

Ein Anwendungsbereich dieser Organismen ist die Reinigung von Industrieabgasen und die Behandlung von Abwasser. Die Biomasse kann außerdem für die Herstellung von Biotreibstoffen genutzt werden, was aufgrund der Verknappung fossiler Rohstoffe und des Klimawandels zunehmend an Bedeutung gewinnt (Kumar et al. 2018; Richmond 2004). Da Mikroalgen unter anderem Phenole, Pigmente und Proteine enthalten, können sie in der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Kosmetik- oder Pharmaindustrie eingesetzt werden (Stengel und Connan 2015; Chisti 2008). Besonders interessant sind ω -3-Fettsäuren und ω -6-Fettsäuren, die für ihre gesundheitsfördernde Wirkung bekannt sind (Hamm und Neuberger 2008).

Gegenüber Landpflanzen, aus denen ebenfalls Biotreibstoffe und Öle hergestellt werden können, bieten Mikroalgen einige Vorteile. Sie zeichnen sich unter anderem durch eine hohe Toleranz gegenüber wechselnden Umweltbedingungen wie etwa schwankenden Temperaturen oder pH-Werten aus. Bei optimalen Bedingungen wachsen Mikroalgen exponentiell und damit deutlich schneller als Landpflanzen, die Biomasse kann sich in weniger als 24 Stunden verdoppeln (Chisti 2008). Zudem ist die photosynthetische Effizienz der Mikroalgen deutlich höher (Morita et al. 2000). Durch ihren hohen Ölgehalt und das schnelle Wachstum sind Mikroalgen deutlich effizienter für die Gewinnung von Biodiesel nutzbar (Abomohra et al. 2013; Ferrigo et al. 2015). Sie benötigen weniger Fläche, um dieselbe Menge an Öl zu produzieren wie Landpflanzen (Demirbas 2008; Mata et al. 2010). Für die Kultivierung kann kostengünstiges Medium, Salzwasser, Brackwasser oder auch Abwasser genutzt werden (Mata et al. 2010). Mikroalgen benötigen für das Wachstum hauptsächlich die Nährstoffe Nitrat, Phosphat und einige Spurenstoffe. Zusätzlich müssen ihnen Licht und CO₂ zur Verfügung stehen (Chisti 2008). Die Begasung kann mit Rauchgas oder Industrieabgasen erfolgen.

Einleitung

Dabei verringern Mikroalgen gleichzeitig klimaschädliche Emissionen durch die Fixierung von CO₂ (Morita et al. 2000). Da die Kultivierung in Reaktoren stattfindet, kann sie auch auf landwirtschaftlich nicht nutzbarem Land stattfinden. Somit entsteht keine Konkurrenz um die Nutzung landwirtschaftlicher Flächen (Hindersin et al. 2013; Mata et al. 2010).

Für die Nahrungsmittelindustrie sind besonders ω -3-Fettsäuren und ω -6-Fettsäuren interessant. Es handelt sich dabei um essentielle Fettsäuren, die vom menschlichen Körper nicht selbst hergestellt werden können, sondern mit der Nahrung zugeführt werden müssen (Singer 1994). Sie haben einen sehr hohen Stellenwert für die Gesundheit und können in großen Mengen aus Mikroalgen gewonnen werden. Als Bestandteil von Zellmembranen stellen sie sicher, dass die Membranen fluide bleiben, was den Stoffaustausch und die Informationsweitergabe begünstigt (Hamm und Neuberger 2008). Darüber hinaus besteht die Hälfte der organischen Bestandteile des Gehirns und des Nervensystems aus Fettbestandteilen (Hamm und Neuberger 2008). Bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen haben in verschiedenen Studien vor allem EPA (Eicosapentaensäure) und DHA (Docosahexaensäure) positive Effekte gezeigt (Lebensmittelchemische Gesellschaft 2007). Sie werden im Menschen beide aus dem Vorläufermolekül α -Linolensäure synthetisiert, die unter anderem in der Mikroalge *Acutodesmus obliquus* zu finden ist (Abomohra et al. 2013; Hamm und Neuberger 2008). EPA und DHA können das Risiko für Herzinfarkte und Herzrhythmusstörungen beim Menschen nachweislich verringern (Lebensmittelchemische Gesellschaft 2007). Außerdem wirken diese Fettsäuren dem Wachstum von Ablagerungen an Gefäßwänden entgegen und können den Blutdruck schonend senken. EPA spielt zudem eine wichtige Rolle als Vorstufe für Eicosanoide. Diese hormonähnlichen Substanzen wirken gefäßerweiternd und entzündungshemmend, verringern die Blutgerinnung und Schmerzübertragung und stimulieren die Immunantwort (Hamm und Neuberger 2008). Diese Eigenschaften sichern eine gute Durchblutung der Organe und beugen dadurch auch Herzerkrankungen vor. Als Nahrungsergänzungsmittel sind ω -3-Fettsäuren und ω -6-Fettsäuren bereits in Form von Fischölkapseln oder Algenölkapseln erhältlich. Jedoch ist die Produktion von Fischöl mit Problemen wie der Überfischung und der Schwermetallbelastung verbunden. Eine Deckung des steigenden Bedarfs wird dadurch erschwert (Lebensmittelchemische Gesellschaft 2007). Alternativ können hochkonzentrierte Öle aus Algen gewonnen werden, die reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind. Die Produktion von Mikroalgen ist unter hohen Qualitätsstandards und ohne die Gefahr von Kontaminationen möglich. Die Öle sind außerdem allergiefrei und auch für Vegetarier und Veganer geeignet (Lebensmittelchemische Gesellschaft 2007).

Darüber hinaus sind Fettsäuren aus Mikroalgen für die Herstellung von Biodiesel interessant. Biodiesel wird als Treibstoff für Transporte oder seltener auch für die Erzeugung von Elektrizität in Maschinen oder Turbinen genutzt. Das Angebot an Biodiesel steigt stetig. Im Jahr 2010 wurden ca. 18 Mrd. Liter

Einleitung

produziert und für 2025 werden 41 Mrd. Liter erwartet (Demirbas 2008). Die Vorteile von Biodiesel liegen in der biologischen Abbaubarkeit und der Verringerung der klimaschädlichen Emissionen verglichen mit herkömmlichem Diesel (Amer et al. 2019). Bei der Verbrennung werden weniger Kohlenstoffmonoxid und Schwefeloxid freigesetzt (Demirbas 2008). Eine vermehrte Verwendung von Biodiesel würde die Abhängigkeit von fossilen Brennstoffen verringern (Amer et al. 2019). Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16 bis 18 Kohlenstoffatomen sind aufgrund ihrer Viskosität, der Dichte und des Siedepunktes am besten für die Herstellung von Biodiesel geeignet (Li et al. 2018). Die am häufigsten verwendete Methode ist die Umesterung der Fette mit Methanol. Dazu werden Fette mit Methanol und einem Katalysator, wie zum Beispiel Natriumhydroxid, vermischt. Als Produkte entstehen die Methylester der Fettsäuren und Glycerol (Amer et al. 2019). Da es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, wird der Alkohol im Überschuss zugegeben, um eine möglichst hohe Ausbeute zu erhalten (Demirbas 2008).

Bisher sind jedoch der Kosten- und Energieverbrauch für die Kultivierung von Mikroalgen noch zu hoch (Ogbonna und Moheimani 2015). Aus diesem Grund ist es wichtig die Wachstumsbedingungen an eine optimierte Fettsäureproduktion anzupassen (Amer et al. 2019). Die Kopplung der Kultivierung mit einem System zur Gewinnung erneuerbarer Energien, könnte die Energieversorgung sichern.

1.2 Hintergrund und Ziel der Arbeit

Die SSC GmbH strebt gemeinsam mit der DLR in Oldenburg die Entwicklung eines Hybridsystems aus Solarzellen und Photobioreaktoren an. Es soll ein gebäudeintegriertes System entstehen, indem Solarzellen in eine Bioenergiefassade integriert werden. Das System soll die gleichzeitige Gewinnung von elektrischem Strom durch Photovoltaik und Algenbiomasse ermöglichen. Dazu werden von der DLR semitransparente Solarzellen hergestellt, die nur einen Teil der Sonnenstrahlung für die Photovoltaik nutzen. Der transmittierte Teil der Strahlung soll in den dahinterliegenden Photobioreaktoren für das Wachstum von Mikroalgen verwendet werden. Um das Hybridsystem möglichst effizient zu gestalten, ist es entscheidend welcher Anteil des Sonnenspektrums die höchste Produktivität der Mikroalgen hervorruft. Hierbei sollen sowohl ein starkes Wachstum als auch eine möglichst hohe Ausbeute an Wertstoffen aus den Mikroalgen erreicht werden.

In einer vorangehenden Arbeit wurden im Rahmen der Forschungsarbeiten von Mark Helamieh am „Institut für nachhaltige Chemie und Umweltchemie“ der Leuphana Universität Lüneburg Kultivierungsversuche mit Mikroalgen durchgeführt. Dabei wurde in Zusammenarbeit mit Annkathrin Gebhardt der Einfluss der Lichtintensität (Photonenflussdichte), des Lichtspektrums und der Temperatur auf das Wachstum der Mikroalge *Acutodesmus obliquus* untersucht (Steinke 2019).

Einleitung

Getestet wurde die Bestrahlung der Algen mit weißem, rotem, grünem und blauem Licht bei jeweils drei verschiedenen Photonenflussdichten ($120, 480$ und $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Außerdem wurden die Kultivierungsversuche bei drei verschiedenen Temperaturen ($20, 30$ und $35 \text{ }^\circ\text{C}$) durchgeführt. Eine höhere Strahlungsintensität hat zu einem stärkeren Wachstum der Algen geführt. Bezüglich der Temperaturen war bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ das größte Wachstum zu beobachten. Die Kombination von weißem Licht, hoher Lichtintensität und einer Temperatur von $30 \text{ }^\circ\text{C}$ zeigte insgesamt das stärkste Wachstum. Der Vergleich der vier Spektralbereiche ergab bei rotem Licht meist das größte Wachstum. Darüber hinaus hat sich bei hohen Intensitäten und einer hohen Biomassenkonzentration grünes Licht als effizienter für das Wachstum erwiesen als rotes Licht. Die Bestrahlung der Mikroalgen mit dem blauen Spektralbereich hat in allen Versuchen das geringste Wachstum erzielt.

In einigen Studien hat die Änderung von Lichtintensität, Lichtspektrum und Temperatur zudem eine veränderte Zusammensetzung der Fettsäuren in Mikroalgen gezeigt (Hultberg 2014). In dieser Bachelorarbeit wurde mit Proben aus den oben genannten Kultivierungsversuchen weitergearbeitet, um so den Einfluss von Lichtintensität, Lichtspektrum und Temperatur auf die Fettsäurezusammensetzung in den Mikroalgen zu analysieren. Es wurde untersucht, ob die Fettsäureproduktion der Mikroalge *Acutodesmus obliquus* durch Licht und Temperatur gesteuert werden kann.

2 Grundlagen

2.1 *Acutodesmus obliquus*

Eukaryotische Mikroalgen besitzen eine Zellwand, welche aus Cellulose besteht mit einer zusätzlichen Plasmamembran dahinter. Das Genom ist in einem Zellkern organisiert, der durch eine Membran begrenzt wird. Des Weiteren besitzen Mikroalgen Zellorganellen wie Mitochondrien, den Golgi-Apparat, das endoplasmatische Retikulum und Chloroplasten (Richmond 2004). In den Chloroplasten befinden sich lichtsammelnde Komplexe, die Chlorophylle enthalten und für die Photosynthese in den Zellen verantwortlich sind (Berg et al. 2018). Im Fall der Grünalgen sind es hauptsächlich die Chlorophylle a und b sowie Carotinoide. Die Membranen der Chloroplasten sind eine potentielle Quelle für mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Richmond 2004).

Die Mikroalge *Acutodesmus obliquus* gehört zu den Grünalgen, den Chlorophyceae (Richmond 2004). Sie hat eine durchschnittliche Größe von 8 bis 10 µm und eine längliche Gestalt mit spitz zulaufenden Polen (Krienitz und Bock 2012). Die Mikroalge zeichnet sich durch hohe Wachstumsraten und einen hohen Lipidgehalt aus. In verschiedenen Studien mit *A. obliquus* machten Lipide 19 – 47 % der Trockenmasse aus (Abomohra et al. 2013; Ferrigo et al. 2015). Die Zellen eignen sich somit für die Produktion von Biodiesel oder die Gewinnung von Fettsäuren für die Nahrungs- und Futtermittelindustrie (Ferrigo et al. 2015). Des Weiteren toleriert *A. obliquus* weite Temperatur- und pH-Bereiche und zeigt dadurch auch bei der Kultivierung in Abwässern eine hohe Vitalität. Verglichen mit anderen Arten hat *A. obliquus* in einer Untersuchung von 2016 eine stärkere Toleranz gegenüber hohen CO₂ Konzentrationen im Wasser gezeigt (Yun et al. 2016). Dadurch könnte sie CO₂ aus den Abgasen von mit Kohle oder Öl betriebenen Kraftwerken nutzen (Yun et al. 2016).

2.2 Fettsäuren

Lipide wie Fette oder Öle sind Ester der Fettsäuren (fatty acids, FAs) (Mortimer und Müller 2010). Bei Fetten handelt es sich um Triacylglycerole (TAG) bestehend aus drei FAs, die mit Glycerin verestert sind (vgl. Abb. 1) (Hamm und Neuberger 2008). TAG machen ca. 99 % der Lipide aus, die vom Menschen mit der Nahrung aufgenommen werden. Sie können drei verschiedene FAs enthalten. Die TAG unterscheiden sich untereinander in der Zusammensetzung der FAs (Lebensmittelchemische Gesellschaft 2007).

Grundlagen

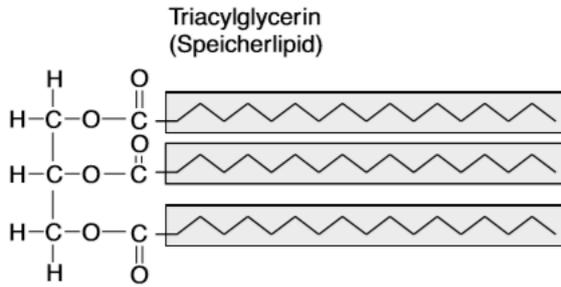


Abbildung 1: Strukturformel eines Triacylglycerols bestehend aus einem Glycerinmolekül verestert mit drei Fettsäuren (grau hinterlegt). Aus Heldt und Piechulla (2015).

Fettsäuren zählen zu den Monocarbonsäuren und bestehen aus einer unverzweigten Kohlenwasserstoffkette mit einer Carboxylgruppe an einem Ende (Mortimer und Müller 2010). Der Unterschied zwischen verschiedenen FAs liegt in der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad. Hinsichtlich der Kettenlänge wird in kurzkettige (< 8 C-Atome), mittelkettige (8-12 C-Atome) und langkettige (>12 C-Atome) FAs unterteilt (Nettleton 1995). In natürlichen Lipiden kommen nur FAs mit einer geraden Anzahl an C-Atomen vor, da sie aus C₂-Einheiten (Essigsäure) synthetisiert werden (Mortimer und Müller 2010). Bei gesättigten FAs sind an jedes Kohlenstoffatom zwei Wasserstoffatome (H-Atome) gebunden. Ungesättigte FAs dagegen enthalten nicht die maximale Anzahl an H-Atomen. Hier liegt eine Doppelbindung zwischen zwei C-Atomen vor, die jeweils nur mit einem H-Atom verknüpft sind (vgl. Abb. 2) (Hamm und Neuberger 2008). In einer FA können eine oder mehrere Doppelbindungen vorhanden sein. Jedoch liegt zwischen zwei Doppelbindungen mindestens ein Abstand von zwei C-Atomen, da das Molekül ansonsten instabil werden würde (Singer 1994). Je mehr Doppelbindungen eine FA aufweist, desto höher ungesättigt ist sie. FAs mit nur einer Doppelbindung werden als einfach ungesättigte (monounsaturated fatty acid, MUFA), solche mit mehreren Doppelbindungen als mehrfach ungesättigte FAs (polyunsaturated fatty acid, PUFA) bezeichnet (Hamm und Neuberger 2008). Gesättigte FAs (saturated fatty acid, SFA) weisen eine gerade Struktur auf und bilden Fette mit hohem Schmelzpunkt. Die Doppelbindungen in ungesättigten FAs sorgen für eine verkürzte Struktur, da an den Doppelbindungen Knicke entstehen. Dadurch sind die Wechselwirkungen zu anderen FAs schwächer, was einen niedrigeren Schmelzpunkt zur Folge hat (Nettleton 1995).

Die Benennung von FAs erfolgt nach der Anzahl der C-Atome und der Anzahl der vorhandenen Doppelbindungen. Beispielsweise wird die Linolsäure mit 18 C-Atomen und zwei Doppelbindungen als 18:2 bezeichnet (Nettleton 1995). In der Gruppe der PUFAs wird zudem von Omega-Fettsäuren, wie ω-3 oder ω-6-Fettsäuren, gesprochen. Eine ω-3-FA besitzt am dritten C-Atom die erste Doppelbindung. Gezählt wird dabei vom N-terminalen Ende (ω-Kohlenstoffatom) des Moleküls aus (vgl. Abb. 2) (Hamm und Neuberger 2008). Es können noch weitere Doppelbindungen in der FA vorhanden sein. Bei einer ω-6-FA befindet sich die erste Doppelbindung entsprechend vom N-terminalen Ende aus am sechsten

Grundlagen

C-Atom. Neben der Omega-Schreibweise ist auch die Bezeichnung als n-3 oder n-6-FA möglich (Singer 1994).

Die Omega-n-Fettsäuren gehören zu den langkettigen, ungesättigten FAs mit einer Kettenlänge von mindestens 18 C-Atomen (Hamm und Neuberger 2008). Besonders ω -3-FAs und ω -6-FAs sollen einen positiven Effekt auf die menschliche Gesundheit haben. Die wichtigsten ω -6-FAs sind Arachidonsäure (20:4, ARA) und ihr Vorläufermolekül, Linolsäure (18:2, LA). Linolsäure ist hauptsächlich in Pflanzenölen enthalten (Singer 1994). Von den ω -3-FAs spielen vor allem α -Linolensäure (18:3, ALA), Eicosapentaensäure (20:5, EPA) und Docosahexaensäure (22:6, DHA) eine Rolle für die Gesundheit (Hamm und Neuberger 2008). Zu finden sind diese FAs zu großen Teilen in Fischöl, kaum aber in Pflanzenöl.

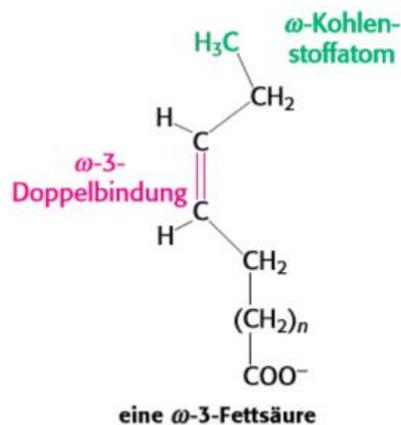


Abbildung 2: Strukturformel einer ω -3-Fettsäure bestehend aus einer Kohlenwasserstoffkette mit einer Carboxylgruppe an einem Ende. Es handelt sich um eine ungesättigte Fettsäure mit einer Doppelbindung am dritten Kohlenstoffatom, gezählt vom N-terminalen Ende des Moleküls. Eine ω -3-Fettsäure kann noch weitere Doppelbindungen enthalten. Aus Berg et al. (2018).

2.3 Fettsäuren in Chloroplasten

Als photosynthetische Organismen sind Mikroalgen dazu in der Lage mithilfe des Sonnenlichts aus Wasser und Kohlenstoffdioxid chemische Energie zu gewinnen. Dabei entstehen als Produkte Kohlenhydrate und Sauerstoff, der an die Umgebung abgegeben wird (Kayser und Aversch 2015). Die Photosynthese findet ausschließlich in Chloroplasten statt. Chloroplasten sind Zellorganellen, die eine doppelte Membran umgibt (Boujard et al. 2014). In den Chloroplasten befinden sich Thylakoide, die durch Thylakoidmembranen vom Chloroplastenstroma abgegrenzt sind. Bei den Thylakoiden handelt es sich um flache Membranstapel, in denen verschiedene für die Photosynthese notwendige Proteine enthalten sind (Berg et al. 2018).

Grundlagen

Folglich enthalten Chloroplasten drei verschiedene Membranen, die innere und äußere Membran und die Thylakoidenmembran (Berg et al. 2018). Zellmembranen bestehen hauptsächlich aus Lipiden und Proteinen. Die Membranlipide sind amphipatische Moleküle, da sie einen hydrophoben und einen hydrophilen Anteil besitzen (Sonnleitner und Rojacher 2013). Den größten Teil der Membranlipide bilden die Phospholipide. In pflanzlichen Zellen enthalten diese meist ein Glycerinrückgrad und werden als Phosphoglyceride bezeichnet. Ein Phosphoglycerid setzt sich zusammen aus einem Glycerinmolekül, an das zwei Fettsäuren und ein phosphorylierter Alkohol gebunden sind (Berg et al. 2018). Die beiden FAs bilden den hydrophoben Teil, während der Rest des Moleküls die hydrophile Kopfgruppe bildet (Sonnleitner und Rojacher 2013). In wässrigen Medien kommt es zu einer Selbstaggregation dieser Lipide (Berg et al. 2018). Es handelt sich um einen spontanen Prozess, bei dem die FAs über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander in Kontakt treten. Aus zwei einzelnen Schichten dieser Lipide bildet sich dabei eine Lipiddoppelschicht aus (vgl. Abb. 3) (Boujard et al. 2014). Die FAs bilden einen hydrophoben Innenraum, während die Kopfgruppen nach außen hin über elektrostatische Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit der wässrigen Umgebung interagieren (Berg et al. 2018). Durch die verschiedenen Wechselwirkungen und den Zusammenschluss mit sich selbst sind Lipiddoppelschichten sehr stabil und eignen sich gut für die Bildung von Kompartimenten (Berg et al. 2018). Für den Stofftransport über die Membran sind verschiedene Proteine in die Membran eingebettet (Sonnleitner und Rojacher 2013).

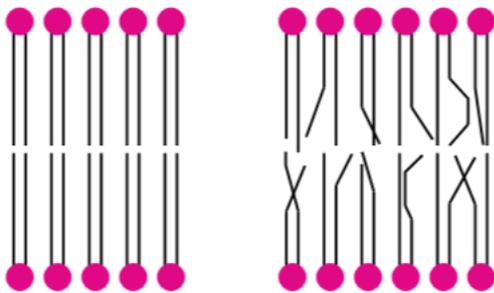


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Membranlipiden in einer Lipiddoppelschicht. Außen befinden sich die hydrophilen Kopfgruppen und innen die hydrophoben Fettsäuren. Links sind ausschließlich Lipide mit gesättigten Fettsäuren dargestellt, während rechts Lipide mit ungesättigten Fettsäuren zu sehen sind. Durch die Doppelbindungen weisen die ungesättigten Fettsäuren eine andere räumliche Struktur auf und sorgen für eine höhere Membranfluidität. Aus Heldt und Piechulla (2015).

Die FAs in den Membranlipiden können sowohl gesättigt als auch ungesättigt sein. Am häufigsten kommen FAs mit 16 oder 18 C-Atomen vor (Heldt und Piechulla 2015). Synthetisiert werden sie in den Chloroplasten hauptsächlich aus den Vorläufern Palmitinsäure (16:0) und Ölsäure (18:1). Dies erfolgt durch Verlängerung der Ketten und Einbringen von Doppelbindungen (Hu et al. 2008). Weitere wichtige FAs in den Membranlipiden von Pflanzen sind Stearinsäure (18:0), Linolsäure (18:2) und α -Linolensäure (18:3) (Heldt und Piechulla 2015). Die Zusammensetzung der FAs in Pflanzen, Tieren und

auch Algen verschiebt sich mit Änderung der Temperatur (Lewis 1961). Aufgrund der Doppelbindungen können ungesättigte FAs nicht so dicht gepackt werden wie gesättigte und erhöhen somit die Fluidität einer Membran (vgl. Abb. 3). Dieser Effekt wird für die Anpassung an niedrige Temperaturen genutzt, indem die Zellen vermehrt Lipide mit ungesättigten FAs synthetisieren. Bei höheren Temperaturen steigt der Sättigungsgrad der FAs in den Membranlipiden (Sharma et al. 2012).

2.4 Beeinflussung der Fettsäureprofile in Mikroalgen

Die Zusammensetzung der Lipide in Mikroalgen kann sowohl durch chemische als auch durch physikalische Wachstumsparameter beeinflusst werden (Sharma et al. 2012). Die Kultivierung unter nicht optimalen Wachstumsbedingungen führt zu Stress in der Zelle, was die Synthese neutraler Lipide begünstigt. Dadurch werden mehr TAG produziert, die meist in Form von dicht gepackten Lipid Körperchen als Speicher für Kohlenstoff und Energie dienen (Hu et al. 2008). Stress kann bei Mikroalgen zum Beispiel durch Nährstofflimitierung, den Salzgehalt, einen nicht optimalen pH-Wert oder Schwermetalle hervorgerufen werden (Sharma et al. 2012). Besonders die Stickstoff Limitierung bewirkt eine stärkere Produktion von TAG in den Zellen. Diese können leicht durch Umesterung in Biodiesel umgewandelt werden (Sharma et al. 2012). Allerdings hat die Stickstoff Limitierung meist eine geringere photosynthetische Effizienz und damit auch ein geringeres Wachstum der Algen zur Folge (Remmers et al. 2017). In Studien mit *Acutodesmus obliquus* hat sich gezeigt, dass auch die Begasung der Algen mit Industrieabgasen Stress erzeugen kann. Im Gegensatz zu der Begasung mit synthetischem CO₂ haben die Algen durch die Abgase einen höheren Anteil an PUFAs erzeugt (Yun et al. 2016).

Eine weitere Methode die Produktion von TAG zu beeinflussen ist die Änderung der Lichtintensität. Studien haben gezeigt, dass hohe Lichtintensitäten zu einer stärkeren Synthese von TAG führen (Sharma et al. 2012). Dazu werden vor allem gesättigte und einfach ungesättigte FAs hergestellt. Niedrige Lichtintensitäten induzieren dagegen die Synthese von PUFAs, die in Form von polaren Lipiden in die Chloroplastenmembranen integriert werden (Hu et al. 2008). Auch die Kultivierungstemperatur hat einen Einfluss auf den Sättigungsgrad der FAs in Mikroalgen. Geringere Temperaturen haben einen Anstieg der PUFAs zur Folge, während bei höheren Temperaturen mehr gesättigte FAs synthetisiert werden (Lewis 1961). Die Zellen reagieren auf niedrigere Temperaturen, indem sie die Membranfluidität durch den Einbau von PUFAs erhöhen. Dieser Mechanismus ermöglicht es den Algen weite Temperaturbereiche zu tolerieren (Hu et al. 2008). Des Weiteren beschrieb eine Studie mit *Chlorella vulgaris* einen Zusammenhang zwischen dem Spektralbereich und dem Sättigungsgrad der FAs (Hultberg 2014). Verglichen wurden die sechs Lichtfarben blau (460 nm),

grün (525 nm), gelb (585 nm), rot (620 nm), lila (660 nm und 460 nm) und weiß (430-730 nm). Das grüne Licht hat eine Erhöhung der Konzentration an PUFAs gezeigt. In besonders hohen Anteilen waren Hexadecatriensäure (16:3) und Alpha-Linolensäure (18:3) enthalten, die beide Bestandteil der Thylakoidenmembran sind. Die erhöhte Produktion dieser FAs deutet dementsprechend auf Veränderungen in den Chloroplasten hin (Hultberg 2014).

2.5 Gaschromatographie und Massenspektrometrie zur Analyse von Fettsäuren

Der Begriff Chromatographie leitet sich aus dem Griechischen von den Wörtern „chromos“ (dt. Farben) und „graphein“ (dt. schreiben) ab (aprentas 2017a). Es gibt verschiedene Varianten der Chromatographie, die in unterschiedlichen Bereichen Anwendung finden. Die analytische Chromatographie hat das Ziel Stoffgemische zu trennen und die Inhaltsstoffe zu identifizieren und zu quantifizieren. In der präparativen Chromatographie wird die Methode genutzt, um Substanzen zu isolieren und zu reinigen (aprentas 2017a). Die chromatographischen Methoden können meist nach Beschaffenheit, bzw. Aggregatzustand, der mobilen und stationären Phase eingeteilt werden. So wird in Flüssigkeitschromatographie und Gaschromatographie unterschieden. Weitere Kriterien für die Einteilung sind die Arbeitstechnik (Schicht- oder Säulenchromatographie) und die verschiedenen Trennmechanismen (aprentas 2017a).

Die zu analysierende Probe wird zu Beginn mit der mobilen Phase auf den Anfang der stationären Phase aufgetragen und dann entlang der stationären Phase transportiert. Die stationäre Phase ist eine ruhende Trennstrecke, die fest, flüssig oder als Gel vorliegen kann (aprentas 1977a). Sie befindet sich entweder in einer gepackten Säule oder einer Kapillarsäule. Die mobile Phase muss, um über die stationäre Phase wandern zu können, flüssig oder gasförmig sein. Wichtig ist, dass die Phasen nicht mischbar sind (Kolb 2003). Während die Probe mit der mobilen Phase über die Säule wandert, verteilen sich die einzelnen Substanzen der Probe zwischen den beiden Phasen. Durch Wechselwirkung mit der stationären Phase wird die Fließgeschwindigkeit einzelner Moleküle verringert, was als Retention bezeichnet wird. Substanzen, die stärker mit der stationären Phase in Wechselwirkung treten, werden stärker retardiert und erreichen das Ende der Säule zu einem späteren Zeitpunkt als Moleküle, die in der mobilen Phase bleiben (Sparkman et al. 2011). Ein Detektor am Ende der Säule misst die Retentionszeiten der einzelnen Substanzen. Bei konstanten Bedingungen ist die Retentionszeit für eine Substanz charakteristisch und kann zur Identifikation genutzt werden (aprentas 2017a). Der Detektor leitet die Signale an einen Computer weiter, der aus den Daten ein Chromatogramm erstellt. Dabei wird jede Substanz, die von der Säule eluiert, als ein Peak dargestellt (aprentas 2017a). Das Chromatogramm ermöglicht die Beurteilung der Qualität der Trennung anhand der Form eines Peaks

Grundlagen

und der Abstände zwischen den Peaks. Durch Berechnung der Peakflächen können Substanzen quantifiziert werden (Sparkman et al. 2011).

In der Gaschromatographie (GC) stellt ein inertes Trägergas die mobile Phase dar. Das Trägergas muss sauerstofffrei sein, da die oxidierende Wirkung des Sauerstoffs die stationäre Phase beeinflussen könnte (aprentas 2017a). Es werden meist Helium, Wasserstoff oder Stickstoff verwendet. Die stationäre Phase ist flüssig und wird als dünne Schicht auf eine Kapillare aufgetragen (Kolb 2003). Kapillarsäulen haben eine Länge von ca. 25 bis 30 Metern und können durch ihre hohe Biegsamkeit aufgewickelt werden. In der Probenvorbereitung sollte die zu analysierende Probe in einem inerten Lösungsmittel gelöst werden. Die Analytkonzentration in der Probe sollte an den Detektor angepasst werden, um diesen nicht zu überladen (aprentas 2017a). Injiziert wird die Probe mittels Spritze in eine beheizbare Verdampfungskammer (Sparkman et al. 2011). Bei der Analyse von Fetten und Ölen ist meist eine vorherige Derivatisierung notwendig, um die Siedetemperatur zu senken (aprentas 2017a). Da sich die Probenmoleküle unterschiedlich gut in Flüssigkeit und Gas lösen, findet eine Verteilung der Moleküle zwischen den beiden Phasen statt. Zudem befindet sich die Säule in einem Säulenofen und kann beheizt werden (vgl. Abb. 4) (Sparkman et al. 2011). Oft wird ein spezielles Temperaturprogramm genutzt, wodurch die Analysendauer gesenkt und schmalere Peaks im Chromatogramm erzeugt werden (aprentas 2017a). Ein Temperaturprogramm ermöglicht außerdem die Trennung der Substanzen nach Siedetemperatur (Sparkman et al. 2011).

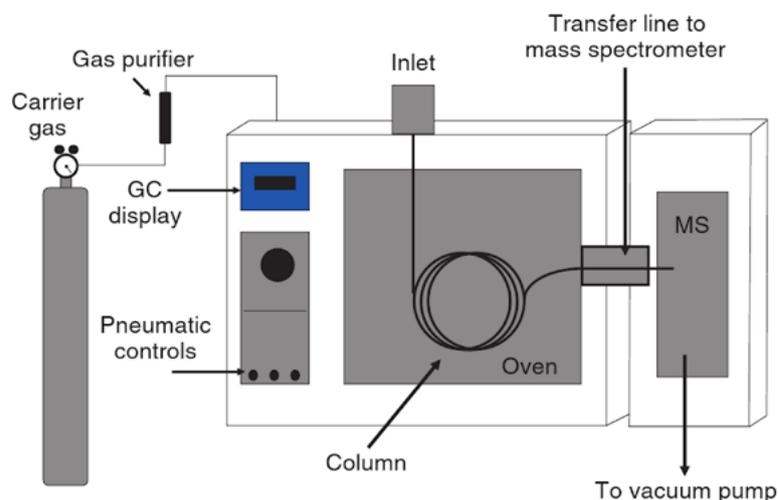


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Gaschromatographen gekoppelt mit einem Massenspektrometer. Die zu analysierende Probe wird am Injektor (Inlet) injiziert und mit dem Trägergas (Carrier Gas) durch die aufgewickelte Kapillarsäule (Column) transportiert, die sich in einem Säulenofen (Oven) befindet. Von der Säule werden die Analyten weiter in das Massenspektrometer (MS) geleitet. Aus Sparkman et al. (2011).

In der Analyse von Fettsäuren hat sich die Kopplung der GC mit einem Massenspektrometer zur Detektion der FAs etabliert. Diese Kombination bietet auch bei der Trennung von FAs in ihre Isomere eine hohe Selektivität und Sensitivität (Quehenberger et al. 2011). Die Probenmoleküle werden im

Grundlagen

gasförmigen Zustand von der GC-Säule an das Massenspektrometer weitergeleitet (vgl. Abb. 4). Dort werden die Moleküle zum Beispiel durch Elektronenstoßionisation ionisiert (Sparkman et al. 2011). Dabei treffen im elektrischen Feld beschleunigte Elektronen auf die Analyten. Durch den Zusammenstoß zerfallen die Moleküle in kleine, geladene Fragmente, die nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis getrennt werden. Für die Identifizierung der Substanzen werden die Fragmentierungsmuster mit Datenbanken verglichen. Vorteile der Massenspektrometrie sind die hohe Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit (aprentas 2017b).

2.6 Hypothesen

Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von Temperatur und Licht auf die Fettsäuren in *A. obliquus* zu untersuchen. Für die kommerzielle Anwendung dieser Mikroalge sollte eine möglichst hohe Fettsäureproduktion erreicht werden, ohne dass dabei das Wachstum aufgrund von Stress abnimmt. Auf der Grundlage der bisherigen Untersuchungen zu Effekten von Licht und Temperatur auf die Fettsäurezusammensetzung in Mikroalgen wurden die folgenden Hypothesen für diese Arbeit aufgestellt:

H1: Mit steigender Temperatur steigt der Sättigungsgrad der Fettsäuren in *A. obliquus*.

H2: Mit steigender Lichtintensität steigt der Sättigungsgrad der Fettsäuren in *A. obliquus*.

H3: Das Lichtspektrum hat einen Einfluss auf den Sättigungsgrad der Fettsäuren in *A. obliquus*.

3 Material und Methoden

3.1 Kultivierung

Für die Untersuchung des Effektes von Lichtintensität, Lichtspektrum und Temperatur auf das Wachstum und das Fettsäureprofil in Mikroalgen wurden im Vorfeld fünf Kultivierungsversuche durchgeführt (Steinke 2019). Nachdem im Praxissemester das Wachstum von *Acutodesmus obliquus* unter verschiedenen Bedingungen getestet wurde, wird in dieser Arbeit die Fettsäurezusammensetzung aus den Proben dieser Versuche untersucht.

Für alle Kultivierungsversuche wurde jeweils unter gleichen Voraussetzungen eine Vorkultur mit der Mikroalge *Acutodesmus obliquus* (SVCK 10169; Microalgae and Zygnematophyceae Collection Hamburg) erstellt. Diese wurden bei ca. 25 °C durch eine Ringleuchte (Sylvania T9 Circline 32W) mit $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beleuchtet und mit einem angefeuchteten Gemisch aus Druckluft und CO_2 (5 % v/v) begast. Für alle Versuche wurde ein Medium aus 2 g L^{-1} Flory Basic Fertilizer 1 (Euroflor) und $3,22 \text{ g L}^{-1}$ KNO_3 (Carl Roth) gelöst in destilliertem Wasser verwendet. Diese Zusammensetzung stellte sicher, dass während der Versuche über fünf Tage keine Nährstofflimitierung eintrat. Der pH-Wert des Mediums wurde mit Salzsäure (HCL) auf $7 \pm 0,5$ eingestellt. Die Kultivierung fand in einem zur Temperierung mit Wasser gefüllten Becken aus Acrylglas statt. Darin befanden sich spezielle Halterungen für Teströhrchen, die gewährleisteten, dass nur von vorne Licht auf die Röhrchen fallen konnte. Das Becken konnte mit optischen Filterfolien (Lee Filters) beklebt werden, sodass die dahinter liegenden Röhrchen nur das Lichtspektrum der jeweiligen Folie zur Verfügung hatten. Es wurden Philips MSR 575 HRCT Metall Halogen Lampen für die Beleuchtung der Algen genutzt. Sie waren 24 Stunden in Betrieb und erzeugten ein annähernd solares Spektrum (vgl. Abb. 7). Die Begasung der Test Kulturen in den Röhrchen erfolgte mit dem gleichen Gasgemisch wie auch bei den Vorkulturen. Das Gas wurde mit destilliertem Wasser angefeuchtet, um den Verdampfungseffekt in den Röhrchen zu verringern. Es gewährleistete gleichzeitig eine homogene Durchmischung der Algen, da das Gas am Boden der Röhrchen eingespeist wurde. Verluste in der Füllhöhe durch Verdampfung wurden mit destilliertem Wasser ausgeglichen. Des Weiteren konnte das Kultivierungsbecken über einen Wärmetauscher temperiert werden. Die Teströhrchen wurden zu Beginn eines Versuches mit der Biomasse aus einer Vorkultur angeimpft. Es wurde bei einer OD von 0,2 gestartet. Die folgenden Abbildungen zeigen den Versuchsaufbau (vgl. Abb. 5) und die verwendeten Lampen (vgl. Abb. 6).

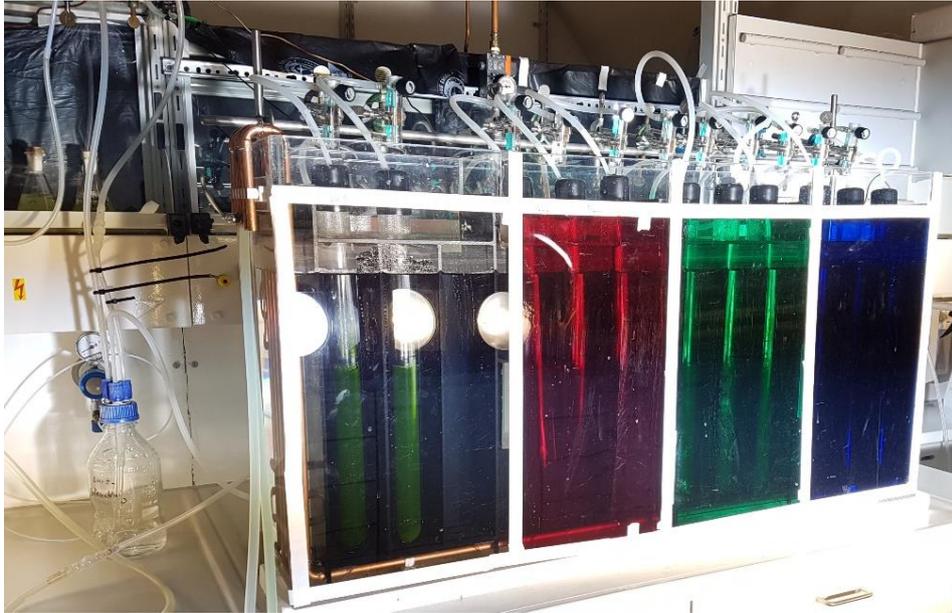


Abbildung 5: Kultivierungsbecken beklebt mit vier verschiedenen optischen Filterfolien. Darin stehen Röhren, in denen sich die Algensuspension befindet. Die Begasung erfolgt über Schläuche, die durch den Deckel der Röhren geführt werden.



Abbildung 6: Philips MSR 575 HRCT Metall Halogen Lampen für die Beleuchtung der Mikroalgen im Kultivierungsbecken.

In allen fünf Kultivierungsversuchen wurden die gleichen drei Filterfolien (rot, grün, blau) und eine Referenz ohne Folie (Weißlicht) getestet. Dabei wurden jeweils drei Teströhren dem gleichen Lichtspektrum ausgesetzt (Triplikate). Die Lichtintensität wurde über die Einstellung der Photonenflussdichte reguliert. Dabei wurden die Lampen so ausgerichtet, dass im Durchschnitt alle Röhren in einem Versuch mit der gleichen Photonenflussdichte bestrahlt wurden. Gemessen wurde die Photonenflussdichte hinter den Folien im Kultivierungsbecken, da alle Folien unterschiedliche Transmissionen aufwiesen (vgl. Abb. 7). Für jedes Teströhren wurden drei Werte aufgenommen und daraus ein Mittelwert gebildet. Da das Licht der Lampen nicht ganz gleichmäßig über alle drei Röhren einer Farbe verteilt war, wurden jeweils aus den Werten der Triplikate

Material und Methoden

nochmals Mittelwerte gebildet, sodass die Photonendichten der Farbgruppen im Mittel vergleichbar waren. Die Mittelwerte für jedes Röhrchen und jeden Versuch sind im Anhang aufgeführt (vgl. Abb. 23). Die blaue Folie hatte eine hohe Transmission im Bereich von 380 nm bis 540 nm. Das Spektrum der roten Folie lag bei 580 nm bis 700 nm und das Spektrum der grünen Folie im Bereich von 450 nm bis 650 nm. Die Angaben des Herstellers Lee Filters sind zusätzlich im Anhang aufgeführt (vgl. Abb. 24).

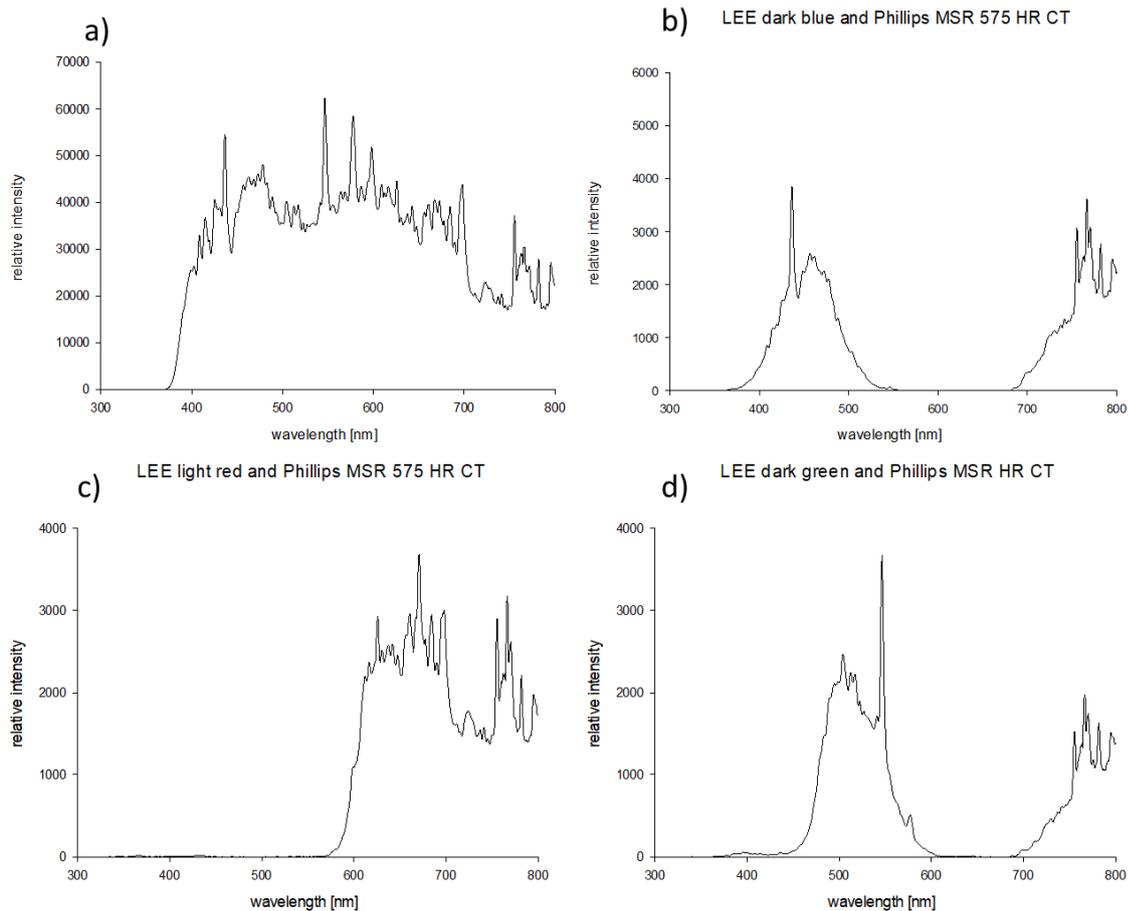


Abbildung 7: Spektren der Philips MSR 575 HRCT Metall Halogen Lampen. Aufgetragen ist die relative Intensität gegen die Wellenlänge. a) Spektrum hinter Acrylglas b) Spektrum hinter Acrylglas und blauer Folie (Lee dark blue) c) Spektrum hinter Acrylglas und roter Folie (Lee light red) d) Spektrum hinter Acrylglas und grüner Folie (Lee dark green)

Es wurden Versuche bei hoher ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mittlerer ($480 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und niedriger Photonenflussdichte ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mit einer konstanten Temperatur von $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Bei mittlerer Photonenflussdichte wurden außerdem Temperaturen von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und $35 \text{ }^\circ\text{C}$ getestet. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Parameter für die fünf Versuche.

Material und Methoden

Tabelle 1: Übersicht über die durchgeführten Versuche und die jeweilige Lichtintensität und Temperatur.

| Geringe Intensität $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | Mittlere Intensität $480 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | Hohe Intensität $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ |
|--|---|---|
| Versuch 1: 30 °C | Versuch 2: 30 °C Versuch 3: 20 °C Versuch 4: 35 °C | Versuch 5: 30 °C |

Für die Fettsäureanalyse wurden Proben von der Vorkultur und nach 1, 3, 48 und 72 h aus den Teströhrchen entnommen. Die Proben wurden zur Lagerung bei -20 °C tiefgefroren. Zudem wurde täglich der pH-Wert in den Teströhrchen gemessen und mit HCL auf einen Wert im Bereich von 6,5 - 7,5 eingestellt. Um das Wachstum der Algen zu messen, wurde jeden Tag die optische Dichte (OD) der Kulturen in jedem Röhrchen mithilfe eines Photometers (Pharmacia LKB Ultropsec III; Gemini) bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Zudem wurde eine Korrelation von OD zur Trockensubstanz (TS) erstellt, damit die gemessenen Werte für die OD in die entsprechende TS umgerechnet werden konnten. Dazu wurde eine lineare Verdünnungsreihe erstellt und definierte Mengen der Biomasse mit bekannter OD wurden auf einen Nylonfilter (Celluloseacetat Filtermembran mit einer Porengröße von 0,45 μm) gegeben. Die Filter wurden vor und nach der Zugabe der Biomasse im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet und ausgewogen, sodass die Massendifferenz die TS ergab. Es wurden jeweils Triplikate erstellt und mit der folgenden Formel die Korrelation berechnet:

$$OD - TS = \frac{\text{Mittelwert OD}}{\frac{\text{Mittelwert TS}}{\text{eingesetztes Volumen}}}$$

3.2 Fettsäurenextraktion und Analyse mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Für die Analyse der Fettsäuregehalte in den Mikroalgen wurden die Lipide zunächst aus den Zellen extrahiert und anschließend durch Umesterung in die Methyl ester der Fettsäuren überführt. Die Identifikation und Quantifizierung der FAs wurde mittels Gaschromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer (GC-MS) durchgeführt.

Eine abgewandelte Folch Extraktion nach Reich et al. (2012) wurde genutzt, um die Fettsäuren zu extrahieren. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden von jeder Probe 2,5 mg Biomasse eingesetzt. Das Medium der Proben wurde abzentrifugiert und das Pellet anschließend in 4 ml einer Chloroform-Methanol Lösung (Verhältnis 1:2) resuspendiert. Zudem wurden jeder Probe 20 μl eines internen Standards hinzugefügt. Der Standard enthielt 1 mg ml^{-1} Heptadecansäure, welches in Hexan

Material und Methoden

gelöst wurde. Nach erneuter Zentrifugation (3200 rpm, 5 s) wurde der Überstand in ein Glaszentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Extraktion zwei Mal wiederholt und die Extrakte jeder Probe in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt. Im zweiten Extraktionsschritt wurden die Proben für eine Stunde und im dritten Extraktionsschritt Übernacht auf einem Schüttler (KS 501 Digital, Thermo Fisher) inkubiert. Neben den FAs wurden auch die Pigmente aus den Zellen gelöst, sodass die Pellets nach der Extraktion entfärbt waren. Die vereinigten Extrakte wurden unter Zufuhr von Stickstoff bis zur Trockene eingeengt (vgl. Abb. 8a). Die verbleibenden Pellets wurden in 2 ml Methanol und 200 µl Chloroform resuspendiert.

Im nächsten Schritt folgte die Umesterung der Proben. Dazu wurden 100 µl einer 32 % Salzsäure (HCL) hinzugegeben und die Proben in Rollrandgefäße aus Glas überführt. Die Salzsäure katalysiert die Entstehung von Fettsäuremethylestern. Nach der Überschichtung der Proben mit Stickstoff wurden die Gefäße verschlossen und in einen Thermo Schüttler (Q101, BÜCHI Syncore) gestellt (vgl. Abb. 8b). Dort erfolgte bei 100 °C für 1 Stunde die Umesterung. Anschließend wurden zu jeder Probe 2 ml Millipore Wasser und 2 ml Hexan hinzugefügt. Nach dem Vortexen haben sich deutlich erkennbar zwei Phasen gebildet (vgl. Abb. 8c). Das Hexan befand sich aufgrund der geringeren Dichte mit den darin gelösten Fettsäuremethylestern in der oberen Phase und das Wasser in der unteren. Die obere Phase wurde in GC Vials aus dunklem Glas überführt und verdünnt (1: 10). Dadurch wurde eine Konzentration an Fettsäuremethylestern in den Proben erreicht, die im Detektionsbereich des Massenspektrometers lag.

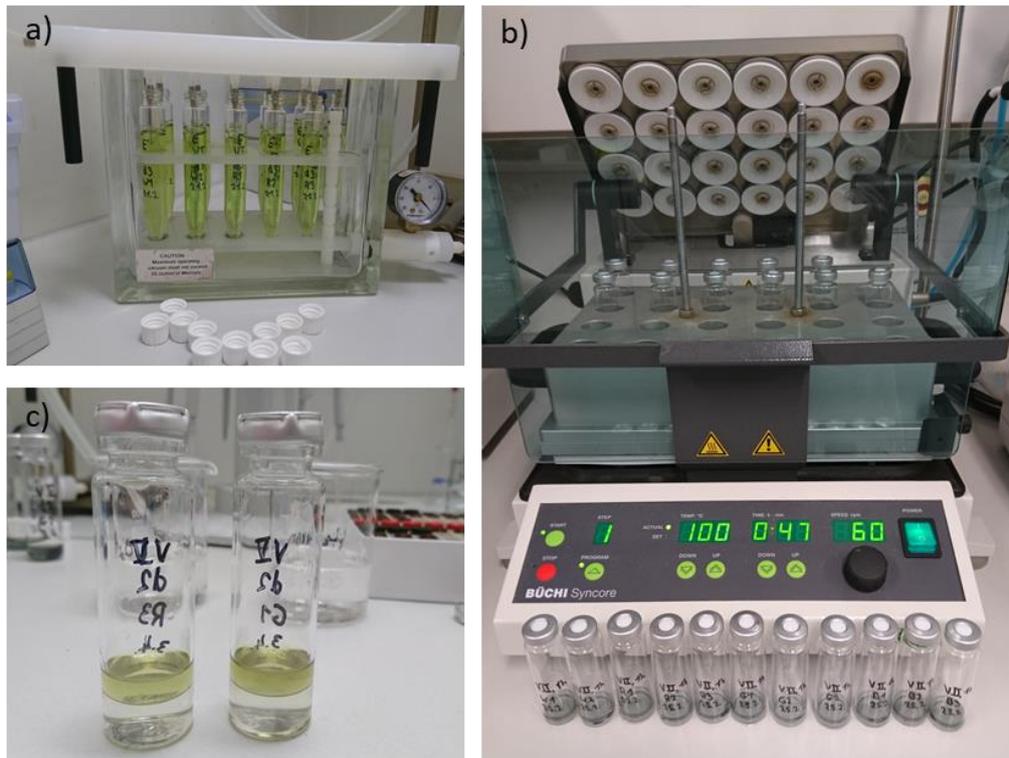


Abbildung 8: a) Einengung der Extrakte unter Stickstoff. Über Metallspitzen im Deckel wird der Stickstoff in die Glaszentrifugenröhrchen in der Kammer geleitet. b) Umesterung der extrahierten Fettsäuren im Thermo Schüttler (Q101, BÜCHI Syncore). c) Phasenbildung in den Rollrandgefäßen nach der Umesterung der Fettsäuren und der Zugabe von Millipore Wasser und Hexan. In der oberen Phase befinden sich Hexan und darin gelöste Fettsäuremethylester.

Die GC-MS wurde zur Analyse der Fettsäuremethylester mit einer 30 m langen FAME GC-MS Kapillarsäule von ThermoFischer betrieben. Der Innendurchmesser betrug 0,25 mm und die Filmdicke 0,25 µm. Vor der Injektion jeder Probe wurde der Säulenofen auf 60 °C geheizt und die Injektionsnadel mit Hexan gespült. Durch einen Autosampler wurde 1 µl einer Probe injiziert und ein Temperaturprogramm gestartet. Die Dauer des Temperaturprogramms betrug 40 min mit einer Endtemperatur von 260 °C (vgl. Abb. 9). Die verschiedenen Fettsäuremethylester sind je nach Siedetemperatur nacheinander von der Säule eluiert und wurden in das Massenspektrometer weitergeleitet. Dieses hat die einzelnen Ester detektiert und die Daten an einen Computer weitergegeben. Die Identifizierung der Fettsäuren erfolgte über den Vergleich mit einer Datenbank. Außerdem wurden die Peakflächen integriert und mit der Peakfläche des internen Standards verglichen, um zu berechnen zu welchem Anteil eine Fettsäure in den Mikroalgen vorlag.

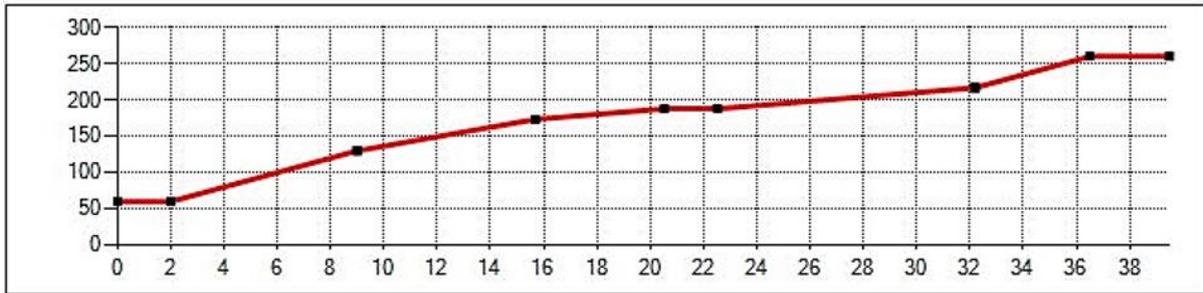


Abbildung 9: Temperaturverlauf im Säulenofen für die Trennung von Fettsäuremethylestern mittels Gaschromatographie.

3.3 Datenauswertung

Um zu untersuchen, ob sich die Fettsäureanteile zwischen den verschiedenen Temperaturen, Lichtintensitäten und Lichtspektren signifikant unterscheiden, wurde eine statistische Auswertung mit der Software R durchgeführt (Version 3.6.0). Zur Überprüfung der Normalverteilung der abhängigen Variablen (prozentualer Anteil der Fettsäuren) wurden Histogramme und Q-Q Plots erstellt. Lag eine Normalverteilung vor, wurde ein *Lineares Model (lm)* mit anschließender Anova verwendet, um den Einfluss der Farbe, der Temperatur und der Lichtintensität auf den Anteil der Fettsäure zu bestimmen. Für die abhängigen Variablen, bei denen keine Normalverteilung vorlag, wurde der Kruskal-Wallis Test genutzt. Bei diesem Test handelt es sich um die nicht-parametrische Alternative zur Anova, für den die Normalverteilung keine Voraussetzung ist (Ostertagová et al. 2014). Für paarweise Vergleiche wurden Post-hoc Tests (Pairwise t.test oder Pairwise.wilcoxon test) durchgeführt. Zudem wurden als Prüfgrößen der Chi-square Wert bei einem Kruskal-Wallis Test und der F-Wert bei einer Anova bestimmt. Die Signifikanzschwelle für die statistischen Analysen wurde auf $p = 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Fettsäuren

Es konnten mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) 15 verschiedene Fettsäuren in der Mikroalge *Acutodesmus obliquus* identifiziert werden. Analysiert wurden von allen fünf Versuchen die jeweilige Vorkultur und die Proben nach 1, 3, 48 und 72 h Kultivierungsdauer. Bei den Versuchen sollte untersucht werden, wie sich verschiedene Lichtintensitäten, Lichtspektren und Temperaturen auf die Fettsäurezusammensetzung in den Algen auswirken. Dazu wurden drei verschiedene Temperaturen (20, 30 und 35 °C), drei verschiedene Photonenflussdichten (120, 480 und 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und vier Lichtspektren (weiß, rot, grün und blau) getestet.

Die FAs, die in *A. obliquus* identifiziert werden konnten, entsprechen denen, die auch im Praxissemesterbericht aufgeführt wurden (vgl. Tab. 2) (Steinke 2019). Im Weiteren werden nur die FAs behandelt, die zu mehr als 1 % enthalten waren. Dazu zählen alle identifizierten FAs mit 16 und 18 Kohlenstoffatomen.

Tabelle 2: Übersicht der in *Acutodesmus obliquus* identifizierten Fettsäuren. Angegeben sind jeweils Nomenklatur und Trivialname.

| Fettsäure | Trivialname | Fettsäure | Trivialname |
|-----------|----------------------|-----------|--------------------|
| 14:0 | Myristinsäure | 18:0 | Stearinsäure |
| 15:0 | Pentadecansäure | 18:1 | Ölsäure |
| 16:0 | Palmitinsäure | 18:2 | Linolsäure |
| 16:1 | Palmitoleinsäure | 18:3 | Alpha-Linolensäure |
| 16:2 | Hexadecadiensäure | 18:4 | Stearidonsäure |
| 16:3 | Hexadecatriensäure | 22:0 | Behensäure |
| 16:4 | Hexadecatetraensäure | 24:0 | Lignocerinsäure |
| 17:1 | Margaroleinsäure | | |

Ergebnisse

4.2 Vorkulturen

In der folgenden Abbildung sind die analysierten Fettsäureprofile aller Vorkulturen gezeigt (vgl. Abb. 10). Für jede Fettsäure ist angegeben zu welchem Anteil sie in den Algen enthalten war.

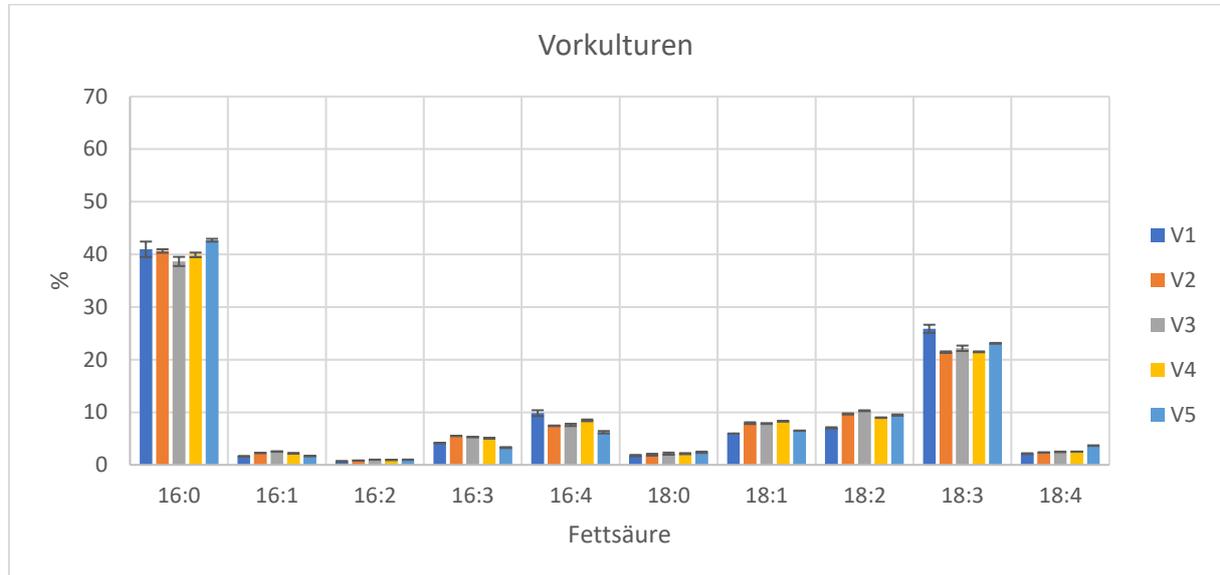


Abbildung 10: Prozentuale Anteile der verschiedenen Fettsäuren in den Vorkulturen der Versuche (V) 1, 2, 3, 4 und 5 mit *Acutodesmus obliquus*.

Es ist zu erkennen, dass alle Vorkulturen sehr ähnliche Fettsäureprofile aufweisen. Den größten Anteil weist in allen Kulturen mit ca. 40 % die FA 16:0 auf. Danach folgt die FA 18:3 mit einem Anteil zwischen 20 und 25 %. In geringeren Anteilen (5-10 %) kommen die FAs 16:4, 18:1 und 18:2 vor. Die Anteile der FAs 16:1, 16:2, 18:0 und 18:4 sind am geringsten (0,8-5 %).

4.3 Temperatureffekte

Die folgende Abbildung 2 zeigt die Entwicklung der Fettsäurezusammensetzung in Versuch 2 (30 °C) über die Zeit. Dargestellt sind beispielhaft die Daten für die Algen, denen das gesamte Lichtspektrum zur Verfügung stand (weiß) (vgl. Abb. 11). Diese Ergebnisse sind repräsentativ für den Verlauf der Fettsäureanteile bei Bestrahlung mit grünem und blauem Licht (vgl. Anhang Abb. 29 und 30). Die Anteile der FAs 16:0, 16:1, 18:0 und 18:1 steigen mit der Zeit an. Bei der FA 16:0 ist nach 1 h ein Anstieg von 40,7 % auf 58,1 % und bei der FA 18:0 nach 3 h ein Anstieg von 1,9 % auf 5,6 % zu beobachten. Danach sinken die Anteile beider FAs bis 72 h auf 47,6 % (16:0) und 1,9 % (18:0). Die Anteile der FAs 16:1 und 18:1 steigen im Vergleich zur Vorkultur nach 72 h um 4,8 % und 11,9 %. Für die PUFAs ist eine Abnahme der Anteile zu beobachten. Beginnend bei 0,8 % und 9,7 % in der Vorkultur sinken die Anteile der FAs 16:2 und 18:2 nach 72 h auf 0,8 % und 8,2 %. Bei den FAs 16:3, 16:4, 18:3 und 18:4 sinken die Anteile zunächst um ca. 50-60 % und steigen danach wieder an. Nach 72 h liegen die Anteile um 4,5 %

Ergebnisse

(16:3), 30 % (16:4), 18,6 % (18:3) und 4,5 % (18:4) unter dem jeweiligen Wert der Vorkultur. Die Bestrahlung mit rotem Licht hat nach 72 h größere Anteile der FAs 16:0 und 18:1 ergeben, während die Anteile der FAs 16:4 und 18:3 geringer waren als bei den anderen Lichtspektren (vgl. Abb. 12).

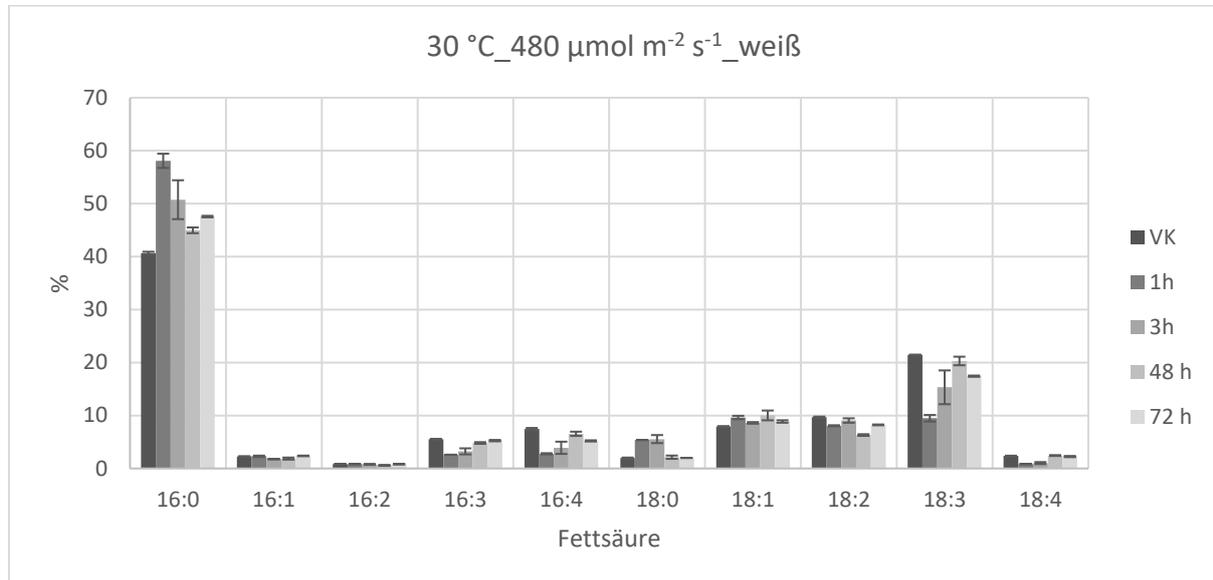


Abbildung 11: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit weißem Licht in Versuch 2 (30 °C, 480 μmol m⁻² s⁻¹). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

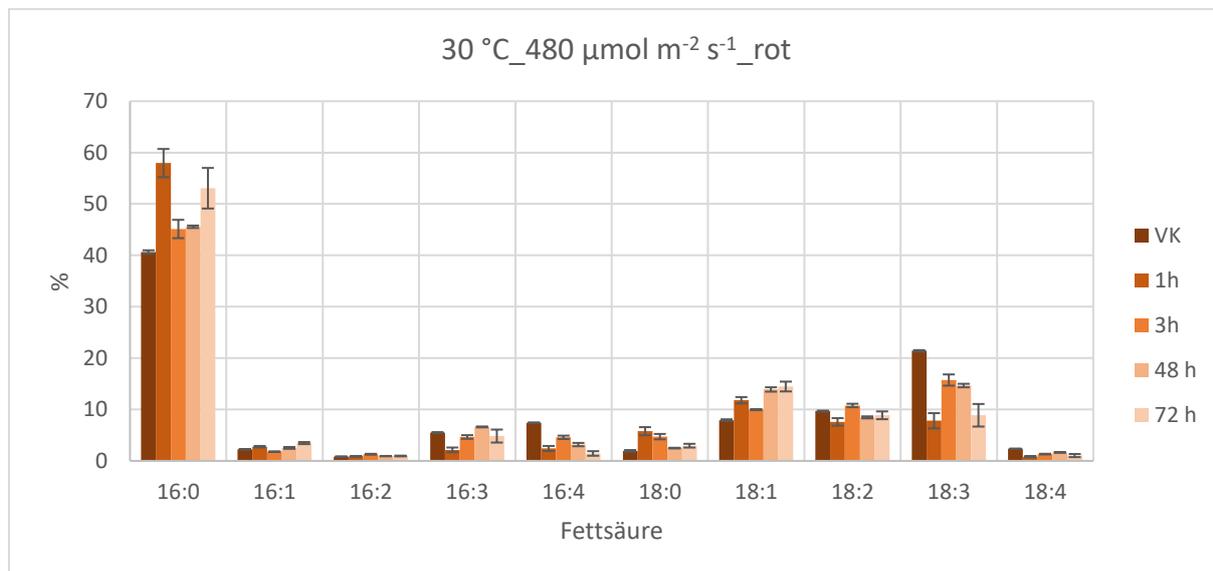


Abbildung 12: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit rotem Licht in Versuch 2 (30 °C, 480 μmol m⁻² s⁻¹). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

Für Versuch 4 sind die Ergebnisse der Bestrahlung mit grünem Licht dargestellt (vgl. Abb. 13), sie repräsentieren die Ergebnisse bei weißem und blauem Licht (vgl. Anhang Abb. 35 und 37). Ähnlich wie bei V2 steigen die Anteile der SFAs und MUFAs mit der Zeit an. Für die FAs 16:0 und 18:0 ist in den ersten 3 h ein Anstieg der Anteile (16:0 von ca. 40 auf 50,5 %, 18:0 von 2,1 auf 5 %) und danach eine Verringerung zu beobachten. Am stärksten ist der Anteil der FA 16:0 bei weißem Licht angestiegen, auf bis zu ca. 58 % (vgl. Anhang Abb. 35). Die Anteile der FAs 16:1 und 18:1 sinken dagegen zunächst um

Ergebnisse

ca. 12 % und 23 % und steigen danach bis 72 h über den jeweiligen Wert der Vorkultur an (16:1 um ca. 40 %, 18:1 um ca. 51 %). Anders als in V2 steigt in V4 der Anteil der FA 16:2 an (von 0,9 % auf 1,3 %). Der Anteil der FA 18:2 sinkt deutlich weniger als in V2 (um 0,2 %). Die FAs 16:3, 16:4, 18:3 und 18:4 sinken bis zum Zeitpunkt 72 h im Vergleich zur Vorkultur um 2,1 %, 60,7 %, 24,7 % und 61,3 %. Wie in V2 sind auch in V4 bei rotem Licht nach 72 h höhere Anteile der FAs 16:0 und 18:1 und geringere Anteile der FAs 16:4 und 18:3 zu beobachten (vgl. Anhang Abb. 36).

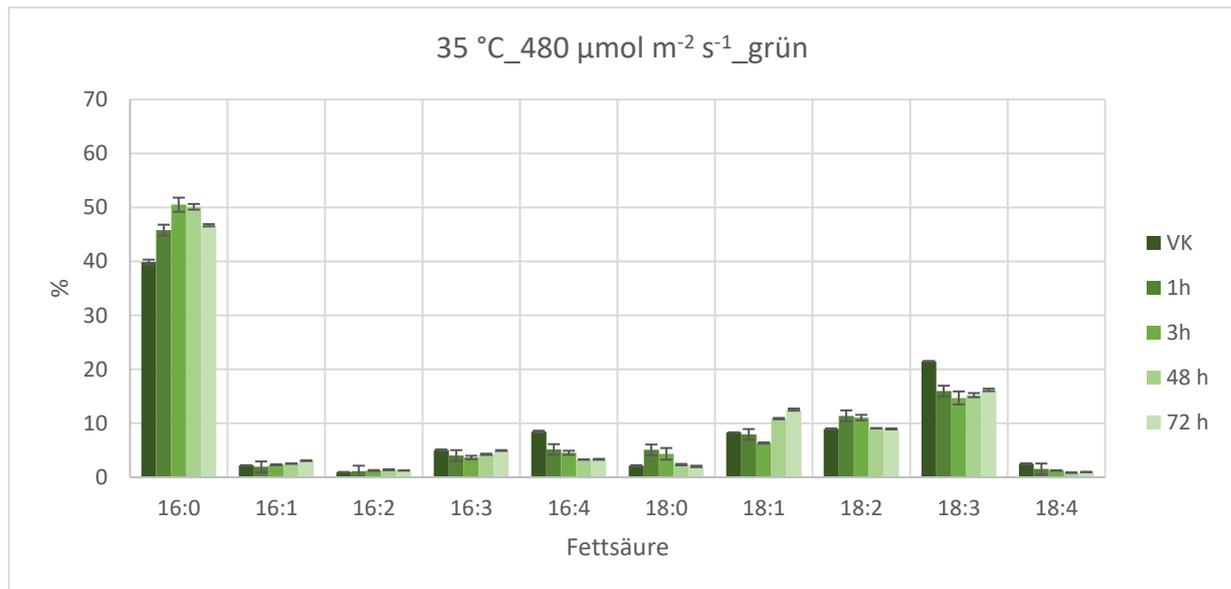


Abbildung 13: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit grünem Licht in Versuch 4 (35 °C, 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

Von Versuch 3 sind beispielhaft die Ergebnisse der Bestrahlung mit grünem Licht dargestellt (vgl. Abb. 14). Die Bestrahlung mit weißem, rotem und blauem Licht hat ähnliche Verläufe der Fettsäureanteile ergeben. Die entsprechenden Abbildungen sind im Anhang zu finden (vgl. Abb. 31-33). Wie auch in den Versuchen 2 und 4 steigen die Anteile der FAs 16:0 und 18:0 innerhalb der ersten Stunde an (um jeweils 51 %). Bis zum Zeitpunkt 48 h sinken die Anteile der beiden FAs jedoch unter die Werte der Vorkultur. Es ist auffällig, dass die Anteile bei 72 h um 35 bis 45 % höher sind als bei 48 h. Im Gegensatz zu V2 und V4 sinken hier die Anteile der FAs 16:1 und 18:1 bis 48 h um ca. 43 und 49 %. Von 48 bis 72 h steigen die Anteile jedoch um 35 % (16:1) und 27 % (18:1) an. Für die FAs 16:2 und 18:2 ist eine Verringerung der Anteile bis zum Zeitpunkt 72 h zu beobachten (um ca. 82 und 78 %). Während der Anteil der FA 16:3 von 5,3 % auf 2,0 % (bei 72 h) sinkt, steigt der Anteil der FA 18:3 von 22,2 % bis 48 h auf 34,5 % an sinkt bis 72 h auf 21,7 %. Die Anteile der PUFAs 16:4 und 18:4 sinken in der ersten Stunde und steigen dann bis 48 h um 51,5 % und 3,1 % über den jeweiligen Wert der Vorkultur. In der Zeit von 48 bis 72 h tritt jedoch eine Senkung der Anteile um 35,3 % (16:4) und 43,6 % (18:4) auf.

Ergebnisse

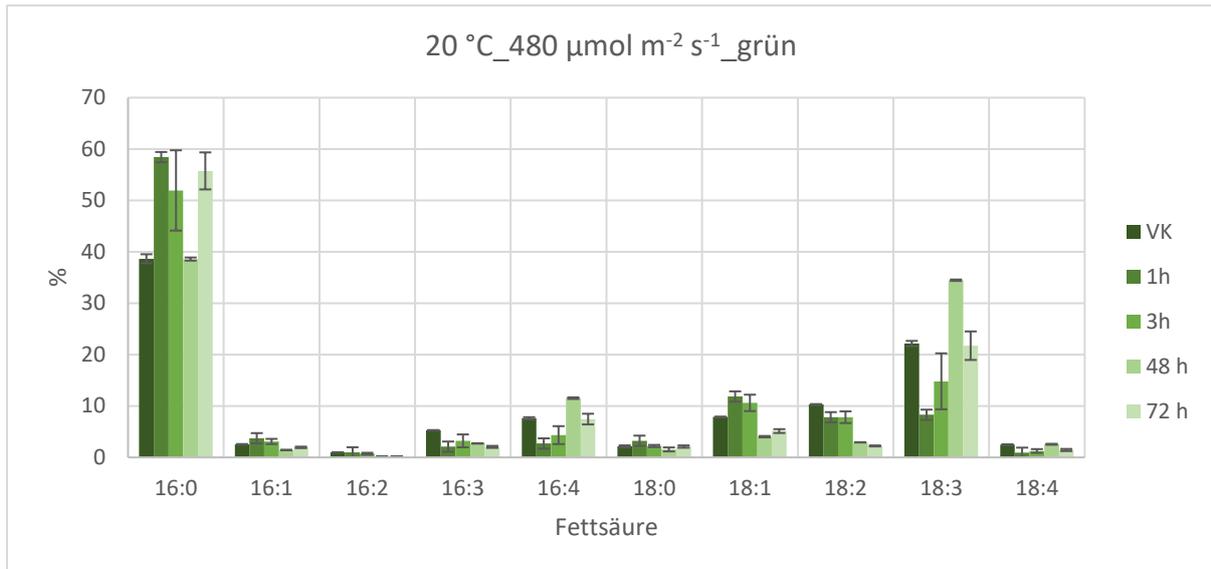


Abbildung 14: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit grünem Licht in Versuch 3 (20 °C, 480 μmol m⁻² s⁻¹). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

Bereits nach 1 h sind für alle FAs in V2 Änderungen im Prozentanteil von durchschnittlich 50 % zu erkennen. Bezogen auf die Vorkultur sind die Differenzen nach 1 h damit am größten. Danach nähern sich die Anteile der FAs bis zu dem Zeitpunkt 48 h wieder dem Wert der Vorkultur an (vgl. Abb. 11). Zwischen den Proben nach 48 h und 72 h sind für die meisten FAs nur noch geringe Unterschiede von durchschnittlich 17 % zu erkennen. Auch bei Versuch 4 sind keine starken Differenzen zwischen der 48 h und 72 h Probe zu erkennen (vgl. Abb. 13).

Für Versuch 3 ergeben sich jedoch zwischen 48 und 72 h sehr deutliche Unterschiede (vgl. Abb. 14). Die FA 16:0 weicht beispielsweise zum Zeitpunkt 72 h in Versuch 2 um 6 % nach oben und in V4 um 7 % nach unten von dem Wert bei 48 h ab, während der Anteil in V3 um 35 % ansteigt. Der Anteil der FA 18:3 sinkt in V2 von 48 h bis 72 h um 14 % und steigt in V4 um 6 %. In V3 ist eine Verringerung des Anteils um 37 % zu beobachten. Damit unterscheiden sich die Daten bei 72 h ungewöhnlich stark von den Daten für 48 h und stehen außerdem im Kontrast zu den Verhältnissen in V2 und V4. Aus diesem Grund wird der Datensatz für 72 h aus Versuch 3 zunächst nicht in die Auswertung der Temperatureffekte einbezogen.

Für die Untersuchung der Temperatureffekte wurden die Versuche 3 (20 °C), 2 (30 °C) und 4 (35 °C) verglichen. Diese wurden alle bei mittlerer Photonendichte (480 μmol m⁻² s⁻¹) durchgeführt. Um bewerten zu können inwiefern sich die Fettsäurezusammensetzung und damit auch der Sättigungsgrad der FAs verändert, wurden die untersuchten FAs in drei Gruppen eingeteilt. Zu den gesättigten FAs (SFAs) gehören die FAs 16:0 und 18:0. Die FAs 16:1 und 18:1 zählen zu den einfach ungesättigten FAs (MUFAs). Die restlichen FAs (16:2, 16:3, 16:4, 18:2, 18:3, 18:4) bilden die Gruppe der mehrfach ungesättigten FAs (PUFAs). Für den Vergleich wurde der Zeitpunkt 48 h nach Versuchsstart gewählt, da sich nach 48 h in V2 und V4 keine starken Änderungen mehr ergeben haben. Außerdem werden so

Ergebnisse

die stark abweichenden Werte nach 72 h von Versuch 3 nicht in die Auswertung einbezogen. Abbildung 15 stellt die Anteile an SFAs, MUFAs und PUFAs in den Versuchen 2, 3 und 4 aufgeteilt nach Spektralfarben dar. Für jeden Versuch und jedes Lichtspektrum (weiß, rot, grün, blau) wurden die Anteile der zur gleichen Gruppe gehörenden FAs addiert.

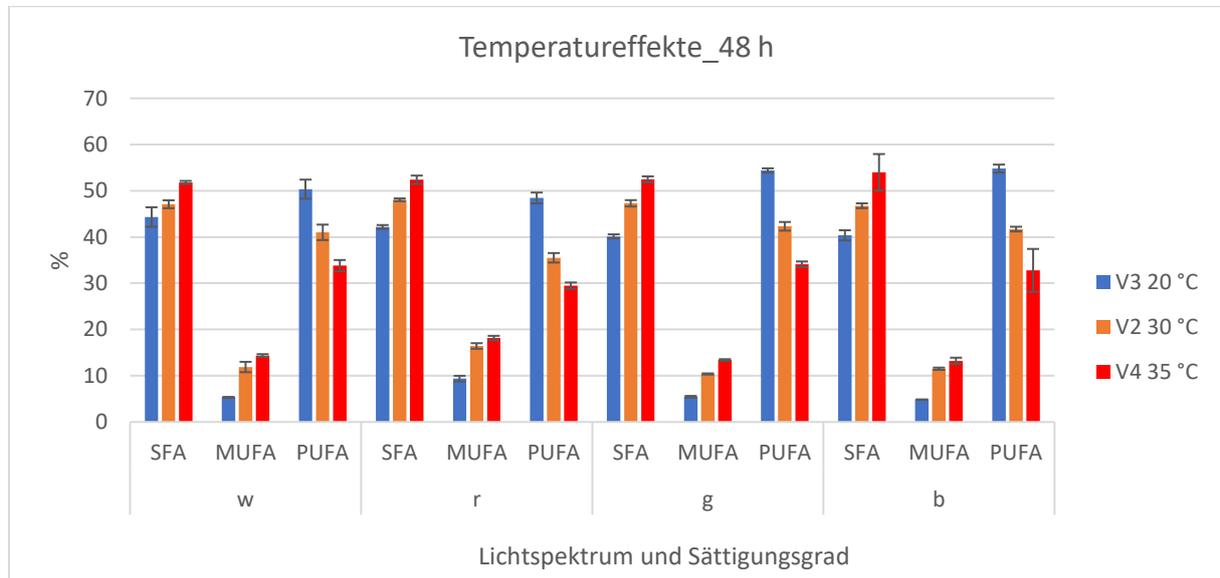


Abbildung 15: Vergleich der prozentualen Anteile an gesättigten Fettsäuren (SFAs), einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFAs) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) in *Acutodesmus obliquus* für die Versuche (V) 2 (30 °C), 3 (20 °C) und 4 (35 °C) 48 h nach Versuchsstart, aufgeteilt nach Spektralfarben (w: weiß, r: rot, g: grün, b: blau).

Die vier Farbgruppen zeigen bezogen auf die Temperatur alle einen ähnlichen Verlauf der Fettsäureanteile. Mit steigender Temperatur steigt der Anteil an SFAs und MUFAs. Gleichzeitig nimmt der Anteil an PUFAs mit steigender Temperatur ab. Die Proben aus Versuch 3 (20 °C) weisen den geringsten Anteil an SFAs (40-44 %) und MUFAs (5-9 %) und den größten Anteil an PUFAs (48-55 %) auf. In Versuch 4 sind dagegen die Anteile an SFAs (52-54 %) und MUFAs (13-18 %) am größten und der PUFA Gehalt (29-34 %) am niedrigsten. Diese Temperatureffekte können auch im zeitlichen Verlauf der einzelnen Versuche beobachtet werden. Bei Versuch 3 (20 °C) sinken die Anteile der hoch ungesättigten FAs 16:4 und 18:3 zunächst, steigen dann aber bis 48 h wieder an und erreichen größere Anteile als in der Vorkultur (vgl. Abb. 14). In den Versuchen 2 (30 °C) und 4 (35 °C) sinken die Anteile der hoch ungesättigten FAs (16:4, 18:3) bis zum Zeitpunkt 48 h unter den Wert der Vorkultur, während die SFA 16:0 bei beiden Versuchen nach 48 h über dem Wert der Vorkultur liegt (vgl. Abb. 11 und 13). Die statistische Auswertung hat ergeben, dass die Temperatur die Fettsäureanteile in *A. obliquus* beeinflusst. Dabei unterscheiden sich zwischen 20 °C und 30 °C ausschließlich die Anteile von zwei FAs (16:1 und 16:3) signifikant. Zwischen 20 °C und 35 °C sind dagegen die Unterschiede in den Anteilen aller FAs, außer 16:0 und 16:1, signifikant. Der Vergleich der Temperaturen 30 °C und 35 °C zeigt nur bei den FAs 16:3 und 18:0 keinen signifikanten Unterschied der Anteile. Die zugehörigen p-Werte und Prüfgrößen sind in Tabelle 3 im Anhang angegeben.

Ergebnisse

4.4 Intensitätseffekte

Wie auch bei der Untersuchung der Temperatureffekte wurde der zweite Tag (48 h) nach Versuchsstart gewählt, um die Änderungen in der Fettsäurezusammensetzung darzustellen. Verglichen wurden die Versuche 1 ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 2 ($480 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 5 ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), die alle bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt wurden (vgl. Abb. 16).

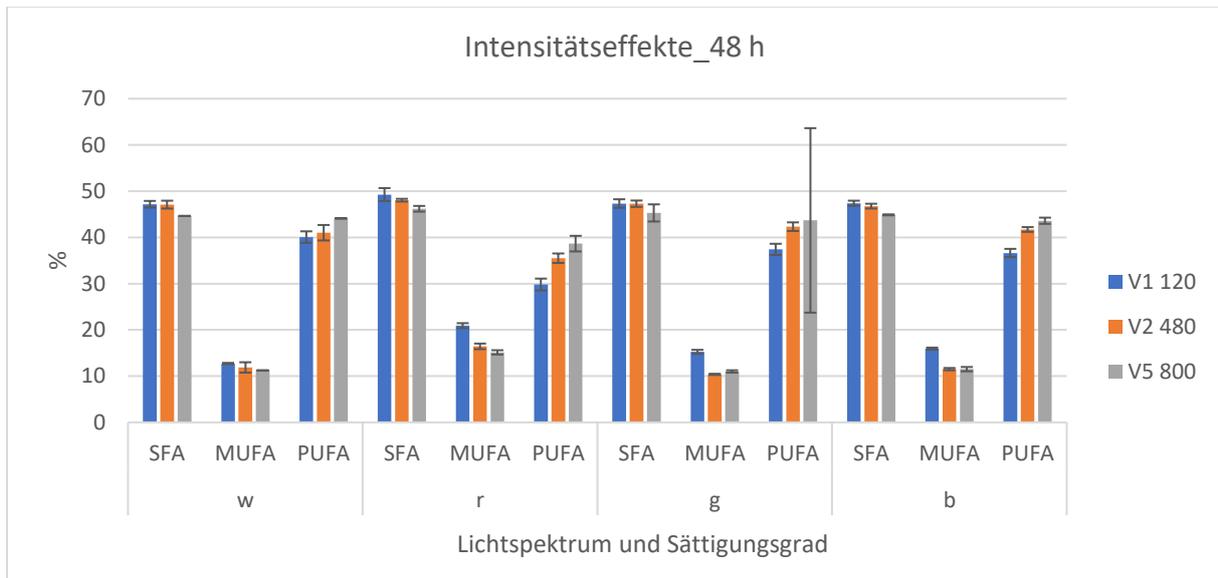


Abbildung 16: Vergleich der prozentualen Anteile an gesättigten Fettsäuren (SFAs), einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFAs) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) in *Acutodesmus obliquus* für die Versuche (V) 1 ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 2 ($480 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 5 ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 48 h nach Versuchsstart, aufgeteilt nach Spektralfarben (w: weiß, r: rot, g: grün, b: blau).

Mit steigender Lichtintensität zeigt sich für alle Farbgruppen ein Anstieg des Anteils an PUFAs. Die Anteile an SFAs und MUFAs sinken dagegen mit steigender Lichtintensität. Bei einer Photonenflussdichte von $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (V5) lagen die höchsten Gehalte an PUFAs (38-44 %) vor. Bei $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ waren dagegen die höchsten Gehalte an SFAs (47-49 %) und MUFAs (13-21 %) zu beobachten. Die statistischen Tests haben gezeigt, dass die Lichtintensität einen signifikanten Einfluss auf alle FAs, außer die FA 16:3, hat. Im Anhang (Tabelle 4) sind die zugehörigen p-Werte und Prüfgrößen gegeben.

Ergebnisse

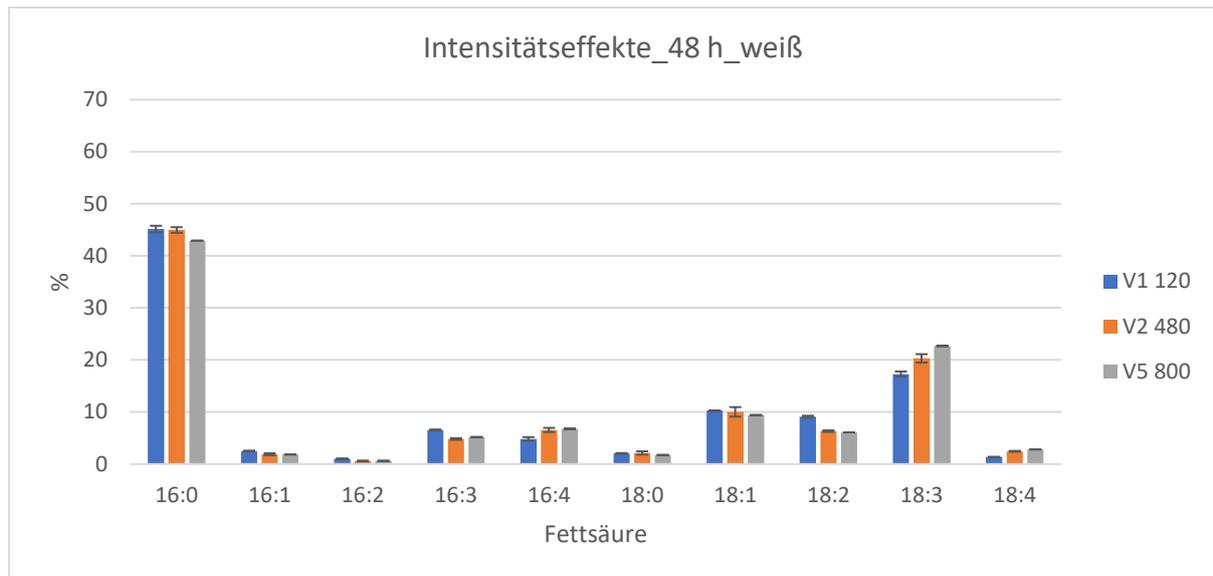


Abbildung 17: Vergleich der prozentualen Fettsäureanteile in *Acutodesmus obliquus* für die Versuche (V) 1 ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 2 ($480 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 5 ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 48 h nach Versuchsstart, bei Bestrahlung mit weißem Licht.

Bei der Betrachtung der Lichteffekte für jede einzelne FA, zeigt sich, dass nicht die Anteile aller PUFAs mit steigender Lichtintensität ansteigen (vgl. Abb. 17). Die Anteile der FAs 16:2 und 18:2 sinken bei V2 und V5 signifikant im Vergleich zu V1. Bei den FAs 16:4 und 18:4 steigt der Anteil durch eine Erhöhung der Photonenflussdichte von $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ signifikant an. Die Steigerung der Photonenflussdichte von $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf $480 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bewirkt bei der FA 18:3 eine signifikante Zunahme des Anteils. Alle p-Werte und Prüfgrößen sind im Anhang in Tabelle 4 zu finden.

Im zeitlichen Verlauf von V1 ist der Effekt einer geringen Photonenflussdichte ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) verglichen mit der Vorkultur ebenfalls zu beobachten (vgl. Abb. 18). Repräsentativ für alle vier Lichtspektren sind die Ergebnisse der Bestrahlung mit weißem Licht dargestellt. Der Anteil der hoch ungesättigten FA 16:4 sinkt innerhalb von 72 h um 76 % und die Anteile der FAs 18:3 und 18:4 um ca. 60 %. Bei den SFAs und MUFAs ist dagegen ein Anstieg der Anteile zu beobachten. Während die Anteile der SFAs 16:0 und 18:0 bis 72 h um ca. 30 - 40 % ansteigen, liegt bei den MUFAs (16:1 und 18:1) ein Anstieg von über 100 % vor. Auch die Anteile der FAs 16:2, 16:3 und 18:2 steigen mit der Zeit an (um 16,6 %, 7,5 % und 3,4 %), jedoch nicht so stark wie bei den SFAs und MUFAs. Die Ergebnisse für die Lichtspektren rot, grün und blau sind im Anhang zu finden (vgl. Anhang Abb. 25-27).

Ergebnisse

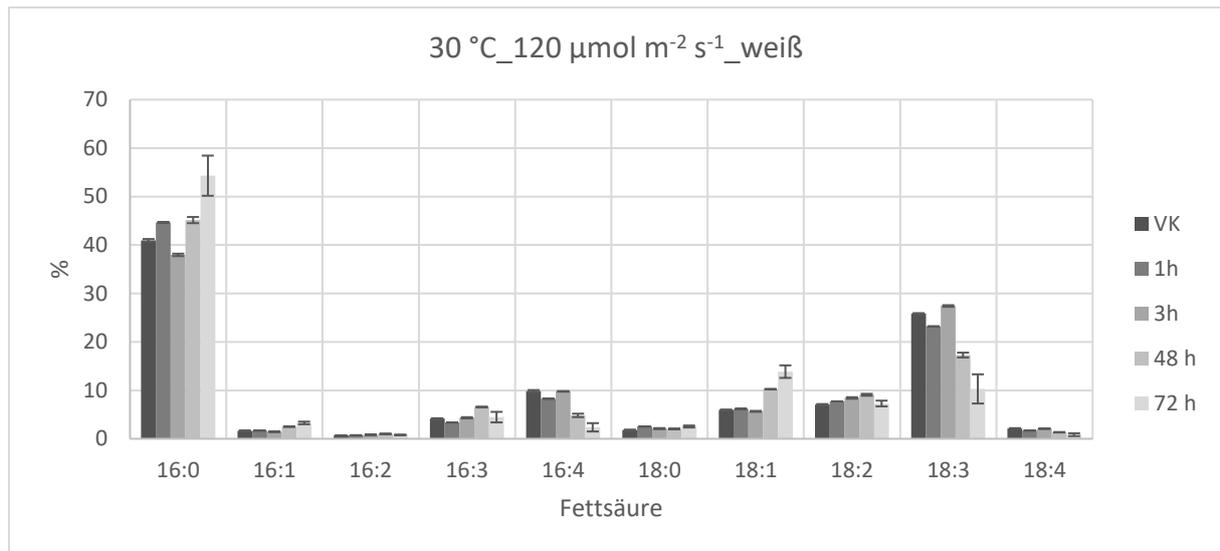


Abbildung 18: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit weißem Licht in Versuch 1 (30 °C, 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

Der zeitliche Verlauf von V5 zeigt die Effekte einer hohen Photonenflussdichte ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) beispielhaft für die Bestrahlung mit grünem Licht (vgl. Abb. 19). Die Bestrahlung der Algen mit weißem und blauem Licht hat sehr ähnliche Verläufe der Fettsäureanteile gezeigt (vgl. Anhang Abb. 39 und 40). Der Effekt der Lichtintensität auf die Fettsäurezusammensetzung ist hier weniger stark ausgeprägt als bei V1. Die Anteile der SFAs 16:0 und 18:0 steigen nach 1 h an (16:0 von 42,7 % auf 49,2 %, 18:0 von 2,4 % auf 6,3 %) und sinken danach, sodass die Werte bei 72 h für die FA 16:0 um 0,1 % über und für die FA 18:0 um 21,6 % unter dem Wert der Vorkultur liegen. Für die MUFAs (16:1 und 18:1) ist innerhalb von 72 h ein Anstieg der Anteile um ca. 46-48 % zu beobachten. Bei den PUFAs ist mit Ausnahme der FA 16:3 (steigt von 3,3 % auf 5,9 %) kein Anstieg der Anteile vorhanden. Im Vergleich mit der Vorkultur sinken die Anteile der FAs 16:2 und 18:2 um 16,5 % und 22,5 %, während bei den FAs 16:4 und 18:4 eine Abnahme der Anteile um 3,2 % und 33,2 % zu beobachten ist. Der Anteil der FA 18:3 sinkt nach 1 h um ca. 30 %, steigt danach an und liegt nach 72 h ca. 10 % unter dem Wert der Vorkultur. Im Vergleich zu den anderen Lichtspektren sind bei der Bestrahlung mit rotem Licht höhere Anteile der FAs 18:1 und 18:2 (um ca. 45 %) und geringere Anteile der FAs 16:4, 18:3 und 18:4 (um ca. 64 %, 33 % und 30 %) in den Algen enthalten (vgl. Abb. 20).

Ergebnisse

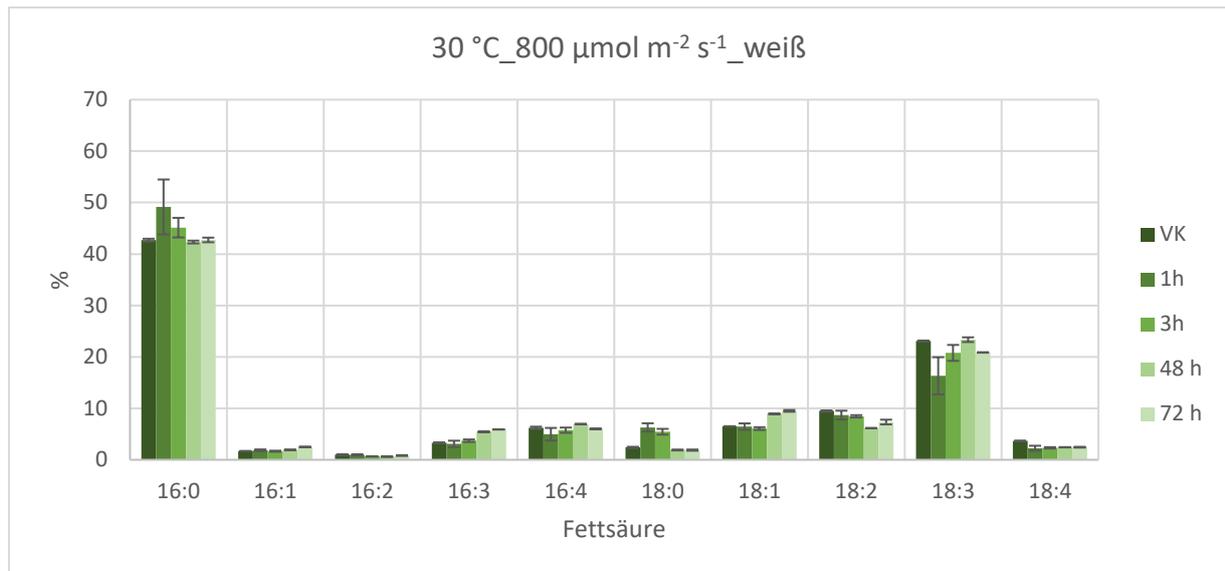


Abbildung 19: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit grünem Licht in Versuch 5 (30 °C, 800 μmol m⁻² s⁻¹). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

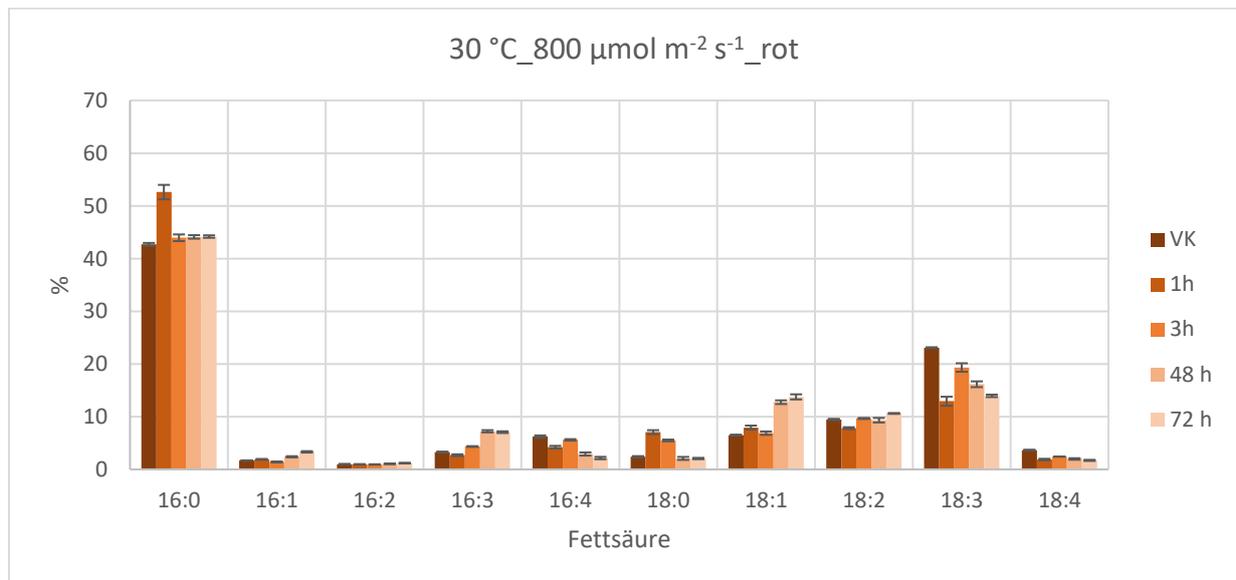


Abbildung 20: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit rotem Licht in Versuch 5 (30 °C, 800 μmol m⁻² s⁻¹). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

4.5 Farbeffekte

Der Vergleich der verschiedenen Farbgruppen innerhalb eines Versuches zeigt, dass die Fettsäurezusammensetzung in der Rotlichtgruppe von denen der anderen Farbgruppen abweichen. Eine Stunde nach Versuchsstart ist der Effekt bereits zu erkennen. Bei der FA 18:1 liegt für Rotlicht ein deutlich höherer Anteil als bei den anderen Farbgruppen vor (vgl. Abb. 21). Mit zunehmender Kultivierungsdauer verstärkt sich der Effekt. An Tag 3 (72 h) von Versuch 2 ist zu erkennen, dass die Rotlichtgruppe höhere Anteile an gesättigten, einfach und zweifach ungesättigten FAs besitzt. Die Anteile an mehrfach ungesättigten FAs sind dagegen geringer als bei den anderen Farbgruppen

Ergebnisse

(vgl. Abb. 22). Auch in den anderen Versuchen lässt sich dieser Rotlichteffekt nach 72 h erkennen, wobei er in V1 am geringsten ausgeprägt ist (vgl. Anhang Abb. 28). Die Versuche 3, 4 und 5 zeigen jedoch bei der FA 16:0 keinen Effekt (vgl. Anhang Abb. 34, 38 und 41). Das Lichtspektrum hat einen signifikanten Einfluss auf die FAs 16:2, 16:3, 16:4 und die FAs 18:1, 18:2 und 18:3. Die Signifikanzen treten dabei nur im Vergleich von Rotlicht mit den anderen drei Lichtspektren auf. Bei rotem Licht steigen die Anteile der FAs 16:2, 16:3, 18:1 und 18:2 signifikant an, während bei den FAs 16:4 und 18:3 eine signifikante Abnahme zu beobachten ist. Die Lichtspektren weiß, grün und blau zeigen untereinander keine signifikanten Unterschiede in den Fettsäureanteilen. Die jeweiligen p-Werte und Prüfgrößen sind im Anhang (Tabelle 5) aufgeführt.

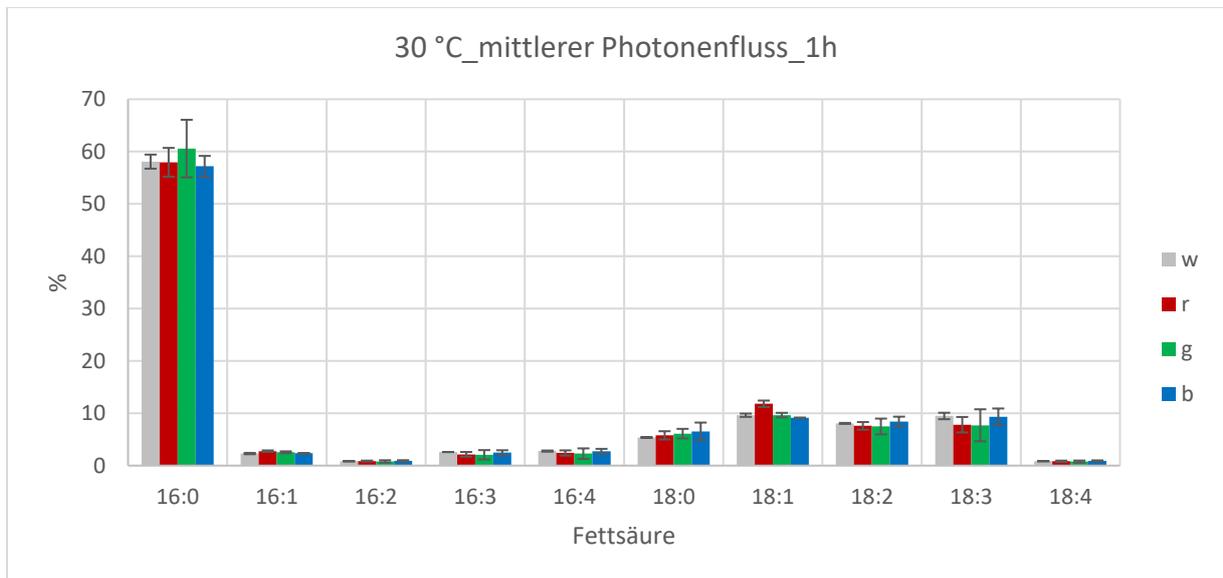


Abbildung 21: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* für Versuch 2 (30 °C, 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nach 1 h für die verschiedenen Spektralbereiche (w: weiß, r: rot, g: grün, b: blau).

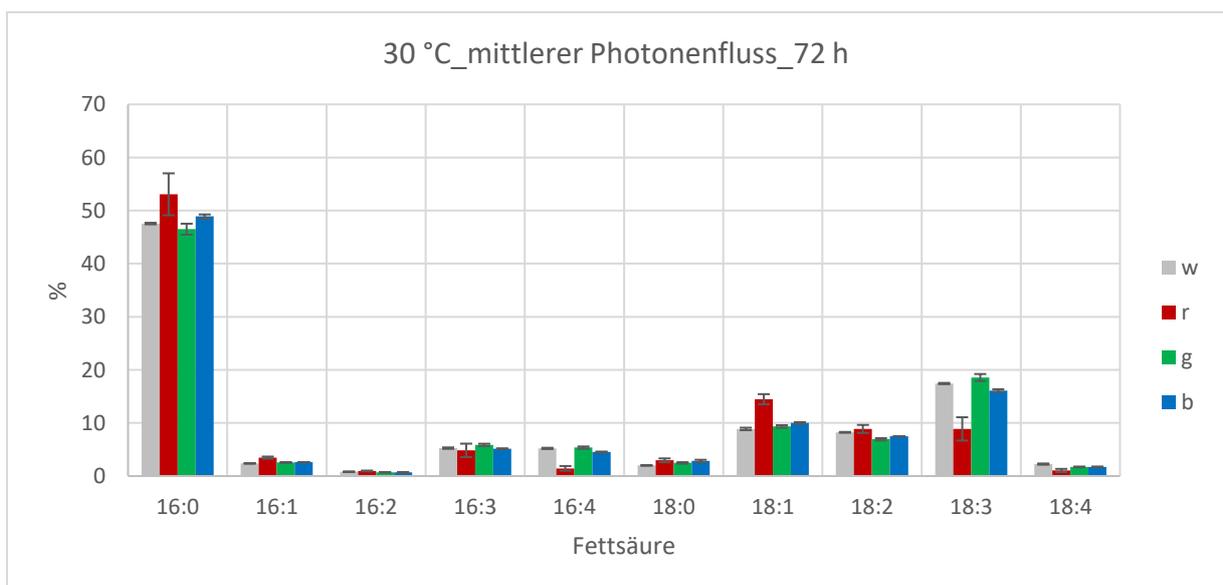


Abbildung 22: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* für Versuch 2 (30 °C, 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nach 72 h für die verschiedenen Spektralbereiche (w: weiß, r: rot, g: grün, b: blau).

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Temperatur, Lichtintensität und Lichtspektrum auf das Wachstum und die Fettsäurezusammensetzung in der Mikroalge *Acutodesmus obliquus* untersucht. Der Projekthintergrund war die Planung eines Hybridsystems, das eine Kombination aus Photobioreaktor und Photovoltaik bildet. Für die effiziente Nutzung eines solchen Systems ist es entscheidend zu wissen unter welchen Kultivierungsbedingungen *A. obliquus* ein starkes Wachstum und eine möglichst hohe Ausbeute an industriell nutzbaren Fettsäuren zeigt. Im Praxissemester wurde der Einfluss von Temperatur, Lichtintensität und Lichtspektrum auf das Wachstum der Mikroalge in fünf Kultivierungsversuchen untersucht. In dieser Bachelorarbeit wurden die Fettsäuren in den Algen aus den vorhergehenden Versuchen analysiert. Durch den Vergleich der Versuche bei gleicher Lichtintensität, aber verschiedenen Temperaturen konnten die Effekte der Temperatur auf die Fettsäurezusammensetzung untersucht werden. Genauso wurden die Versuche mit gleicher Temperatur und verschiedenen Lichtintensitäten verglichen, um den Einfluss der Photonenflussdichte zu zeigen. Aus anderen Studien mit Mikroalgen ist bereits bekannt, dass eine Erhöhung der Temperatur zu einem geringeren Gehalt an PUFAs und einem höheren Gehalt an SFAs und MUFAs in den Zellen führt (Patterson 1969). Eine Erhöhung der Lichtintensität hat in den meisten Studien zu einem Anstieg des Anteils an SFAs und MUFAs geführt, während der Anteil an PUFAs abgenommen hat (Fábregas et al. 2004). Bezüglich der Kultivierung unter verschiedenen Spektralbereichen ist bekannt, dass auch diese einen Einfluss auf das Fettsäureprofil in Algen haben (Hultberg 2014).

Die Änderung von Temperatur, Lichtintensität und Lichtspektrum hat verschiedene Effekte auf die Fettsäurezusammensetzung in der Mikroalge *Acutodesmus obliquus* gezeigt. In dieser Studie konnten erstmalig optimale Parameter für die Fettsäureproduktion in *A. obliquus* identifiziert werden.

5.1 Fettsäuren

Bei der Analyse der Fettsäuren in *A. obliquus* konnten 10 verschiedene FAs identifiziert werden, die zu mehr als 1 % vorlagen (16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 16:4, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4). Dabei waren die FAs 16:0 und 18:3 zu den größten Anteilen zu finden. In einer Studie von 2013 wurden dieselben FAs in *A. obliquus* (Stamm: SAG 276-10) identifiziert, die hier zu einem Anteil von mehr als 1 % in den Zellen enthalten waren (Abomohra et al. 2013). Jedoch lag die FA 18:1 in dieser Studie zum größten Anteil vor. Danach folgten die FA 16:0 und 18:3. Diese Unterschiede können durch die Verwendung eines anderen Stammes von *A. obliquus*, die geringe Photonenflussdichte von $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ oder die Dunkelperiode von 8 h begründet sein. Da die FA in den Vorkulturen aller fünf Versuche zu ungefähr

Diskussion

gleichen Anteilen enthalten waren (vgl. Abb. 10), hatten die Versuche die gleichen Startbedingungen und Änderungen in den FA Anteilen können auf dieser Grundlage miteinander verglichen werden.

Im Temperaturbereich von 20-35 °C hat sich in den Algen mit steigender Temperatur eine Erhöhung des Anteils an SFAs und MUFAs gezeigt, während der Anteil an PUFAs gesunken ist. Mit steigender Lichtintensität waren in den Algen größere Anteile an PUFAs enthalten und geringere Anteile an SFAs und MUFAs. Eine differenziertere Betrachtung der PUFAs hat jedoch ergeben, dass die FAs 16:2 und 18:2 mit steigender Lichtintensität sinken. Hier muss folglich innerhalb der Gruppe der PUFAs in leicht ungesättigte und hoch ungesättigte FAs unterschieden werden. Die Algen, die unter rotem Licht kultiviert wurden, haben im Gegensatz zu den anderen Farbgruppen signifikant höhere Anteile der FAs 16:2, 16:3, 18:1 und 18:2 gezeigt. Die Anteile der FAs 16:4 und 18:3 waren dagegen erniedrigt.

In Versuch 3 hat sich bei dem Datensatz für 72 h ein ungewöhnlich starker Unterschied zu den Daten von 48 h ergeben. Bei diesen Proben liegen möglicherweise Fehler in der Probenvorbereitung für die Analyse mittels GC-MS oder eine falsche Zuordnung der Proben vor. Der Vergleich mit den Ergebnissen für den vierten Tag nach Versuchsstart zeigt, dass die Werte näher an den Werten von 48 h als an den Werten von 72 h liegen (Gebhardt 2019). Aus diesem Grund wurden die Fettsäureanteile von 72 h in V3 als fehlerhaft angesehen und nicht in die Auswertung einbezogen.

5.2 Temperatureffekte

Die Versuche 2, 3 und 4 wurden alle bei der gleichen Lichtintensität und mit den gleichen Lichtspektren durchgeführt. Unterschiede in den Fettsäureprofilen der Versuche können dadurch auf die verschiedenen Temperaturen zurückgeführt werden. Höhere Temperaturen hatten eine Abnahme der Anteile an PUFAs und eine Zunahme der Anteile an SFAs und MUFAs zur Folge (vgl. Abb. 15). Damit hat sich die erste Hypothese, die Erhöhung des Sättigungsgrades der FAs mit steigender Temperatur, bestätigt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Algen wie Pflanzen den Sättigungsgrad der FAs in ihren Membranen der Temperatur anpassen, um die Fluidität zu regulieren. Bei einer Temperatur von 20 °C werden mehr PUFAs gebildet, die die Membranfluidität durch ihre Struktur erhöhen (Nettleton 1995). Eine hohe Temperatur von 35 °C bewirkt eine höhere Fluidität der Lipide in den Zellen als bei 25 °C (Vorkultur). Um diesem Effekt entgegenzuwirken, stellen die Algen mehr SFAs und MUFAs her und verringern so die Fluidität der Membranen (Sharma et al. 2012). Die Regulation erfolgt über eine spezielle Desaturase, indem abhängig von der Temperatur mehr oder weniger SFAs und MUFAs in PUFAs umgewandelt werden (Heldt und Piechulla 2015). Dieselben Temperatureffekte wurden in anderen Studien mit Algen und Cyanobakterien beobachtet, unter anderem auch in den Mikroalgen *Chlorella vulgaris* and *Botryococcus braunii* (Guschina und Harwood; Hu et al. 2008).

Diskussion

5.3 Intensitätseffekte

Eine steigende Lichtintensität hat zu einem Anstieg des Anteils an PUFAs in den Algen geführt. Die Anteile an SFAs und MUFAs sind dagegen gesunken (vgl. Abb. 16). Dieses Ergebnis ist gegensätzlich zu den Ergebnissen der meisten Studien, die den Einfluss der Lichtintensität auf verschiedene Algen untersucht haben und zu der auf Grundlage dieser Untersuchungen aufgestellten Hypothese 2. In einer Studie von 2004 hat sich beispielweise mit steigender Lichtintensität ein geringerer Anteil an PUFAs ergeben (Fábregas et al. 2004). Dabei wurde die Mikroalge *Nannochloropsis* sp. mit Leuchtstoffröhren (cool white) unter fünf verschiedenen Photonendichten (40, 60, 80, 220, und 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kultiviert. Mit steigender Lichtintensität wurden in der Studie höhere Anteile an gesättigten FAs und geringere Anteile an ω -3-FAs beobachtet (Fábregas et al. 2004). Bei hohen Lichtintensitäten werden in den Zellen mehr Speicherlipide hergestellt, wofür SFAs und MUFAs synthetisiert werden (Hu et al. 2008). Bei geringeren Intensitäten wird die Synthese von PUFAs verstärkt, die in den Chloroplasten enthalten sind, um die Oberfläche der Thylakoidenmembranen zu vergrößern (Guschina und Harwood 2006). Eine Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse könnten die deutlich geringeren Lichtintensitäten sein, die in der Studie mit *Nannochloropsis* sp. verwendet wurden. Außerdem erzeugen die in der Studie verwendeten Leuchtstoffröhren ein anderes Lichtspektrum als die Metall Halogen Lampen, deren Spektrum ähnlich dem des Sonnenlichtes ist.

5.4 Farbeffekte

Bezüglich der Spektralfarben konnten keine signifikanten Abweichungen zwischen der Weißlichtreferenz und der Bestrahlung der Algen mit blauem und grünem Licht beobachtet werden. In allen Versuchen ist jedoch ein signifikanter Effekt des roten Lichts auf die Fettsäureprofile zu beobachten, womit sich Hypothese 3 bestätigt (vgl. Tabelle 5). Bei rotem Licht sind in den Algen höhere Anteile der FAs 16:2, 16:3, 18:1 und 18:2 vorhanden. Gleichzeitig sind die hoch ungesättigten FAs 16:4 und 18:3 in deutlich geringeren Anteilen enthalten als bei grünem, blauem und weißem Licht (vgl. Abb. 22).

In einer Studie mit *C. vulgaris* wurde der Einfluss verschiedener Lichtspektren auf die FAs untersucht (Hultberg 2014). Hierbei hat grünes Licht im Vergleich zu anderen Lichtspektren zu höheren Anteilen der FAs 16:3 und 18:3 geführt. Die FAs 18:0, 18:1 und 18:2 waren dagegen in geringeren Mengen vorhanden. Eine Erhöhung der FAs 16:3 und 18:3 spricht für eine Umstrukturierung bzw. Vermehrung der Thylakoide, da diese FAs vor allem in den Thylakoidenmembranen vorkommen (Hultberg 2014). Grünes Licht hat auf Pflanzen einen ähnlichen Effekt wie Verschattung, da es nur zu einem geringen

Diskussion

Anteil von den Pigmenten absorbiert wird und dadurch weniger effizient für die Photosynthese genutzt werden kann als stärker absorbierte Spektren (Heldt und Piechulla 2015). Um auch im Schatten möglichst viel Licht zu absorbieren, synthetisieren die Pflanzen vermehrt Thylakoide (Zhang et al. 2011). Eine ähnliche Reaktion könnte bei den Algen, die mit grünem Licht bestrahlt wurden, vorliegen. Die in der Studie verwendeten LED Lampen haben Grünlicht mit einem spektralen Maximum bei 525 nm emittiert (Hultberg 2014). In dieser Arbeit hat jedoch nicht nur die Bestrahlung mit Grünlicht höhere Anteile an PUFAs in den Algen gezeigt, sondern auch Weißlicht und Blaulicht. Es wäre möglich, dass die Produktion von Thylakoiden durch den Wellenlängenbereich von 450-540 nm angeregt wird und dadurch die Anteile an PUFAs (besonders 16:4 und 18:3) bei grünem, blauem und weißem Licht steigen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die grüne und blaue Folie einen gemeinsamen Transmissionsbereich von 450-540 nm haben, während das Spektrum der roten Folie außerhalb dieses Bereichs liegt. Gleichzeitig würden die Anteile der FAs 16:2 und 18:2 sinken, da sie die Vorläufer der FAs 16:4 und 18:3 sind und zum Teil durch eine Desaturase in PUFAs umgewandelt werden würden. Dieser Zusammenhang zwischen leicht ungesättigten FAs als Vorläufermoleküle und dem Anteil an PUFAs konnte auch in einer Studie von 2006 mit einer anderen Mikroalge (*Selenastrum capricornutum*) gezeigt werden. Eine Abnahme der Anteile der FAs 18:2 und 18:4 hat zu einem Anstieg des Anteils an 18:1 geführt (Guschina und Harwood 2006). Es könnte sich folglich um eine umweltreizabhängige Aktivierung einer Desaturase durch Bestrahlung der Algen mit einem spezifischen Wellenlängenbereich handeln. Um den Wellenlängenbereich, bei dem dieser Effekt zu beobachten ist, genauer definieren zu können, könnten weitere Versuche mit anderen Filterfolien durchgeführt werden. Dabei könnten Filterfolien verwendet werden, die in Abstufungen einen wachsenden Anteil des Transmissionsbereichs von 450-540 nm enthalten.

Eine weitere mögliche Erklärung für den Effekt des roten Lichts auf die Fettsäurezusammensetzung ist, dass das rote Lichtspektrum stark von dem Hauptpigment der Photosynthese, dem Chlorophyll a, absorbiert wird, da dieses unter anderem ein Absorptionsmaximum bei 680 nm besitzt (Heldt und Piechulla 2015). Aus diesem Grund kann rotes Licht sehr effizient von den Algen genutzt werden. Die Untersuchungen im Praxisssemester haben für rotes Licht in allen Versuchen, außer bei einer hohen Lichtintensität, das stärkste Wachstum und die höchste photosynthetische Effizienz ergeben (Steinke 2019). Die starke Absorption und die hohe photosynthetische Effizienz könnten Gründe dafür sein, dass bei rotem Licht weniger Thylakoide in den Zellen gebildet wurden als bei grünem, blauem oder weißem Licht. Dies würde die geringeren Anteile der FAs 16:4 und 18:3 erklären.

5.5 Überlagerte Effekte

Ausgehend von der Vorkultur wurden die Algen beim Animpfen der Teströhrchen immer einer neuen Temperatur und Lichtintensität ausgesetzt. Wie die Auswertung der Versuche gezeigt hat, passen sie die Fettsäurezusammensetzung den veränderten Wachstumsbedingungen an. Die Temperatur-, Licht- und Farbeffekte sind nach 72 h am stärksten ausgeprägt, wenn sich die Algen an die Wachstumsparameter adaptiert haben. Es finden aber auch schnelle Reaktionen statt, die bereits 1 h nach Versuchsbeginn Auswirkungen zeigen. Nach 1 h sind in den Versuchen 2 und 3 verstärkte Reaktionen zu beobachten (vgl. Abb. 11 und 14). Zum Beispiel steigt in Versuch 2 der Anteil der FA 16:0 zunächst stark an und sinkt dann wieder, bleibt aber über dem Wert der Vorkultur. Es liegt also insgesamt ein Anstieg des Anteils vor, der nach 1 h verstärkt ausgeprägt ist. So verhält es sich auch bei der FA 18:3, die nach 1 h stark gesunken ist und dann wieder etwas ansteigt. Es handelt sich möglicherweise um eine Schutzfunktion der Algen, die als Reaktion auf die plötzlich erhöhte Temperatur von 30 °C im Gegensatz zu 25 °C in der Vorkultur auftritt. Zudem wäre es möglich, dass die Algen als Reaktion auf den erhöhten Photonenfluss von $480 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verglichen mit $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in der Vorkultur Thylakoide abbauen, um sich vor Photoinhibition zu schützen. In Versuch 1 sind gegenteilige Reaktionen zu erkennen (vgl. Abb. 18). Der Anteil der FA 16:0 sinkt beispielsweise in den ersten 3 h um bis zu 12 %, steigt dann aber im weiteren Verlauf über den Wert der Vorkultur an. Dieser Verlauf ist bei dem roten und blauen Spektralbereich besonders stark ausgeprägt (vgl. Anhang Abb. 25 und 27). Die Verringerung des Anteils nach 3 h könnte eine Reaktion auf die hohe Photonenflussdichte von $480 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sein. Nach 48 h ist ein Anstieg des Anteils der FA 16:0 zu beobachten, der auf die Temperatur zurückgeführt werden kann. Zu diesem Zeitpunkt haben die Kulturen bereits eine höhere Biomassenkonzentration erreicht und verschatten sich dadurch gegenseitig. In Versuch 5 ist ebenfalls eine Überlagerung von Temperatur- und Lichteffekten zu sehen (vgl. Abb. 19). Durch die höhere Temperatur in den Teströhrchen sinkt der Anteil der FA 18:3 in der ersten Stunde. Nach 3 h tritt dagegen eine Erhöhung des Anteils durch die hohe Photonenflussdichte ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) auf.

5.6 Produktion von Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus*

Um eine möglichst hohe Produktion an PUFAs in *A. obliquus* zu erreichen haben sich in dieser Arbeit eine hohe Photonenflussdichte ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und geringe Temperaturen (20 °C) als geeignet erwiesen. Bei diesen Parametern wurden die höchsten Anteile an PUFAs in den Algen erzielt. Das Wachstum der Algen ist jedoch bei 20 °C geringer als bei höheren Temperaturen. Es hat sich gezeigt, dass die Kombination von weißem Licht, einer hohen Photonenflussdichte ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und einer

Diskussion

Temperatur von 30 °C für ein starkes Wachstum besonders geeignet ist (Steinke 2019). Diese Kultivierungsbedingungen könnten für die Produktion von PUFAs genutzt werden, da gleichzeitig eine hohe Biomassenkonzentration und, aufgrund der starken Lichtintensität, auch ein hoher Anteil an PUFAs erreicht werden.

Für Kultivierungen, die bei einer höheren Biomassenkonzentration (ab 3 g l⁻¹) begonnen werden, könnte die Nutzung des grünen Spektralbereiches höhere Ausbeuten an PUFAs zeigen als Weißlicht. Bei hohen Biomassenkonzentrationen, einer hohen Photonenflussdichte (800 μmol m⁻² s⁻¹) und einer Temperatur von 30 °C war das Wachstum der Algen unter grünem und weißem Licht gleich stark. Die Messung der Chlorophyll Fluoreszenz hat außerdem ergeben, dass das grüne Licht von den Algen in diesem Fall effizienter für die Photosynthese genutzt wurde als weißes Licht (Steinke 2019). Dies kann damit erklärt werden, dass grünes Licht aufgrund der geringen Absorption tiefer in Kulturen mit hoher Dichte eindringen kann als stärker absorbierte Spektralbereiche. Durch die höhere Eindringtiefe wird die gleiche Lichtenergie wie bei weißem Licht auf ein größeres Volumen verteilt und kann dadurch effizienter von den Algen genutzt werden (Ooms et al. 2017). Da sich zwischen grünem und weißem Licht kein signifikanter Unterschied in der Fettsäurezusammensetzung ergeben hat, wären auch diese Kultivierungsbedingungen geeignet für die Produktion von PUFAs. Ein Hybridsystem aus Photobioreaktor und Photovoltaik sollte so konstruiert werden, dass den Algen ein Lichtspektrum zur Verfügung steht, das den grünen Spektralbereich enthält. Durch die Bestrahlung mit grünem Licht werden höhere Anteile an PUFAs in den Algen erreicht als mit rotem Licht und ein stärkeres Wachstum als mit blauem Licht (Steinke 2019).

Die Kultivierung unter rotem Licht hat verglichen mit den anderen Lichtspektren einen besonders hohen Anteil an SFAs und MUFAs in den Algen gezeigt. Für die Produktion dieser Fettsäuregruppen wäre den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge eine Kultivierung bei rotem Licht mit geringer Photonenflussdichte (120 μmol m⁻² s⁻¹) und einer hohen Temperatur (35°C) geeignet. Bezüglich des Wachstums hat die Bestrahlung mit rotem Licht ein stärkeres Wachstum und eine höhere photosynthetische Effizienz der Algen als bei grünem oder blauem Licht gezeigt. Eine geringe Lichtintensität und eine Temperatur von 35 °C verringern jedoch das Wachstum der Algen (Steinke 2019).

6 Fazit

Es hat sich für Temperatur, Lichtspektrum und Lichtintensität ein Einfluss auf die Fettsäurezusammensetzung in *A. obliquus* gezeigt. Die Hypothesen 1 und 3 konnten durch die Ergebnisse bestätigt werden. Der Sättigungsgrad der Fettsäuren in den Algen ist mit steigender Temperatur angestiegen, da größere Anteile an SFAs und MUFAs zu beobachten waren, während die Anteile an PUFAs gesunken sind. Bezüglich der Lichtspektren hat rotes Licht im Vergleich mit weißem, grünem und blauem Licht signifikante Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung der Algen ergeben. In den Zellen waren geringere Anteile der hoch ungesättigten FAs und größere Anteile der leicht ungesättigten FAs enthalten. Die zweite Hypothese zum Einfluss der Lichtintensität konnte durch die Versuche nicht bestätigt werden. Entgegen der Beobachtungen in anderen Studien hat sich der Sättigungsgrad der FAs mit steigender Lichtintensität verringert. Dies kann dadurch erklärt werden, dass in bisherigen Studien andere Lichtquellen und andere Lichtintensitäten für die Bestrahlung der Algen genutzt wurden als in diesen Versuchen. Da den Zellen somit unterschiedliche Lichtspektren und Bestrahlungsstärken zur Verfügung standen, sind die Ergebnisse schwer vergleichbar.

Die Kultivierungsparameter Temperatur und Licht haben sowohl einen Einfluss auf das Wachstum als auch den Fettsäuremetabolismus in *A. obliquus* gezeigt. Für die Produktion von PUFAs, die in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt werden können, haben sich eine hohe Lichtintensität und eine Temperatur von 20 - 30 °C als geeignet erwiesen. Ein hoher Anteil an SFAs, die für die Herstellung von Biodiesel genutzt werden können, hat sich bei einer geringen Lichtintensität, einer Temperatur von 35 °C und der Bestrahlung mit rotem Licht ergeben.

7 Literaturverzeichnis

- Abomohra**, Abd El-Fatah; Wagner, Martin; El-Sheekh, Mostafa; Hanelt, Dieter (2013): Lipid and total fatty acid productivity in photoautotrophic fresh water microalgae: screening studies towards biodiesel production. In: *J Appl Phycol* 25 (4), S. 931–936. DOI: 10.1007/s10811-012-9917-y.
- Amer**, Mariam; Saad, AbdelGawad; Ismail, Nahed K. (2019): Sustainable Approaches for Biofuels Production Technologies. Cham: Springer International Publishing (7).
- aprentas** (2017a): Laborpraxis Band 3: Trennungsmethoden. Cham: Springer International Publishing.
- aprentas** (2017b): Laborpraxis Band 4: Analytische Methoden. Cham: Springer International Publishing.
- Behera**, Basanta Kumara; Varma, Ajit (2019): Bioenergy for Sustainability and Security. Cham: Springer International Publishing.
- Berg**, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; Gatto, Gregory J.; Stryer, Lubert (2018): Stryer Biochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Boujard**, Daniel; Anselme, Bruno; Cullin, Christophe; Raguénès-Nicol, Céline (2014): Zell- und Molekularbiologie im Überblick. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Chisti**, Yusuf (2008): Biodiesel from microalgae beats bioethanol. In: *Trends in biotechnology* 26 (3), S. 126–131. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.12.002.
- Day**, John G.; Benson, Erica E.; Fleck, Roland A. (1999): In Vitro Culture and Conservation of Microalgae: Applications for Aquaculture, Biotechnology and Environmental Research. In: *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, S. 127–136.
- Demirbas**, Ayhan (2008): Biodiesel. A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines. London: Springer London.
- Fábregas**, Jaime; Maseda, Ana; Dominguez, Adolfo; Otero, Ana (2004): The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. In: *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (20), S. 31–35.
- Ferrigo**, Davide; Galla, Giulio; Sforza, Eleonora; Morosinotto, Tomas; Barcaccia, Gianni; Ceschi Berrini, Cristina (2015): Biochemical characterization and genetic identity of an oil-rich *Acutodesmus obliquus* isolate. In: *J Appl Phycol* 27 (1), S. 149–161. DOI: 10.1007/s10811-014-0315-5.
- Gebhardt**, Annkathrin (2019): Effects of different light intensities, light spectra and temperatures on the growth and fatty acid composition of the microalgae *Acutodesmus obliquus*. Master's Thesis. Norwegian University of Life Sciences, Norwegen.
- Guschina**, Irina A.; Harwood, John L. (2006): Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. In: *Progress in lipid research* 45 (2), S. 160–186. DOI: 10.1016/j.plipres.2006.01.001.
- Hamm**, Michael; Neuberger, Dirk (Hg.) (2008): Omega-3 aktiv. Gesundheit aus den Meer. 2. Aufl. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG.
- Heldt**, Hans Walter; Piechulla, Birgit (2015): Pflanzenbiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Hindersin, Stefan; Leupold, Marco; Kerner, Martin; Hanelt, Dieter (2013): Irradiance optimization of outdoor microalgal cultures using solar tracked photobioreactors. In: *Bioprocess and biosystems engineering* 36 (3), S. 345–355. DOI: 10.1007/s00449-012-0790-5.

Hu, Qiang; Sommerfeld, Milton; Jarvis, Eric; Ghirardi, Maria; Posewitz, Matthew; Seibert, Michael; Darzins, Al (2008): Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 54 (4), S. 621–639. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x.

Hultberg, Malin (2014): Final Report: Impact of light quality on biomass production and fatty acid composition in *Chlorella vulgaris*. Dept. of Biosystems and Technology.

Kayser, Oliver; Aversch, Nils (2015): Technische Biochemie. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.

Kolb, Bruno (2003): Gaschromatographie in Bildern. Eine Einführung. 2. Aufl. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Krienitz, Lothar; Bock, Christina (2012): Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. In: *Hydrobiologia* 698 (1), S. 295–326. DOI: 10.1007/s10750-012-1079-z.

Kumar, Arun; Kaushal, Sumit; Saraf, Shubhini A.; Singh, Jay Shankar (2018): Microbial bio-fuels a solution to carbon emissions and energy crisis. In: *Front Biosci* 23 (10), S. 1789–1802. DOI: 10.2741/4673.

Lebensmittelchemische Gesellschaft (Hg.) (2007): Fettsäuren - Risiken und Nutzen. Wirkungsweise, ernährungsphysiologische Bedeutung und rechtliche Aspekte. Unter Mitarbeit von Deutsche Gesellschaft für Ernährung. 1. Aufl. Hamburg: B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG (Schriftenreihe Lebensmittelchemische Gesellschaft, 28).

Lewis, Roger W. (1961): Temperature and Pressure Effects on the Fatty Acids of some Marine Ectotherms. In: *Comp. Biochem. Physiol.* (6), S. 75–89.

Li, Da-Wei; Xie, Wei-Hong; Hao, Ting-Bin; Cai, Jia-Xi; Zhou, Tian-Bao; Balamurugan, Srinivasan et al. (2018): Constitutive and Chloroplast Targeted Expression of Acetyl-CoA Carboxylase in Oleaginous Microalgae Elevates Fatty Acid Biosynthesis. In: *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* 20 (5), S. 566–572. DOI: 10.1007/s10126-018-9841-5.

Mata, Teresa M.; Martins, Antonio A.; Caetano, Nidia. S. (2010): Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (14), S. 217–232.

Morita, Masahiko; Watanabe, Yoshitomo; Saiki, Hiroshi (2000): High Photosynthetic Productivity of Green Microalga *Chlorella sorokiniana*. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* (87).

Mortimer, Charles E.; Müller, Ulrich (Hg.) (2010): Chemie. Das Basiswissen der Chemie. 10. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Nettleton, Joyce A. (1995): Omega-3 Fatty Acids and Health. New York: Chapman & Hall.

Nichols, B. W. (1965): Light Induced Changes in the Lipids of *Chlorella vulgaris*. In: *Biochimica et Biophysica Acta* (106), S. 274–279.

Ogbonna, James Chukwuma; Moheimani, Navid R. (Hg.) (2015): Biomass and biofuels from microalgae. Advances in engineering and technology. Cham: Springer (Biofuels and biorefineries, 2).

- Ooms**, Matthew D.; Graham, Percival J.; Nguyen, Brian; Sargent, Edward H.; Sinton, David (2017): Light dilution via wavelength management for efficient high-density photobioreactors. In: *Biotechnology and bioengineering* 114 (6), S. 1160–1169. DOI: 10.1002/bit.26261.
- Ostertagová**, Eva; Ostertag, Oskar; Kováč, Jozef (2014): Methodology and Application of the Kruskal-Wallis Test. In: *AMM*, S. 115–120. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMM.611.115.
- Patterson**, Glenn W. (1969): Effect of culture temperature on fatty acid composition of *Chlorella sorokiniana*. University of Maryland, Maryland. Department of Botany.
- Quehenberger**, Oswald; Armando, Aaron M.; Dennis, Edward A. (2011): High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. In: *Biochimica et biophysica acta* 1811 (11), S. 648–656. DOI: 10.1016/j.bbali.2011.07.006.
- Reich**, Marco; Hannig, Christian; Al-Ahmad, Ali; Bolek, Richard; Kümmerer, Klaus (2012): A comprehensive method for determination of fatty acids in the initial oral biofilm (pellicle). In: *Journal of lipid research* 53 (10), S. 2226–2230. DOI: 10.1194/jlr.D026260.
- Remmers**, I. M.; Hidalgo-Ulloa, A.; Brandt, B. P.; Evers, W. A. C.; Wijffels, R. H.; Lamers, P. P. (2017): Continuous versus batch production of lipids in the microalgae *Acutodesmus obliquus*. In: *Bioresource technology* 244 (Pt 2), S. 1384–1392. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.04.093.
- Richmond**, Amos (2004): Handbook of microalgal culture. Biotechnology and applied phycology. Oxford OX UK, Ames Iowa USA: Blackwell Science.
- Sharma**, Kalpesh K.; Schuhmann, Holger; Schenk, Peer M. (2012): High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. In: *Energies* 5 (5), S. 1532–1553. DOI: 10.3390/en5051532.
- Sheehan**, J.; Dunahay, T. G.; Benemann, J. R.; Roessler, P. G. (1998): Look back at the U. S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae; Close-Out Report. U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development. Colorado.
- Singer**, Peter (1994): Was sind, wie wirken Omega-3-Fettsäuren. 44 Fragen - 44 Antworten. Frankfurt am Main: Umschau Zeitschriftenverlag Breidenstein GmbH.
- Sonnleitner**, Veronika; Rojacher, Jürgen (Hg.) (2013): Basics Biologie. München: Urban & Fischer.
- Sparkman**, O. David; Penton, Zeldia E.; Kitson, Fulton G. (Hg.) (2011): Gas Chromatography and Mass Spectrometry. A Practical Guide. 2. Aufl. Oxford: Elsevier Inc.
- Steinke**, Josi (2019): Praxissemesterbericht. Einfluss verschiedener Temperaturen, Lichtintensitäten und Lichtspektren auf das Wachstum von *Acutodesmus obliquus*. SSC GmbH.
- Stengel**, Dagmar B.; Connan, Solène (2015): Marine Algae: a Source of Biomass for Biotechnological Applications. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1308, S. 1–37. DOI: 10.1007/978-1-4939-2684-8_1.
- Yun**, Hyun-Shik; Ji, Min-Kyu; Park, Young-Tae; Salama, El-Sayed; Choi, Jaeyoung (2016): Microalga, *Acutodesmus obliquus* KGE 30 as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. In: *Environmental science and pollution research international* 23 (17), S. 17831–17839. DOI: 10.1007/s11356-016-6971-z.
- Zhang**, Tingting; Maruhnich, Stefanie A.; Folta, Kevin M. (2011): Green light induces shade avoidance symptoms. In: *Plant physiology* 157 (3), S. 1528–1536. DOI: 10.1104/pp.111.180661.

Eidesstattliche Erklärung

8 Eidesstattliche Erklärung

Untersuchung der Effekte spektralselektiver Bestrahlung auf Mikroalgen

verfasst von: Josi Steinke

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem o.a. formulierten Thema ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Datum: _____
Unterschrift Steinke Josi

9 Anhang

9.1 Photonenflussdichten

| | | W1 | W2 | R1 | R2 | R3 | G1 | G2 | G3 | B1 | B2 | B3 |
|------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| E1 | Mittelwert Röhrrchen [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] | 106 | 151 | 95 | 115 | 141 | 102 | 117 | 127 | 123 | 122 | 112 |
| | Mittelwert pro Farbe [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] | 129 | | 117 | | | 116 | | | 119 | | |
| E2, E3, E4 | Mittelwert Röhrrchen [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] | 497 | | 397 | 502 | 508 | 453 | 490 | 518 | 472 | 488 | 487 |
| | Mittelwert pro Farbe [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] | 497 | | 469 | | | 487 | | | 482 | | |
| E5 | Mittelwert Röhrrchen [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] | | 800 | 897 | 753 | 732 | 702 | 758 | 878 | | 837 | 775 |
| | Mittelwert pro Farbe [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] | 800 | | 794 | | | 779 | | | 806 | | |

Abbildung 23: Mittlere Photonenflussdichten für jedes Teströhrrchen und jeden Versuch in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, gemessen hinter den optischen Filterfolien in der Kultivierungseinheit.

9.2 Transmissionspektren der Filterfolien

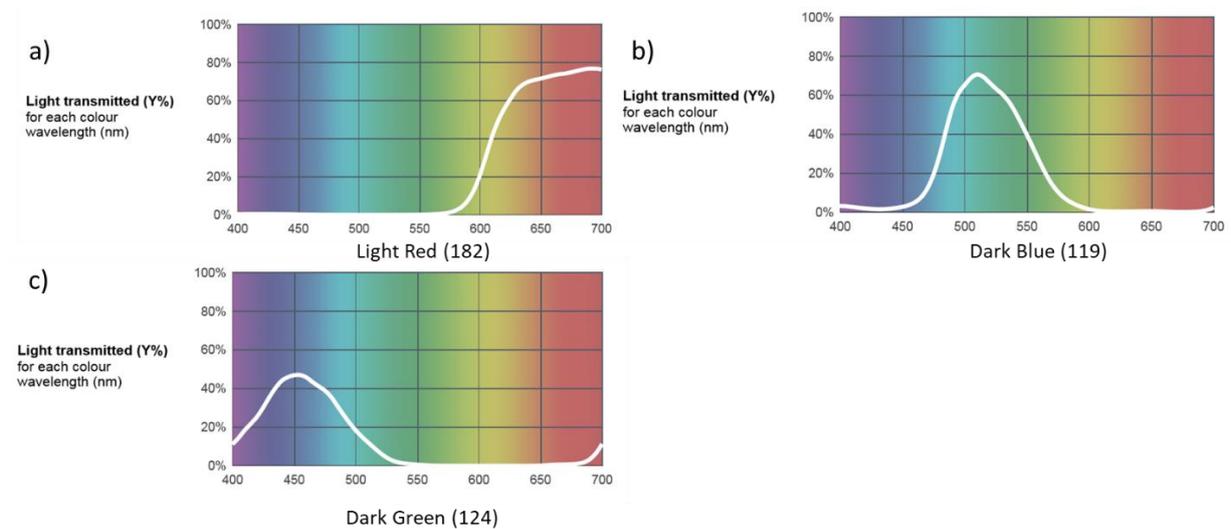


Abbildung 24: Herstellerangaben zu den Transmissionspektren der optischen Filterfolien. Es ist die Transmission in % gegen die Wellenlänge aufgetragen. a) rote Folie b) grüne Folie c) blaue Folie

9.3 Fettsäureprofile

9.3.1 Versuch 1 (30 °C, 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

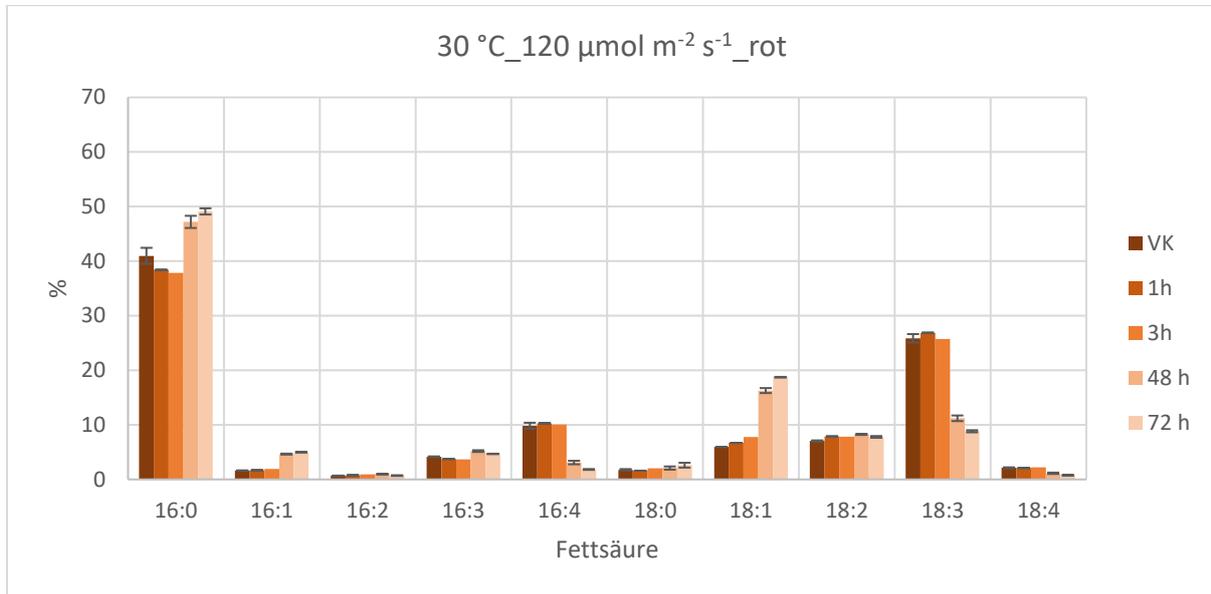


Abbildung 25: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit rotem Licht in Versuch 1 (30 °C, 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

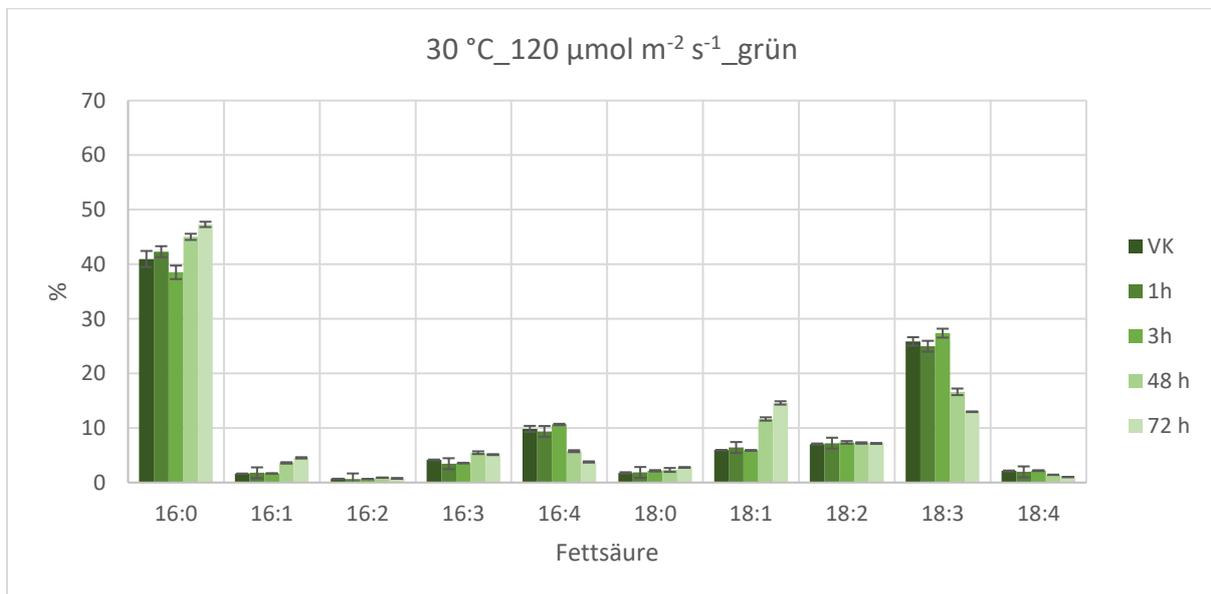


Abbildung 26: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit grünem Licht in Versuch 1 (30 °C, 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

Anhang

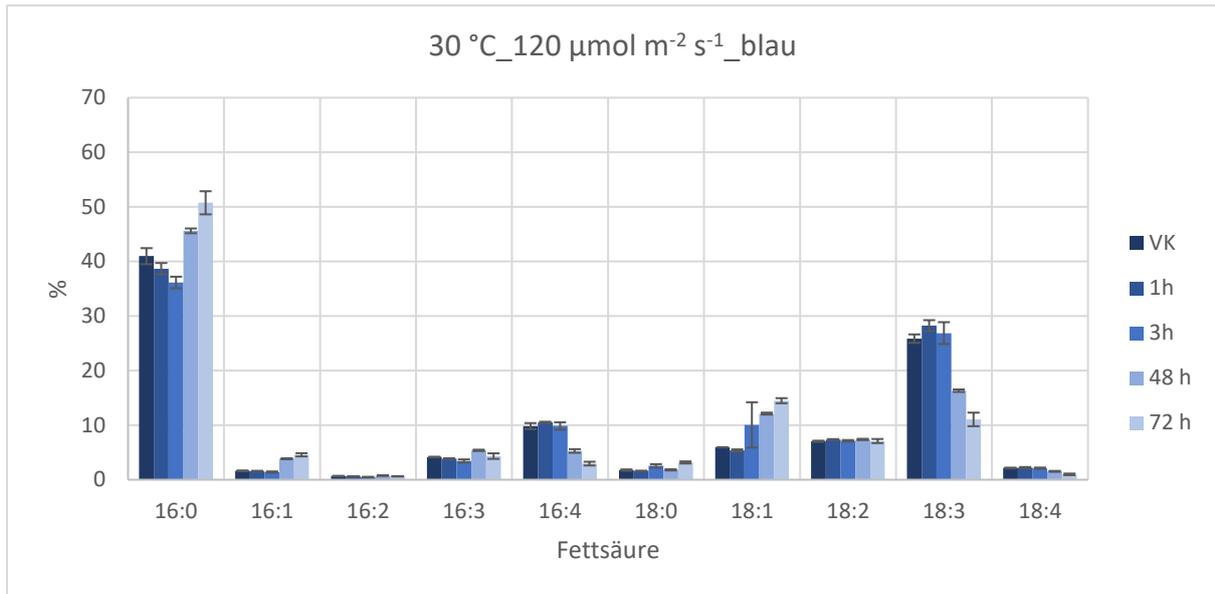


Abbildung 27: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit blauem Licht in Versuch 1 (30 °C, 120 μmol m⁻² s⁻¹). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

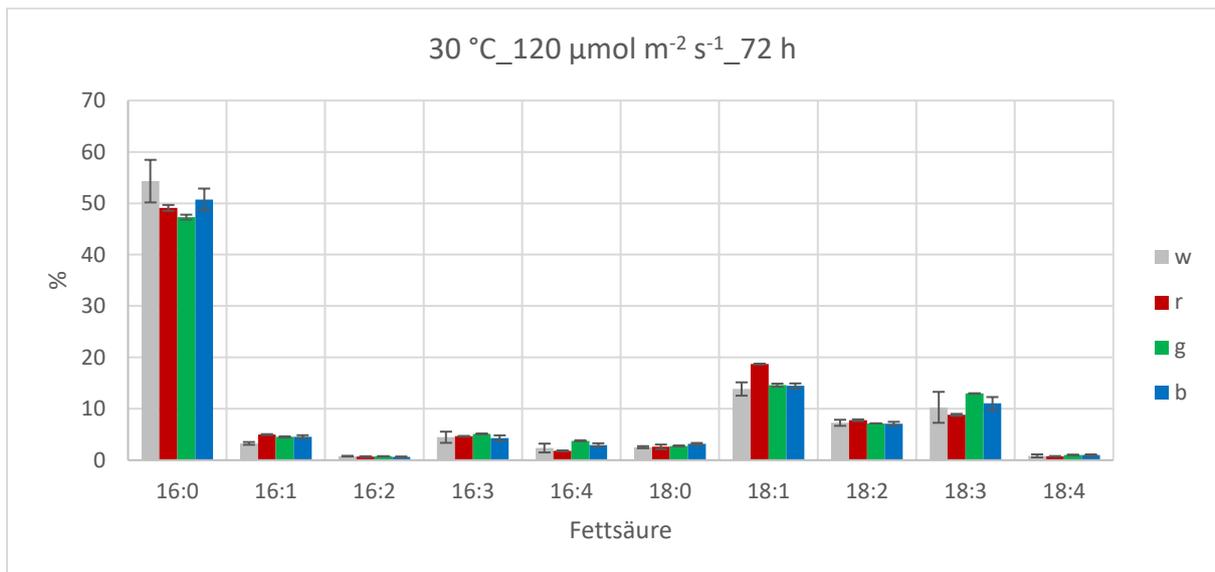


Abbildung 28: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* für Versuch 1 (30 °C, 120 μmol m⁻² s⁻¹) nach 72 h für die verschiedenen Spektralbereiche (w: weiß, r: rot, g: grün, b: blau).

Anhang

9.3.2 Versuch 2 (30 °C, 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

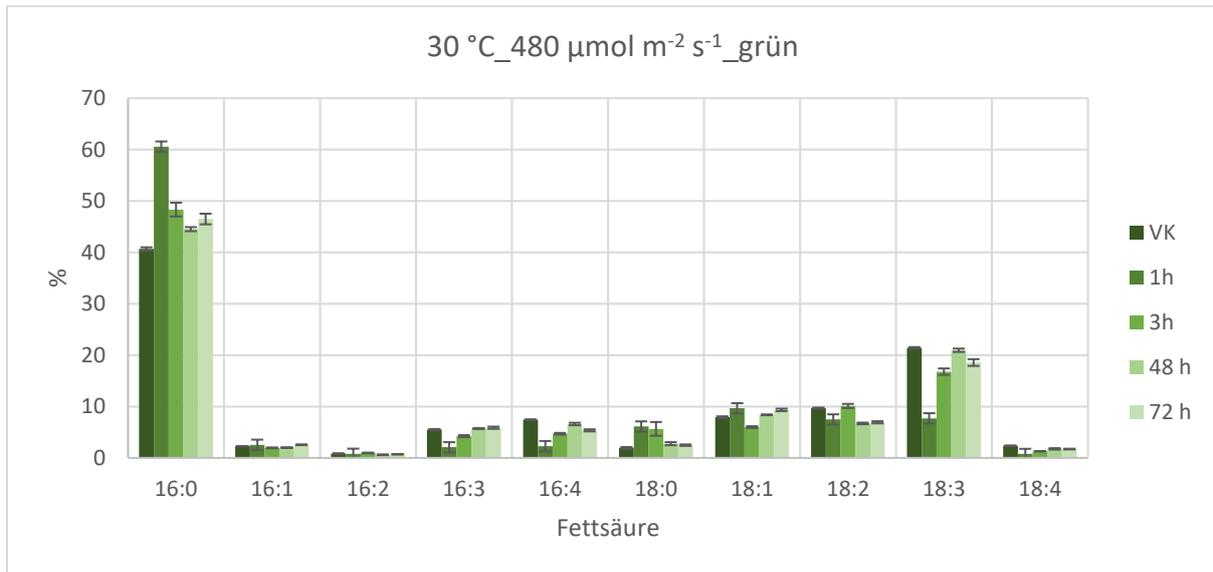


Abbildung 29: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit grünem Licht in Versuch 2 (30 °C, 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

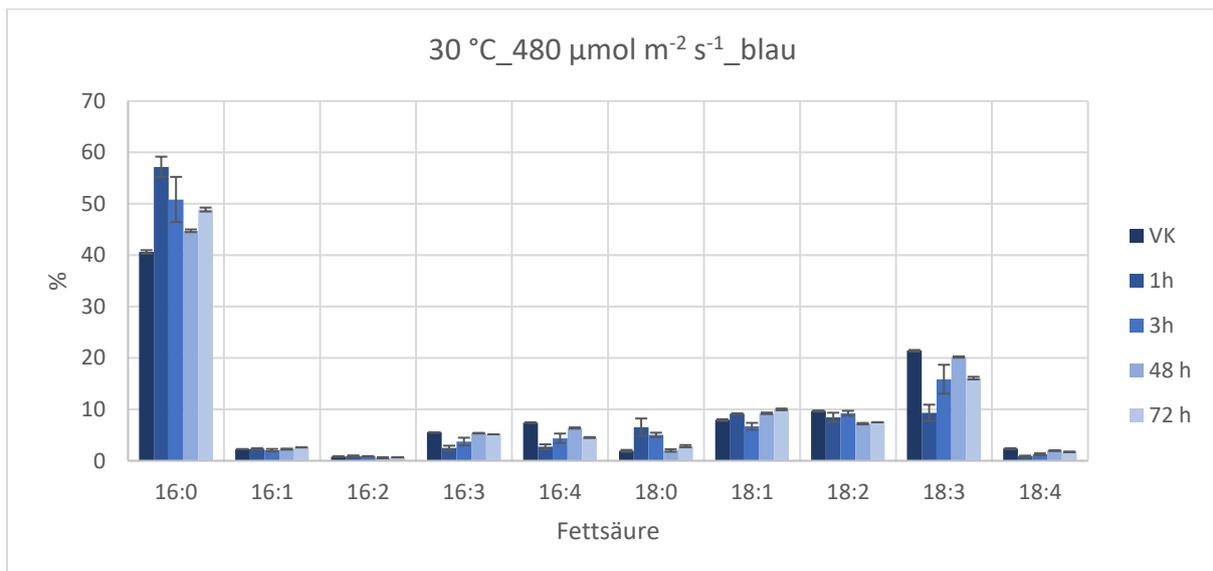


Abbildung 30: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit blauem Licht in Versuch 2 (30 °C, 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

Anhang

9.3.3 Versuch 3 (20 °C, 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

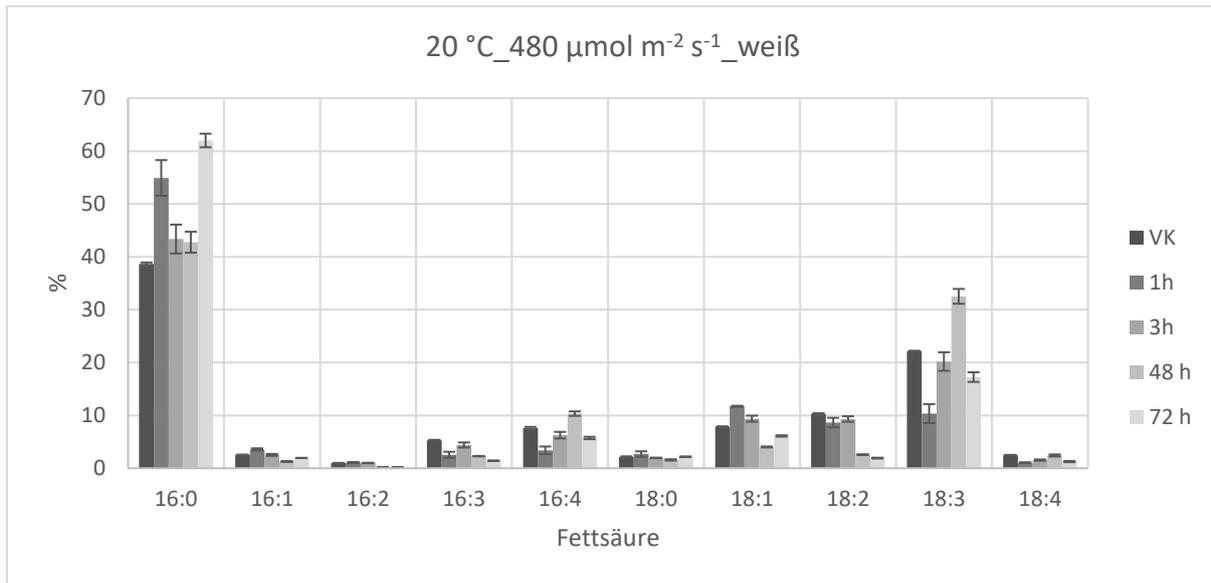


Abbildung 31: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit weißem Licht in Versuch 3 (20 °C, 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

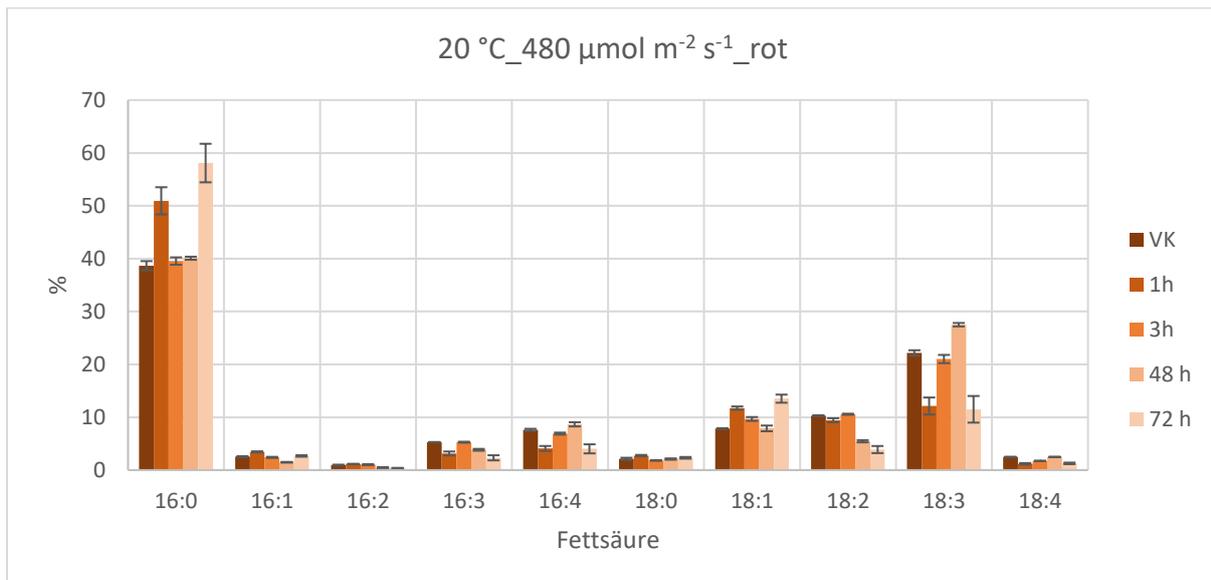


Abbildung 32: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit rotem Licht in Versuch 3 (20 °C, 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

Anhang

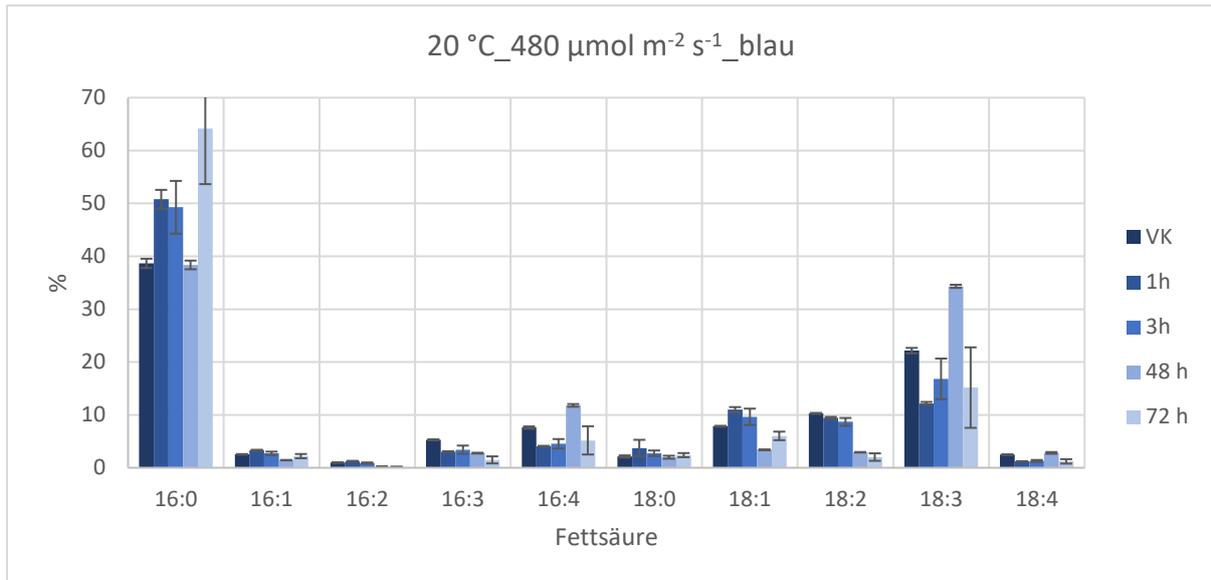


Abbildung 33: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit blauem Licht in Versuch 3 (20 °C, 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

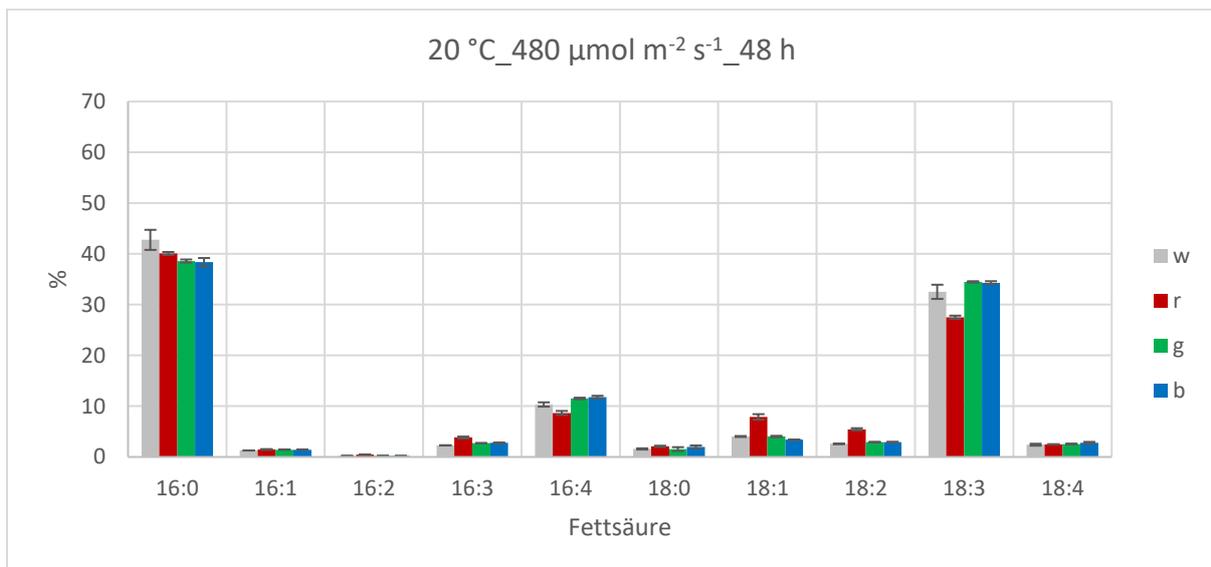


Abbildung 34: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* für Versuch 3 (20 °C, 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nach 72 h für die verschiedenen Spektralbereiche (w: weiß, r: rot, g: grün, b: blau).

Anhang

9.3.4 Versuch 4 ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $480\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)

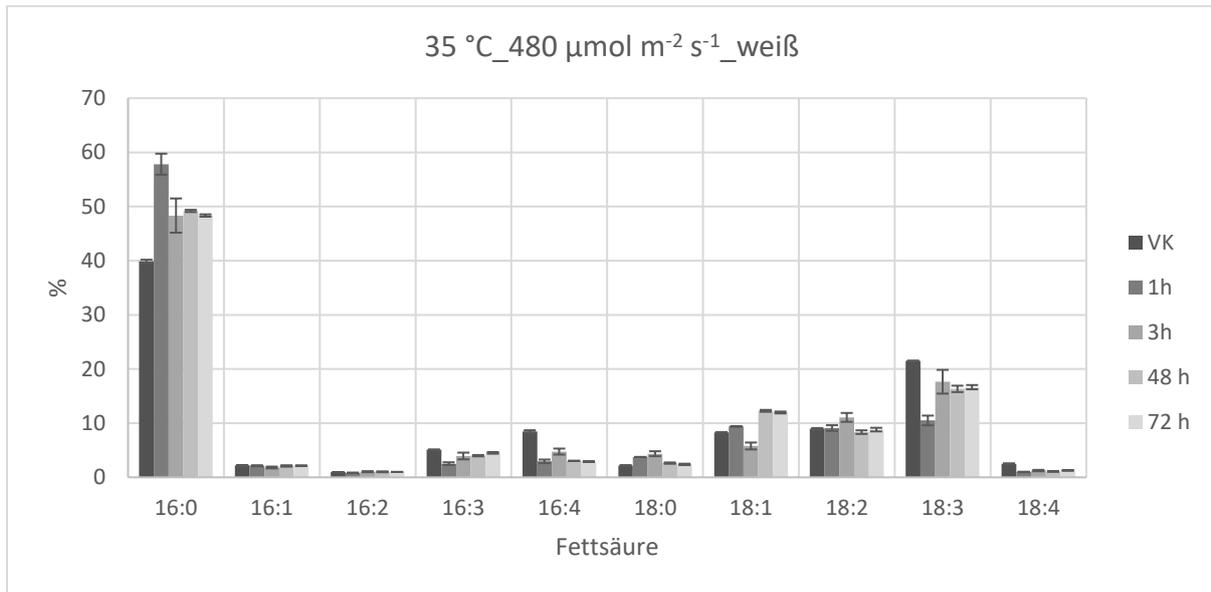


Abbildung 35: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit weißem Licht in Versuch 4 ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $480\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

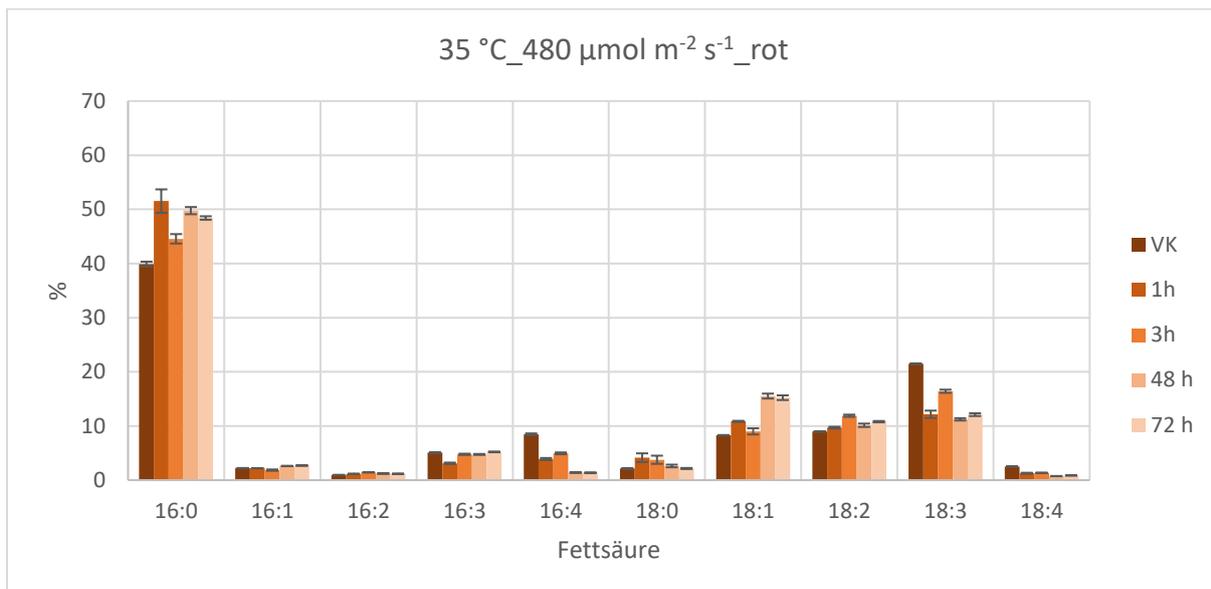


Abbildung 36: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit rotem Licht in Versuch 4 ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $480\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

Anhang

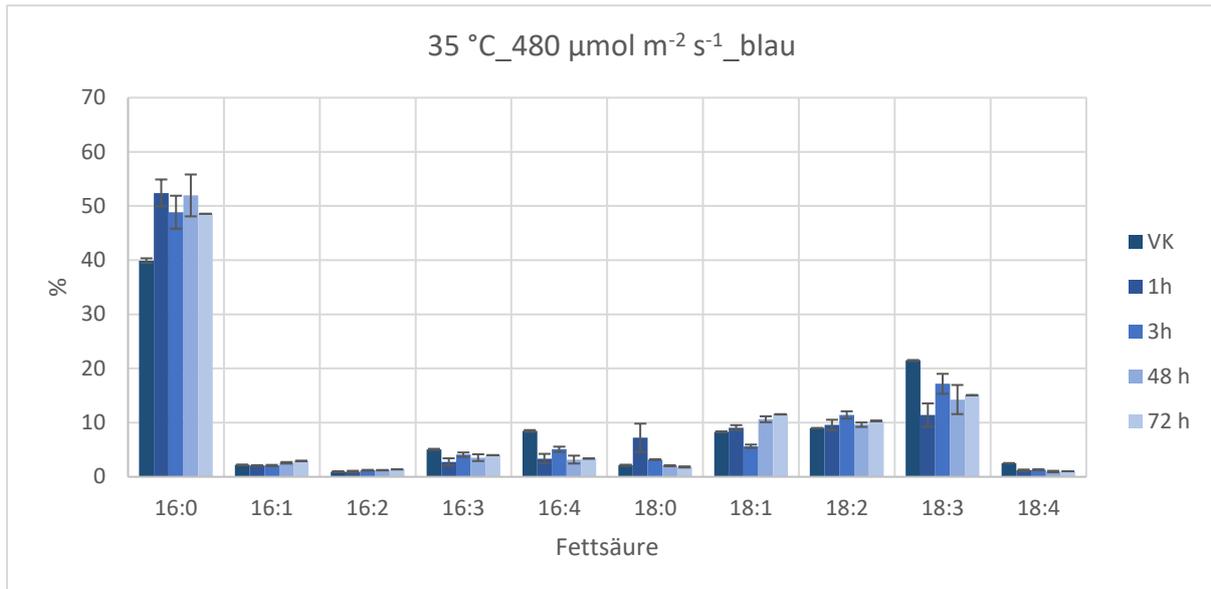


Abbildung 37: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit blauem Licht in Versuch 4 (35 °C, 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

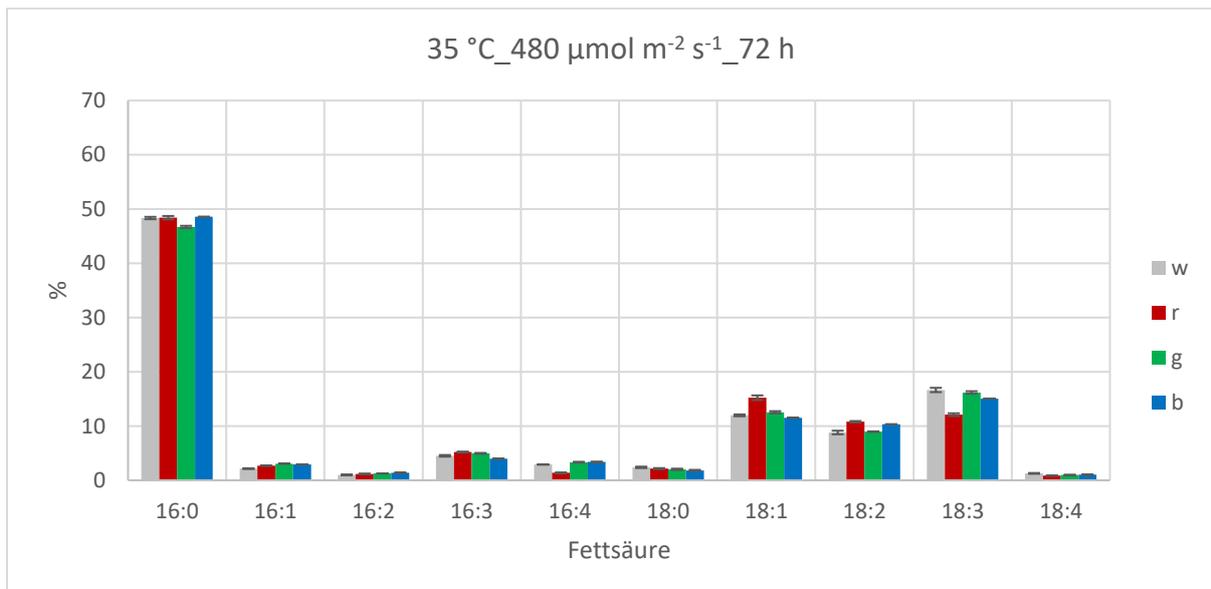


Abbildung 38: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* für Versuch 4 (35 °C, 480 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nach 72 h für die verschiedenen Spektralbereiche (w: weiß, r: rot, g: grün, b: blau).

Anhang

9.3.5 Versuch 5 ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $800\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)

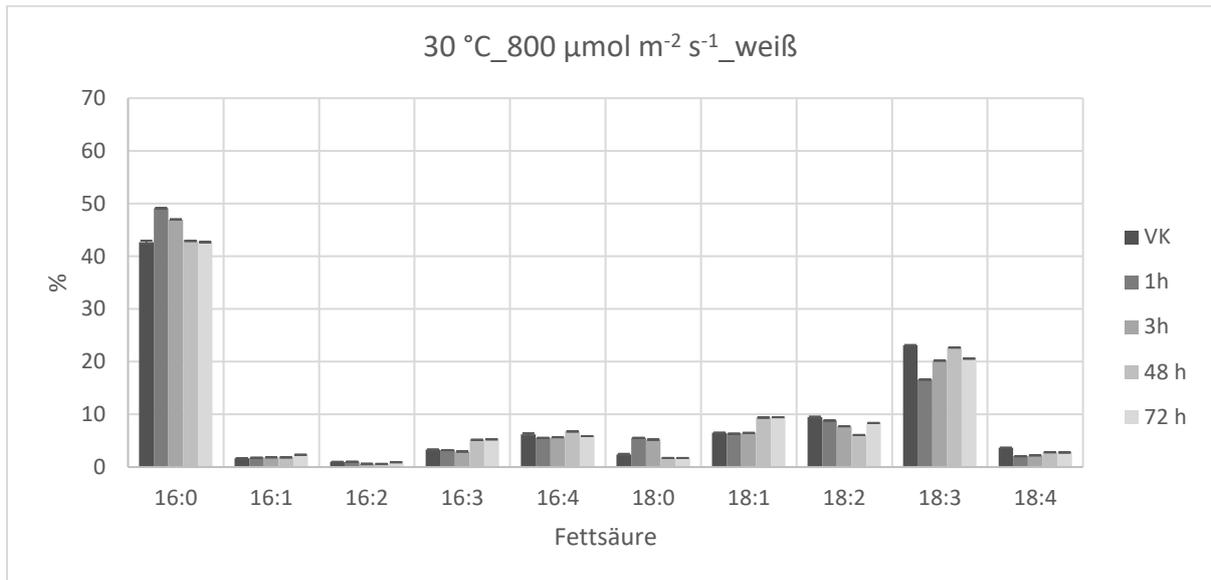


Abbildung 39: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit weißem Licht in Versuch 5 ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $800\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

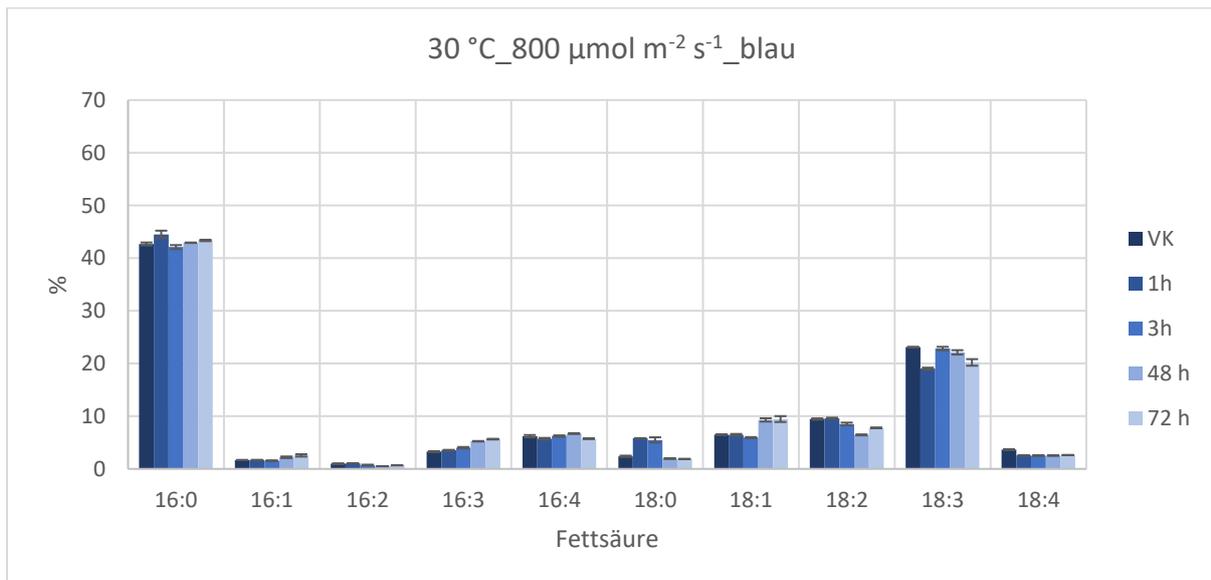


Abbildung 40: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* bei Bestrahlung mit blauem Licht in Versuch 5 ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $800\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). Es ist der Verlauf der Fettsäureanteile über die Zeit dargestellt.

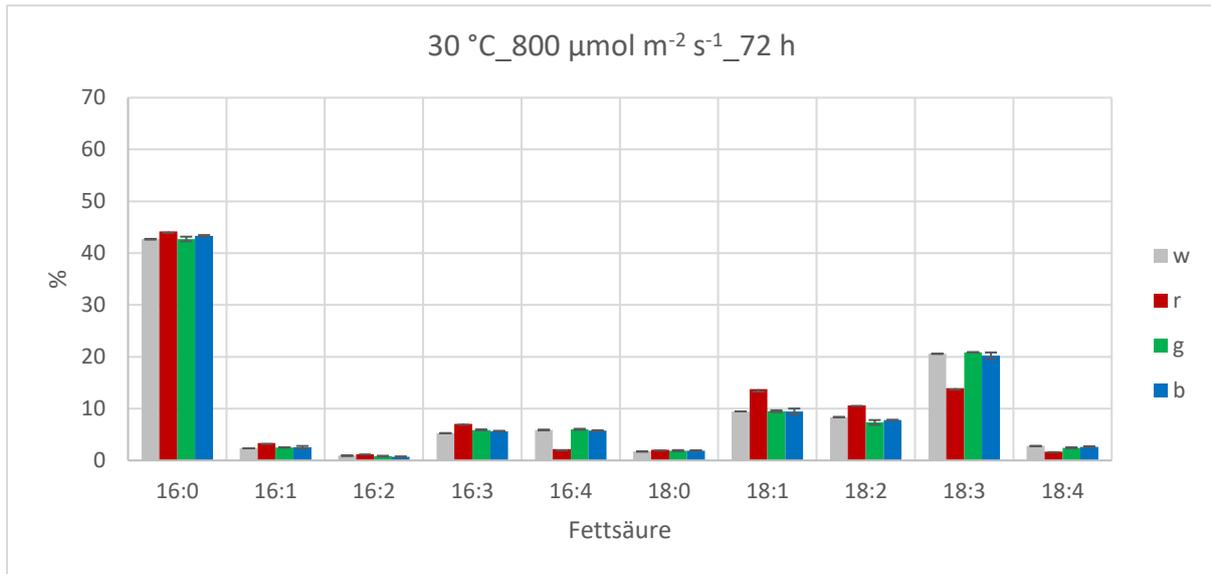


Abbildung 41: Prozentuale Anteile der einzelnen Fettsäuren in *Acutodesmus obliquus* für Versuch 5 (30 °C, 800 μmol m⁻² s⁻¹) nach 72 h für die verschiedenen Spektralbereiche (w: weiß, r: rot, g: grün, b: blau)

9.4 p-Werte und Prüfgrößen

Tabelle 3: p-Werte und Prüfgrößen für den Einfluss der Temperatur auf die Anteile der einzelnen Fettsäuren. Alle Werte < 0,05 sind rot hervorgehoben

| Temperatur | 20 vs. 30 | 20 vs. 35 | 30 vs. 35 | Gesamt | Prüfgröße |
|------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|
| 16:0 | 0.7843 | 0.6864 | 0.0013 | 0.009217 | 93.734 |
| 16:1 | 0.027 | 0.089 | 0.027 | 0.007364 | 98.224 |
| 16:2 | 0.67 | 9.8e-09 | <2e-16 | 2.2e-16 | 76.661 |
| 16:3 | 1.1e-08 | 0.00012 | 0.27229 | 5,66E-05 | 176.705 |
| 16:4 | 0.08438 | 1.1e-05 | 0.00021 | 2,39E-03 | 135.377 |
| 18:0 | 0.06998 | 0.00067 | 0.13254 | 0.005793 | 10.302 |
| 18:1 | 0.1582 | 0.0053 | 0.0436 | 0.008980 | 47.896 |
| 18:2 | 0.41 | 1.2e-05 | 1.9e-14 | 8,12E-10 | 55.68 |
| 18:3 | 0.2152 | 0.0003 | 0.0014 | 7,64E-02 | 97.943 |
| 18:4 | 0.3093 | 0.0016 | 5.7e-06 | 8.69e-06 | 23.307 |

Tabelle 4: p-Werte und Prüfgrößen für den Einfluss der Photonenflussdichte auf die Anteile der einzelnen Fettsäuren. Alle Werte < 0,05 sind rot hervorgehoben.

| Photonenfluss | 120 vs. 480 | 120 vs. 800 | 480 vs. 800 | Gesamt | Prüfgröße |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| 16:0 | 4.9e-06 | 0.0915 | 0.0035 | 1,39E-03 | 26.978 |
| 16:1 | 0.11 | 0.77 | 1.3e-07 | 4,09E-03 | 24.812 |
| 16:2 | 3.4e-06 | 0.0011 | 0.3155 | 0.0006424 | 17.202 |
| 16:3 | n. s. | n. s. | n. s. | 0.78621 | 0.2407 |
| 16:4 | 2.8e-08 | 7.3e-05 | 0.44 | 1,23E-05 | 193.985 |
| 18:0 | 6.4e-06 | 0.00064 | 0.42754 | 8,85E-03 | 23.271 |
| 18:1 | 0.5456 | 0.0092 | 0.0097 | 0.007145 | 50.259 |
| 18:2 | 7.8e-08 | 1.7e-06 | 0.091 | 0.002182 | 14.61 |
| 18:3 | 4.8e-05 | 0.2387 | 0.0078 | 7,09E-03 | 123.509 |
| 18:4 | 0.36 | 2.8e-13 | < 2e-16 | 2.2e-16 | 78.522 |

Anhang

Tabelle 5: p-Werte und Prüfgrößen für den Einfluss des Lichtspektrums auf die Anteile der einzelnen Fettsäuren. Alle Werte < 0,05 sind rot hervorgehoben.

| Farbe | g vs. b | b vs. r | g vs. r | b vs. w | g vs. w | r vs. w | Gesamt | Prüfgröße |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|-----------|
| 16:0 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,82 | 0,82 | 0,82 | 0.7099 | 13.815 |
| 16:1 | n. s. | 0.0629 | 73.008 |
| 16:2 | 0.8055 | 0.0029 | 0.0029 | 0.8055 | 0.8055 | 0.0016 | 0.0006424 | 17.202 |
| 16:3 | 0.426 | 0.014 | 0.094 | 0.952 | 0.462 | 0.016 | 0.03252 | 29.622 |
| 16:4 | 0.7214 | 0.0250 | 0.0095 | 0.7171 | 0.4723 | 0.0597 | 0.02219 | 32.509 |
| 18:0 | n. s. | 0.9227 | 0.48242 |
| 18:1 | 0.76 | 8.0e-07 | 1.8e-07 | 0.97 | 0.79 | 6.6e-07 | 1,43E-05 | 140.339 |
| 18:2 | 0.3786 | 0.0137 | 0.0044 | 0.6917 | 0.5884 | 0.0107 | 0.002182 | 14.61 |
| 18:3 | 0.975 | 0.025 | 0.027 | 0.992 | 0.967 | 0.025 | 0.03885 | 28.274 |
| 18:4 | n. s. | 0.4588 | 25.926 |