

Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Dipl.-Ing.

Kultivierung der Grünalge *Chlorella vulgaris* in Polyethen -
Photobioreaktoren und Produktion von stärkehaltiger
Algenbiomasse

eingereicht von

Clemens Troschl, Bakk. techn.

Durchgeführt am Institut für angewandte Mikrobiologie an der
Universität für Bodenkultur Wien

Betreut von

ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr. Peter Holubar

Wien, Juni 2013

DANKSAGUNG

Ich möchte an erster Stelle meinen Eltern danken. Durch ihre langjährige Unterstützung ermöglichten sie mir dieses Studium. Meine ganze Studienzeit wäre ohne sie nicht auf diese schöne Weise verlaufen.

Mein Dank gilt Professor Peter Holubar, der immer ein offenes Ohr hat und sich bei allen aufkommenden Problemen tatkräftig zeigte. Durch seine Neugier und seine Bereitschaft für Neues konnte dieses Projekt überhaupt gestartet werden. Auch die vielen Diskussionen über verschiedenste Themen werden mir in Erinnerung bleiben.

Zum Schluss möchte ich meiner lieben Freundin Anja danken. Sie konnte mich auch in schweren Zeiten immer wieder aufmuntern.

INHALTSVERZEICHNIS

Abstract	5
Zusammenfassung	6
1. Einleitung	7
1.1. Mikroalgen in der Biotechnologie	7
1.2. Kommerzielle Produkte aus Mikroalgen	8
1.3. Biodiesel	10
1.4. Stärke und ihre Verwendung	11
1.5. Stärke in Grünalgen	13
1.6. Plattformchemikalien	14
1.7. Photobioreaktoren	17
1.7.1. Offene Becken (Open Pond)	17
1.7.2. Röhrenreaktoren	18
1.7.3. Vertikale Säulenreaktoren	19
1.7.4. Flat-plate Photobioreaktoren	19
1.7.5. Intern beleuchtete Photobioreaktoren	19
2. Zielsetzung	20
3. Material und Methoden	21
3.1. Verwendete Stämme	21
3.1.1. Chlorella Vulgaris	21
3.1.2. Chlamydomonas Reinhardtii	22
3.2. Kulturmedien	23
3.2.1. Erddekot	23
3.2.2. Spurenelemente	24
3.2.3. ESP-Ag Medium (EPSAG Universität Göttingen)	24
3.2.4. Herstellung des Erddekots	24
3.2.5. Herstellung der Spurenelemente Lösung (EPSAG Universität Göttingen)	25
3.2.6. "Kuhl" Medium für einzellige Grünalgen (EPSAG Göttingen)	26
3.2.7. CT Medium	27
3.3. Kultivierung im Schüttelkolben	28
3.4. Bau des Glas Photobioreaktors	29
3.5. Bau des Polyethen Photobioreaktors	30
3.6. Biomasse Trockensubstanz (BTS) Bestimmung	36

3.7.	Optische Dichte - OD ₆₀₀ und OD ₆₈₀	36
3.8.	Zellzahl Bestimmung mittels Thomakammer.....	36
3.9.	Stärkenachweis	37
3.10.	Stärke Analytik	37
3.11.	Hydrolyse der Algen für die HPLC.....	38
3.12.	Messung der Glucose auf der HPLC.....	39
3.13.	Lyophilisierung	39
3.14.	Non-Purgeable Organic Carbon (NPOC) und Total Nitrogen (TN).....	40
3.15.	Qualitative Bestimmung der Fettsäuren mit GC-MS.....	41
4.	Ergebnisse.....	42
4.1.	Kultivierung im Schüttelkolben	42
4.2.	Kultivierung im Glas Photobioreaktor	44
4.3.	Fettsäuremuster einer stationären Chlorella Kultur	45
4.4.	Kultivierung in Schlauchreaktoren 1.Hauptversuch	46
4.5.	Versuch einer mixotrophen Kultivierung mit Glycerin	54
4.6.	Kultivierung in Schlauchreaktoren 2.Hauptversuch	54
4.7.	Absorptionsspektren verschiedener Chlorella Kulturen.....	59
5.	Diskussion	60
5.1.	Lichtversorgung der Algenkulturen.....	60
5.2.	CO ₂ Versorgung der Algenkulturen	62
5.3.	Hektarerträge von Mikroalgen	63
5.4.	Evaluierung des Polythen Low-Cost Photobioreaktor	64
5.5.	Stickstofflimitierung und Stärkeproduktion.....	67
5.6.	Handhabung von photoautotrophen Mikroorganismen.....	71
5.7.	Probleme der Analytik beim 2.Hauptversuch.....	72
5.8.	Mixotrophe Kultivierung von Chlorella	74
5.9.	Absorptionsspektren.....	75
6.	Schlussfolgerung	76
7.	Literatur	77
8.	Anhang	81

ABSTRACT

Starch is an important raw material with increasing demand. There are plenty of applications and about 38% are used for non-food processes. In the last years efforts were made to reduce human dependency from oil and to change to a green chemistry of future. To reach this goal platform chemicals made from renewable feedstocks are of particular interest. Polysaccharides like starch and cellulose are the most important renewable feedstocks.

The green algae *Chlorella vulgaris* is used by humans since decades. The annual biomass yield of algae per hectare can exceed that of conventional crops by at least tenfold. Algal culture has the additional advantages that arable land is not necessary, any open space will do like coast lines or arid zones.

In the present thesis several photobioreactors for algae cultivation were designed and build. The reactors were supplied with air containing 5% CO₂ and *Chlorella vulgaris* was cultivated succesfully. Only under certain conditions *Chlorella vulgaris* will produce starch. The control of the nitrogen concentration in the medium is crucial. When the nitrogen concentration sinks below 8 mg*L⁻¹, the algae starts producing starch. Beside starch also lipids are produced as storage compound. The maximum starch concentration measured was 9,7% of the algae biomass.

The biomass dry matter was always below 3 g*L⁻¹. Therefore several problems occurred and there was very little sample to analyze. Common methods for analyzing starch could not be used. A new method was developed to analyze starch after degrading to glucose on HPLC. With this method samples were measured successfully, although the method is still not very robust.

Today there are still no cultivating systems that allow cheap mass production of algae. They need to be big scale, robust and cheap to produce low price products like starch. Although there is a big potential, algae is currently not competitive with common ways to produce starch.

ZUSAMMENFASSUNG

Stärke ist ein wichtiger Grundstoff der Industrie mit wachsender Bedeutung. Die Anwendungsmöglichkeiten sind vielfältig und etwa 38% werden für Non-Food Zwecke verwendet. Mit den Anstrengungen auf eine grüne Chemie der Zukunft umzusteigen und die Abhängigkeit vom Erdöl zu mindern, werden sogenannte Plattformchemikalien aus erneuerbaren Rohstoffen immer wichtiger. Hier sind Polysaccharide wie eben Stärke und Cellulose als Ausgangsstoff von Bedeutung.

Die Grünalge *Chlorella vulgaris* wird seit Jahrzehnten vom Menschen genutzt. Sie zeigt gegenüber herkömmlichen Landpflanzen wie Mais oder Kartoffeln eine mindestens zehnfach so hohe Biomasse Produktivität. Außerdem lassen sich Mikroalgen an landwirtschaftlich uninteressanten Regionen wie Küsten und ariden Zonen kultivieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Photobioreaktoren für die Kultivierung von Grünalgen geplant und gebaut. Die Reaktoren wurden mit 5% CO₂ begast und es konnte *Chlorella vulgaris* erfolgreich kultiviert werden. Die Kontrolle des Stickstoffs im Medium ist grundlegend. Erst wenn der Stickstoff unter den Grenzwert von 8 mg*L⁻¹ fällt, beginnt die Grünalge mit der Bildung von Stärke. Neben Stärke werden als weiterer Speicherstoff Lipide gebildet. Als maximale Stärkekonzentration wurden 9,7% der Trockensubstanz gemessen.

Die Biomasse Trockensubstanz war immer unter 3 g*L⁻¹. Herkömmliche Messkits für Stärke konnten daher nicht verwendet werden. Es wurde eine Methode entwickelt, Stärke nach ihrer Spaltung in Glucose auf der HPLC zu messen. Mit dieser Methode konnten erfolgreich Messungen durchgeführt werden, auch wenn die Methode noch nicht sehr robust ist. Weiters wurde ein Medium entwickelt, welches sich durch einfach Handhabung durch Verwendung von Stammlösungen auszeichnet.

Um in Zukunft Grünalgen für die wirtschaftliche Produktion von Stärke nutzen zu können, müssen noch viele Hürden bewältigt werden. Vor allem fehlen heute noch geeignete Kultivierungssysteme für die Massenzucht von Algen. Es müssten großflächige, robuste und kostengünstige Systeme zur Verfügung stehen, um konkurrenzfähig zu Mais und Kartoffel mit Algen Stärke produzieren zu können.

1. EINLEITUNG

1.1. MIKROALGEN IN DER BIOTECHNOLOGIE

Mikroalgen sind prokaryotische oder eukaryotische, photosynthetisch aktive Mikroorganismen. Zu den Prokaryoten zählen etwa Cyanobakterien (*Cyanophyceae*). Wichtige Beispiele der Eukaryoten sind Grünalgen (*Chlorophyta*) und Diatome (*Bacillariophyta*) (Mata *et al.*, 2010) (Richmond, 2004).

Mikroalgen kommen weltweit sowohl in terrestrischen als auch in aquatischen Ökosystemen vor. Es gibt eine hohe Artenvielfalt und unterschiedlichste Standorte werden besiedelt. Geschätzte 50 000 Arten existieren von denen bis jetzt 30 000 bekannt sind. In den letzten Jahrzehnten wurden große Stammsammlungen angelegt und Forscher weltweit beschäftigen sich mit Mikroalgen. Beispiele für Stammsammlungen sind die Sammlung der Universität von Coimbra (Portugal) oder die Sammlung der Universität Göttingen (Deutschland).

Die erste bekannte Verwendung von Mikroalgen durch den Menschen geht 2000 Jahre zurück. In China wurde die essbare Grünalge *Nostoc* während Hungerperioden verzehrt. Die Entwicklung der Algenbiotechnologie begann aber erst Mitte des 20. Jahrhunderts. Mit dem Wachstum der Weltbevölkerung und Vorhersagen über unzureichende Eiweißversorgung in den 1950er Jahren wurden alternative Proteinquellen gesucht. Gleichzeitig begann die systematische Untersuchung von Algen nach biologisch aktiven Substanzen wie Antibiotika.

Die Grünalge *Chlorella* wurde ab den frühen 1960er Jahren im Industriemaßstab in Japan gezüchtet. 1980 waren im asiatischen Raum 46 Großanlagen mit einer Produktion von über 1000 kg pro Monat in Betrieb. In den darauf folgenden Jahren wurden weitere Algenarten für eine kommerzielle Verwendung kultiviert.

2005 produzierte der Mikroalgenmarkt etwa 5000 Tonnen Algentreckenmasse und machte einen geschätzten Umsatz von 1,25 Milliarden US\$. (Mata *et al.*, 2010)

1.2. KOMMERZIELLE PRODUKTE AUS MIKROALGEN

Mikroalgen können den Nährwert von herkömmlichen Lebensmittel und Futtermittel positiv beeinflussen. Sie haben einen hohen Proteingehalt mit allen essentiellen Aminosäuren. Der Fettgehalt variiert stark zwischen 1% und 70% der Trockensubstanz. Unter den Fettsäuren gibt es Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren, die von besonderem Interesse sind. Mikroalgen enthalten fast alle essentiellen Vitamine. Die Art und Menge des Vitamins hängt stark von der Algenspezies und den Kultivierungsbedingungen ab. Für die Humanernährung werden hauptsächlich 4 Arten kultiviert: *Arthrospira*, *Chlorella*, *D.Salina* und *Aphanizomenon flos-aquae* (Spolaore *et al.* 2006)

30% der weltweiten Algenproduktion wird für Tierfutter verkauft (Becker, 2004). Von der weltweiten Produktion von *Arthrospira* wird 50% als Tierfutter verwendet. In der Aquakultur wurden 1999 1000 Tonnen Mikroalgen verfüttert (Yamaguchi *et al.* 1997)

Arthrospira und *Chlorella* werden auch für kosmetische Zwecke verwendet. Der Algenextrakt wird in Produkten wie anti-aging Cremes verwendet. (Spolaore *et al.* 2006)

Höhere Pflanzen und Tiere sind nicht in der Lage, mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren. Fisch und Fischöl sind die wichtigste Quelle für mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Probleme sind hier die Anreicherung von Toxinen und der fischige Geruch. Pflanzliche Alternativen sind etwa Lein- und Hanföl. Mikroalgen sind in der Lage, Gamma-Linolensäure (GLA), Arachidonsäure (AA), Eicosapentensäure (EPA) und Docohexansäure (DHA) zu produzieren. Daher erlangen Mikroalgen zunehmendes Interesse für die Produktion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Besonders DHA aus Mikroalgen hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. (Spolaore *et al.* 2006)



Abbildung 1: Spirulina Algenfarm in Calipatria, Kalifornien, USA
(Quelle: http://www.intechopen.com/source/html/41642/media/image16_w.jpg, besucht am 16.08.2013, 14:02)



Abbildung 2: Chlorella Algenfarm in Klötze, Deutschland. Chlorella wird in dieser Anlage als Nahrungsergänzungsmittel produziert.
(Quelle: <http://www.umweltbundesamt.de/wasser/bilder/meere/mikroalgen2.jpg>, besucht am 16.08.2013, 14:12)



Abbildung 3: Spirulina Algenfarm von Cyanotech Corporation auf Hawaii, USA. Spirulina wird in dieser Anlage als Nahrungsergänzungsmittel produziert.
(Quelle: <http://www.cyanotech.com/images/facility.jpg>, besucht am 16.08.2013, 14:19)

1.3. BIODIESEL

In den letzten Jahren wurden intensive Anstrengungen unternommen, lipidreiche Mikroalgen in großem Maßstab für die Produktion von Biodiesel zu kultivieren. Im Vergleich mit anderen Ausgangsstoffen besitzen Mikroalgen Vorteile. Sie lassen sich einfach kultivieren, benötigen wenig Kontrolle und verwenden Wasser, welches vom Menschen nicht konsumiert werden kann wie Abwasser oder Salzwasser. Weiters verwenden sie CO_2 aus der Luft als Substrat, weshalb sie als umweltfreundliche Alternative angesehen werden. Es fehlen derzeit jedoch noch geeignete Kultivierungssysteme, sodass Biodiesel aus Mikroalgen nicht konkurrenzfähig ist und weiterhin Forschungsgebiet bleibt. (Li *et al.*, 2008)

1.4. STÄRKE UND IHRE VERWENDUNG

Stärke ist ein aus α -D-Glucose aufgebautes Polysaccharid und gehört damit zur Stoffgruppe der Kohlenhydrate. Sie besteht zu 20-30% aus Amylose und zu 70-80% aus Amylopektin. Amylose ist ein lineares Molekül aus α -1,4-glykosidisch verbundenen Glucose Einheiten. Sie ist kaum verzweigt und bildet helikale Strukturen aus. Je nach Herkunft der Amylose ist die Kettenlänge zwischen 100 - 1400 und die Molekülmasse damit zwischen $17000 - 22500 \text{ g mol}^{-1}$ (Tegge, 2004) (Belitz et al., 2007).

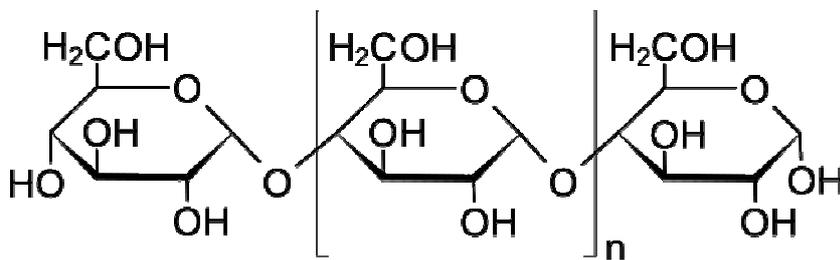


Abbildung 4: Amylose (Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Amylose>, besucht am 16.08.2013, 14:43)

Amylopektin ist ähnlich wie Amylose aufgebaut, jedoch stark verzweigt. Etwa alle 25 Glucose Einheiten kommt eine α -1,6-glykosidische Verzweigung. Somit bildet Amylopektin knäuelartige Strukturen aus. Angaben über die Molekülmasse des Amylopektins sind sehr unterschiedlich. TEGGE (2004) gibt die Molekülmasse mit $1\,000\,000 - 20\,000\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ an. Das entspricht etwa 6000 bis 11000 Glucose Einheiten.

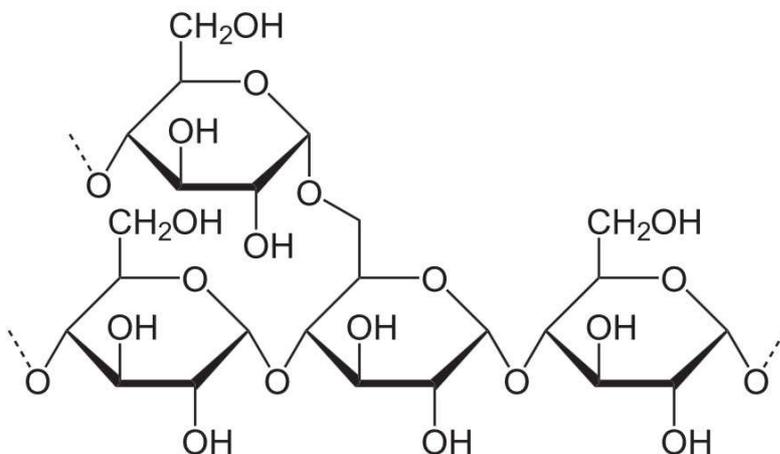


Abbildung 5: Amylopektin (Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Amylopektin>, besucht am 16.08.2013, 14:45)

Die europäische Stärkeindustrie hatte im Jahr 2010 eine Produktion von 10 Millionen Tonnen Stärke und verbuchte einen Umsatz von 7,7 Mrd. €. Weltweit wurden etwa 40 Millionen Tonnen Stärke produziert. 62% der Stärke werden von der Lebensmittelindustrie verwendet. Dabei wird Stärke zu verschiedensten Produkten verarbeitet. Stärke lässt sich modifizieren oder mit Enzymen zu Glucosesirup oder Dextrinen verzuckern. 38% der Stärke wird im Non-Food Bereich verwendet. 28% wird von der Papierindustrie verwertet. 10% wird von anderen chemischen Industrien verwertet, etwa als Substrat bei der Fermentation in der Biotechnologie. (FSI, 2012)

Stärke besitzt vielfältige technische Verwendungsmöglichkeiten. In der Papierindustrie wird Stärke bei der Masseleimung, Oberflächenleimung und Oberflächenveredlung verwendet. In der Textilindustrie wird es unter anderem als Schlichtemittel zur Glättung und Verstärkung des Kettfadens sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Webvorgang verwendet (Tegge, 2004).

Aus Stärke lassen sich auch Kunststoffe herstellen. Die 1988 erfundene thermoplastische Stärke (TPS) hat einen Marktanteil von 80% im Bereich der Biokunststoffe. TPS werden natürliche Weichmacher und Plastifizierungsmittel wie Sorbit und Glycerin beigegeben. TPS ist hydrophil und wäre dadurch als Kunststoff ungeeignet. Daher wird sie mit einer zweiten, hydrophoben Komponente versetzt. Diese zweite Phase ist meistens ein ebenfalls biologisch abbaubares Polymer wie Polyester, Polyesteramide, Polyesterurethane oder Polyvinylalkohol. Bei der weiteren Verarbeitung vermischen sich die beiden Phasen und ergeben einen wasserfesten Biokunststoff. Im Extrusionsverfahren lassen sich die verschiedenen Formteile herstellen. Die heiße Masse tritt dabei als Schaum aus und wird in Form gepresst. Stärkecompounds lassen sich auf klassischen Spritzgießanlagen verarbeiten und besitzen mit Polypropylen vergleichbare Eigenschaften (Dominghaus *et al.* 2008).

1.5. STÄRKE IN GRÜNALGEN

Die Speicherung von Glucose als Stärkekörner kann als letzter Schritt der Photosynthese gesehen werden. Die Umwandlung der Glucose in polymere Strukturen und die Bildung von Stärkekörnern ist ein komplexer Mechanismus. *Chlamydomonas Reinhardtii* ist Modellorganismus für die Erforschung der Stärkesynthese. Stärke wird normalerweise während der Lichtphase gebildet, um die Zelle in der Dunkelphase mit Glucose und Energie versorgen zu können. Diese Stärke wird transiente Stärke bezeichnet. Stärke, die unter Stickstoff limitierenden Bedingungen gebildet wird, unterscheidet sich jedoch strukturell und gleicht der Stärke, die im Endosperm von Getreidepflanzen gebildet wird (Ball, 1998). Es handelt sich um Speicherstärke. Es werden kristalline Stärkekörner gebildet, die etwa 1µm groß werden. Während Stickstofflimitierung kommt es zu einer grundlegenden Umstellung des Metabolismus. Wie in Abbildung 6 ersichtlich ist, ist *Chlamydomonas reinhardtii* bei Stickstofflimitierung mit Stärkekörnern und Lipiden gefüllt.

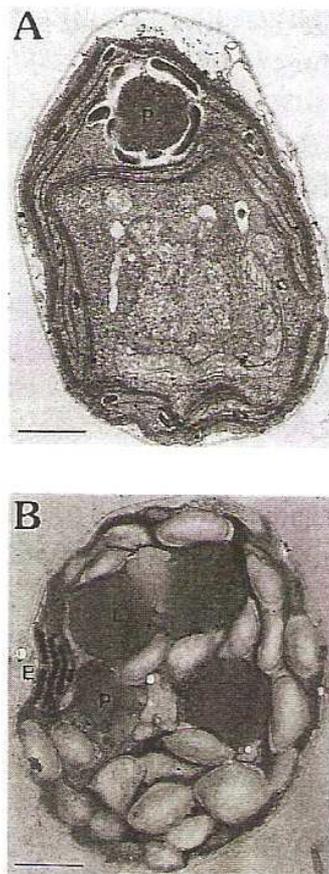


Abbildung 6: *Chlamydomonas Reinhardtii* unter normalen Wachstumsbedingungen (A). Das Pyrenoid P ist sichtbar sowie die Thylakoid Membranen. *Chlamydomonas Reinhardtii* unter Stickstoff limitierenden Bedingungen (B) ist gefüllt mit Stärkekörnern und Lipiden. (Quelle: Ball, 1998)

1.6. PLATTFORMCHEMIKALIEN

Plattformchemikalien sind chemisch einfach aufgebaute Substanzen, die als Ausgangsstoff für viele andere Substanzen verwendet werden. Solche Chemikalien werden in Großanlagen zu tausenden Tonnen im Jahr produziert. Bedeutende Plattformchemikalien sind etwa Ethen, Propen oder 1,2-Dichlorethan. Die Herstellung dieser Chemikalien erfolgt auf Basis von Erdöl. Um eine nachhaltige Industrie zu schaffen, werden Anstrengungen unternommen, Biomasse stofflich zu verwerten.

In der Natur wird jährlich die Biomasse von etwa 104,9 Petagramm ($1,049 \times 10^{17}$ g) Kohlenstoff gebildet. 75% davon sind Kohlenhydrate. Nur etwa 3-4% dieser Menge wird vom Menschen für Lebensmittel und Non-Food Zwecke genutzt (Field, 1998). Da Kohlenhydrate den überwiegenden Anteil ausmachen, werden sie als potentieller Ausgangsstoff für eine grüne Chemie der Zukunft gesehen. Darunter versteht man eine Industrie, die versucht auf nachhaltige Weise, umweltschonend und energieeffizient Konsumgüter sicherzustellen (Corma *et al.* 2007).

Stärke lässt sich durch das Enzym Amylase oder durch Säurehydrolyse in ihr Monomer, die Glucose, spalten. Im industriellen Maßstab wird Glucose durch enzymatische Hydrolyse von Maisstärke gewonnen. Die USA allein produziert etwa 200 Milliarden Tonnen Mais jährlich. Aus einer Tonne Mais lassen sich 590 kg Glucose gewinnen. Glucose lässt sich in eine Reihe von verschiedenen Plattformchemikalien umwandeln. Dies geschieht entweder durch Fermentation oder durch chemische Umwandlung der Glucose.

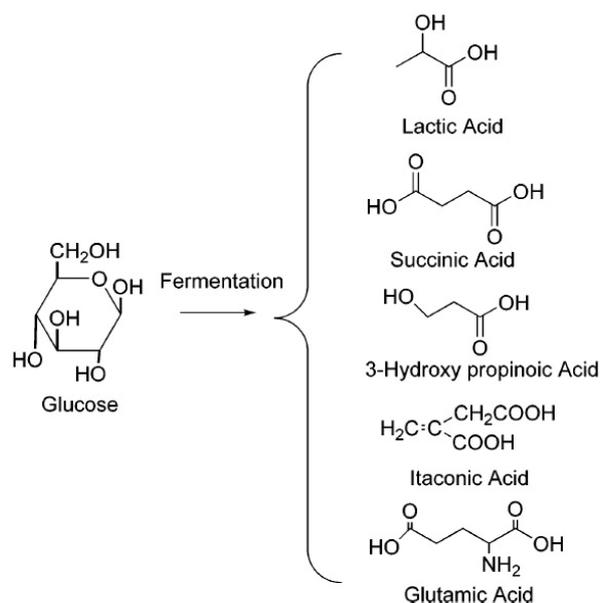


Abbildung 7: Plattformchemikalien aus Fermentation von Glucose (Quelle: Corma *et al.* 2007)

Einleitung

Durch thermische Dehydrierung mit Mineralsäuren entstehen aus Pentosen und Hexosen drei Plattformchemikalien, die nicht vom Erdöl abstammen. Diese sind Furfural, welches aus Pentosen entsteht sowie 5-Hydroxymethylfurfural und Lävulinsäure, welche aus Hexosen entstehen. Aus allen 3 Chemikalien können eine Vielzahl weiterer Chemikalien gewonnen werden, wie in folgenden Abbildungen ersichtlich ist.

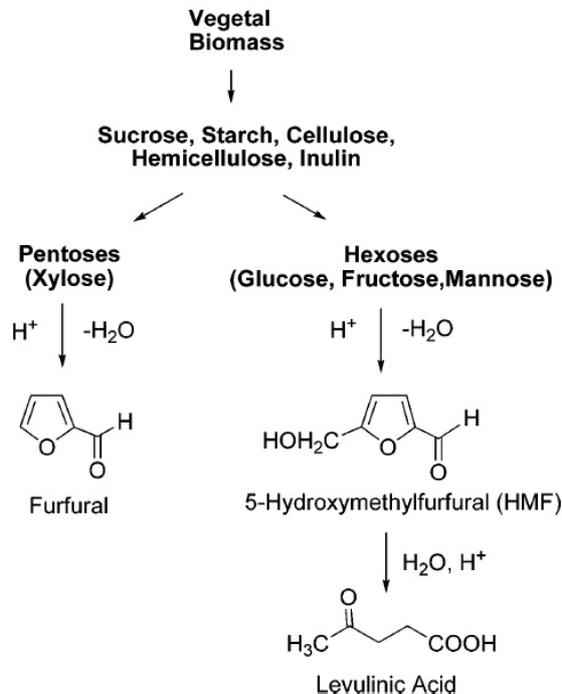


Abbildung 8: Thermische Dehydrierung von Pentosen und Hexosen. Es entstehen Furfural, 5-HMF und Lävulinsäure. Aus diesen Chemikalien können viele weitere Substanzen gewonnen werden. (Quelle: Corma *et al.* 2007)

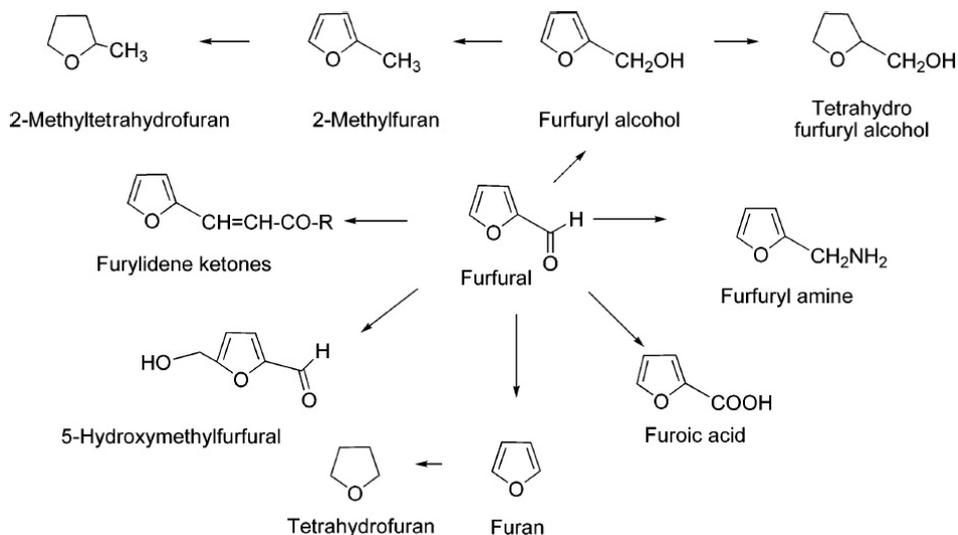


Abbildung 9: Furfural Plattform (Quelle: Corma *et al.* 2007)

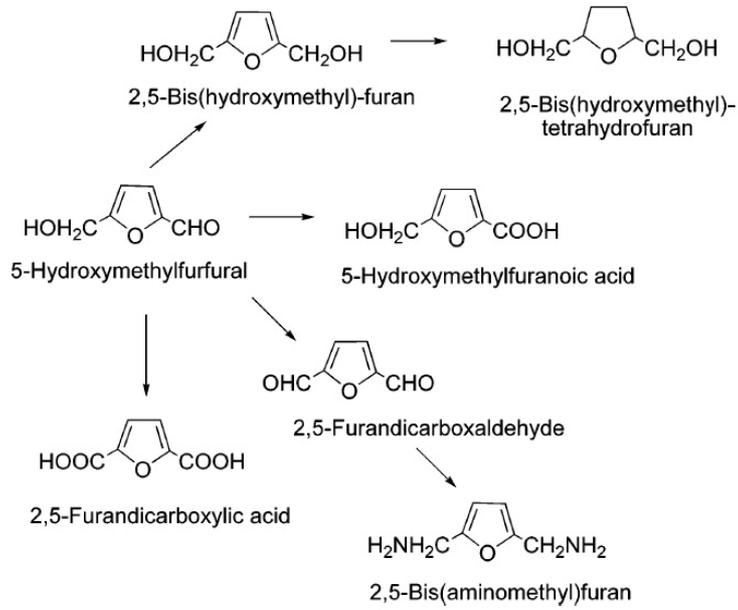


Abbildung 10: 5-Hydroxymethylfurfural Plattform (Quelle: Corma et al. 2007)

Lävulinsäure entsteht durch thermische Dehydrierung von Hexosen und wird als potentielle Plattformchemikalie gesehen (Corma et al. 2007)

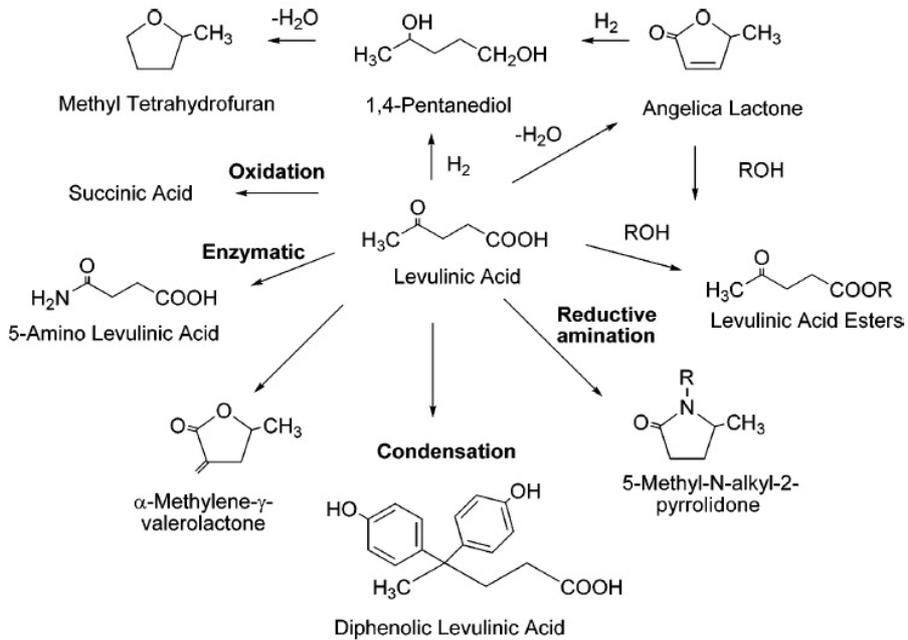


Abbildung 11: Lävulinsäure Plattform (Quelle: Corma et al. 2007)

1.7. PHOTOBIOREAKTOREN

Mikroalgen haben ein großes biotechnologisches Potential für die Produktion verschiedener Wertstoffe wie Tierfutter, Lebensmittel, Kosmetik und pharmazeutische Produkte. Für eine wirtschaftliche Nutzung der Mikroalgen ist das Design des Photobioreaktors von hoher Bedeutung. Ein PBR unterscheidet sich von anderen Bioreaktoren in erster Linie durch die Lichtdurchlässigkeit der verwendeten Materialien. Er muss möglichst viel Licht ins Medium leiten, wobei das Licht gleichmäßig verteilt sein sollte. Grundsätzlich ist das Produkt maßgebend für das Design eines PBR, insbesondere der Wert des Produkts gibt vor, wieviel die Produktion der Biomasse kosten darf. Soll in Zukunft mit einem PBR ein pharmakologisch relevantes Produkt, zB. ein Antikörper, mit einer gentechnisch veränderten Mikroalge produziert werden, rechtfertigt der hohe Wert des Produkts einen aufwändigen und teuren PBR. Dieser wird mit künstlichem Licht betrieben werden und die strengen Kriterien der guten Herstellungspraxis (GMP) einhalten müssen.

Bei den heutigen kommerziellen Anwendungen von Mikroalgen wird meistens im Freien unter Ausnutzung des Tageslichts kultiviert. Unterschieden wird zwischen offenen Becken, engl. "open ponds", und geschlossenen Systemen, den Photobioreaktoren (Pulz, 2001).

1.7.1. OFFENE BECKEN (OPEN POND)

An der Kultivierung von Algen in offenen Becken wurde bereits intensiv geforscht (Boussiba *et al.*, 1988; Tredici and Materassi, 1992; Hase *et al.*, 2000). Offene Becken ähneln dem natürlichen Milieu der Mikroalgen am meisten. Sie lassen sich kategorisieren in natürliche Gewässer wie Seen und Teiche und künstliche Becken. Am Verbreitetsten sind große künstliche Becken, die im Kreis verlaufen und an einer Stelle mit Schaufelrädern durchmischt werden. Sie sind seicht bei einer üblichen Wasserhöhe von 15-20 cm. Es können Biomassekonzentrationen von $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ erreicht werden bei einer Produktionsrate von $60\text{-}100\ \text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ bzw. $10\text{-}25\ \text{g}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{d})^{-1}$ (Pulz, 2001). Der Hauptvorteil dieser Becken ist, dass sie kostengünstig sind und sich einfach betreiben lassen. Demgegenüber stehen der schlechte Massentransfer, die hohe Verdunstungsrate und der Bedarf großer Flächen. Der größte Nachteil ist der geringe Lichteintrag durch die hohe Schichtdicke, welcher die Biomasseproduktion limitiert. Durch die offene Bauweise besteht ständige Kontaminationsgefahr, weshalb sich in offenen Becken nur gewisse Mikroalgen unter selektiven Bedingungen kultivieren lassen.

Offene Becken sind nach wie vor die am meisten genutzte Kultivierungsart. Produkte mit hohem Wert für pharmazeutische Anwendungen können aber kaum erzeugt werden und scheinen nur in geschlossenen Systemen möglich, die GMP gerecht geführt werden können (Ugwu *et al.*, 2008).

1.7.2. RÖHRENREAKTOREN

Zu den geeignetsten Systemen für die Kultivierung im Freien zählen Röhrenreaktoren. Sie werden gewöhnlich aus Plastik oder Glas konstruiert und das Medium wird im Kreis geführt. Anstatt einer Pumpe wird auch vorzugsweise ein Airlift System eingebaut. Röhrenreaktoren können in unterschiedlicher Anordnung geführt werden, etwa vertikal, horizontal, in Serpentina, schwach geneigt oder auch helikal (Acién Fernández *et al.*, 2003) (Pulz, 2001). Begasung und Durchmischung des Mediums wird gewöhnlich durch ein Luftpumpen- oder Airlift System durchgeführt.

Röhrenreaktoren zeichnen sich durch eine große Beleuchtungsfläche aus und sind daher gut für die Kultivierung im Freien geeignet. Demgegenüber steht ein schwacher Massentransfer. Besonders beim Scale-Up eines Röhrenreaktors muss die Abführung des Sauerstoffs beachtet werden. Röhrenreaktoren neigen auch zu Photoinhibierung (Torzillo *et al.*, 1986). Wenn ein Röhrenreaktor durch Erweiterung des Durchmessers vergrößert wird, sinkt das Oberflächen zu Volumen Verhältnis. Dadurch werden die Zellen im unteren Bereich abgeschattet und bekommen unzureichend Licht für ein Wachstum. Dieser Effekt kann aber durch ausreichende Durchmischung des Mediums wesentlich abgeschwächt werden (Ugwu *et al.*, 2005). Es zeigt sich außerdem, dass eine Temperaturregelung bei Röhrenreaktoren schwierig ist. Sie lassen sich mit Thermostaten bestücken, doch ist dies teuer und aufwändig. Werden Röhrenreaktoren über einen längeren Zeitraum betrieben, kommt es zu Adhäsion von Zellen an der Außenwand, welche zunehmend zu Abschattung führen. Lange Röhren weisen einen O₂ und CO₂ Gradienten entlang der Röhre auf, welcher sich nachteilig auf das Wachstum auswirkt (Rubio *et al.*, 1999).

1.7.3. VERTIKALE SÄULENREAKTOREN

Verschiedene Designs vertikaler Säulenreaktoren wurden in den letzten Jahren beschrieben (Choiet al., 2003; Vega-Estrada et al., 2005; García-Malea López et al., 2006; Kaewpintong et al., 2007). Sie sind kompakt, kostengünstig, einfach zu handhaben und scheinen vielversprechend für die Massenkultivierung von Algen. SÁNCHEZ MIRÓN et al. haben gezeigt, dass Mikroalgen in begasten Säulenreaktoren bis 0,19 m Durchmesser eine Biomassekonzentration und eine spez. Wachstumsrate erreichen, die vergleichbar sind mit Werten von schmalen Röhrenreaktoren. Die Durchmischung erfolgt meist durch Begasung, welche auch eine große Gasaustauschfläche bietet. Nachteilig wirken sich die Energiekosten für die Kompression der Luft für die Begasung aus (Ugwu *et al.*, 2008).

1.7.4. FLAT-PLATE PHOTOBIOREAKTOREN

Flat-Plate Photobioreaktoren haben Aufmerksamkeit erlangt, da sie photosynthetisch aktiven Mikroorganismen eine sehr große Beleuchtungsfläche bieten. Das Licht wird fein verteilt und durchstrahlt den Reaktor gleichmäßig. Die ersten Flat-Plate Reaktoren wurden 1985 entwickelt. Ein Jahr später ging eine Anlage aus transparentem PVC in Betrieb. Verglichen mit horizontalen Röhrenreaktoren akkumulieren sie kaum Sauerstoff. Die photosynthetische Effizienz ist hoch (Richmond, 2004). Flat-Plate Reaktoren eignen sich für die Massenkultivierung von Algen, jedoch haben sie auch Nachteile wie den schwierigen Scale-Up und verbreitetes Wachstum an den Außenwänden, das zu Bildung eines Biofilms führt und den Lichteintrag mindert. Die österreichische Firma Ecoduna mit Sitz in Bruck an der Leitha baut seit 2008 Flat-Plate Reaktoren. (Hu *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2002; Hoekema *et al.*, 2002).

1.7.5. INTERN BELEUCHTETE PHOTOBIOREAKTOREN

PBRs lassen sich auch mit Lampen ausstatten, die sich direkt im Medium befinden. Daneben sind auch Rührer, Luft und CO₂ Versorgung im Reaktor untergebracht. Solche Reaktoren lassen sich auch so gestalten, dass neben dem künstlichen Licht auch Sonnenlicht genutzt wird (Ogbonna *et al.*, 1999).

In diesem Fall wird künstliches Licht erst dann zugeschaltet, wenn die Intensität des Sonnenlichts bei Wolken oder Dämmerung unter einen gewissen Wert fällt. Es wurden auch Reaktoren gebaut, die mit Hilfe von Glasfasern Sonnenlicht sammeln und im Reaktor verteilen. Ein großer Vorteil dieser Bauweise ist, dass sich die Reaktoren autoklavieren lassen und so Kontaminationen auf einem Minimum gehalten werden.

2. ZIELSETZUNG

In dieser Arbeit soll aufgezeigt werden, wie Grünalgen in einem Labor mit einfachen Mitteln kultiviert werden können. Für die Kultivierung wird eine Pilotanlage mit PE-Schlauchfolien gebaut. Diese bieten die Möglichkeit, kostengünstig große Volumina an Kulturmedium zu nutzen. Die Mikroalgen werden mit Leuchtstoffröhren beleuchtet und mit Druckluft und optional 5% CO₂ begast. Die Begasung sorgt gleichzeitig für eine ständige Durchmischung des Mediums.

Stärke ist ein nachhaltiger Naturstoff mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten. Aus Stärke können einige Plattformchemikalien gewonnen werden, die als Vorläufersubstanz einer Vielzahl weiter Chemikalien dienen. Aus diesem Grund soll stärkehaltige Algenbiomasse produziert und eine alternative Stärkeproduktion mit Algen diskutiert werden.

Strategien zur Kultivierung und Erhaltung der Stämme werden untersucht. Mikroalgen stellen bei Stickstoffmangel ihren Stoffwechsel um. Dabei werden Speicherstoffe wie Fette und Stärke produziert. In dieser Arbeit wird die Kultivierung so optimiert, dass möglichst viel Stärke produziert wird. Dafür ist die ständige Kontrolle der Stickstoffkonzentration im Medium von hoher Bedeutung. Weiters wird die Biomasse Trockensubstanz und die Stärkekonzentration gemessen. Für die Analytik der Stärke muss ein neuer, alternativer Ansatz entwickelt werden, da für die herkömmliche, enzymatische Bestimmung zu wenig Biomasse vorhanden ist. In dieser Arbeit wird eine quantitative Bestimmung von Stärke über die Messung von Glucose auf einer HPLC durchgeführt.

Es wird untersucht, ob sich Algen in einem kostengünstigen Reaktorsystem zu solchen Zelldichten kultivieren lassen, dass eine industrielle Stärkeproduktion ökonomisch sinnvoll wäre.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. VERWENDETE STÄMME

3.1.1. CHLORELLA VULGARIS

Der *Chlorella vulgaris* Stamm SAG 211-11b wurde bei der Abteilung Experimentelle Phykologie und Sammlung von Algenkulturen (EPSAG) der Universität Göttingen bestellt. Es handelt sich um den ältesten Stamm der Stammsammlung, welcher im Jahr 1889 von M. W. Beijerinck bei einem Teich in der Nähe von Delft, Niederlande, isoliert wurde.

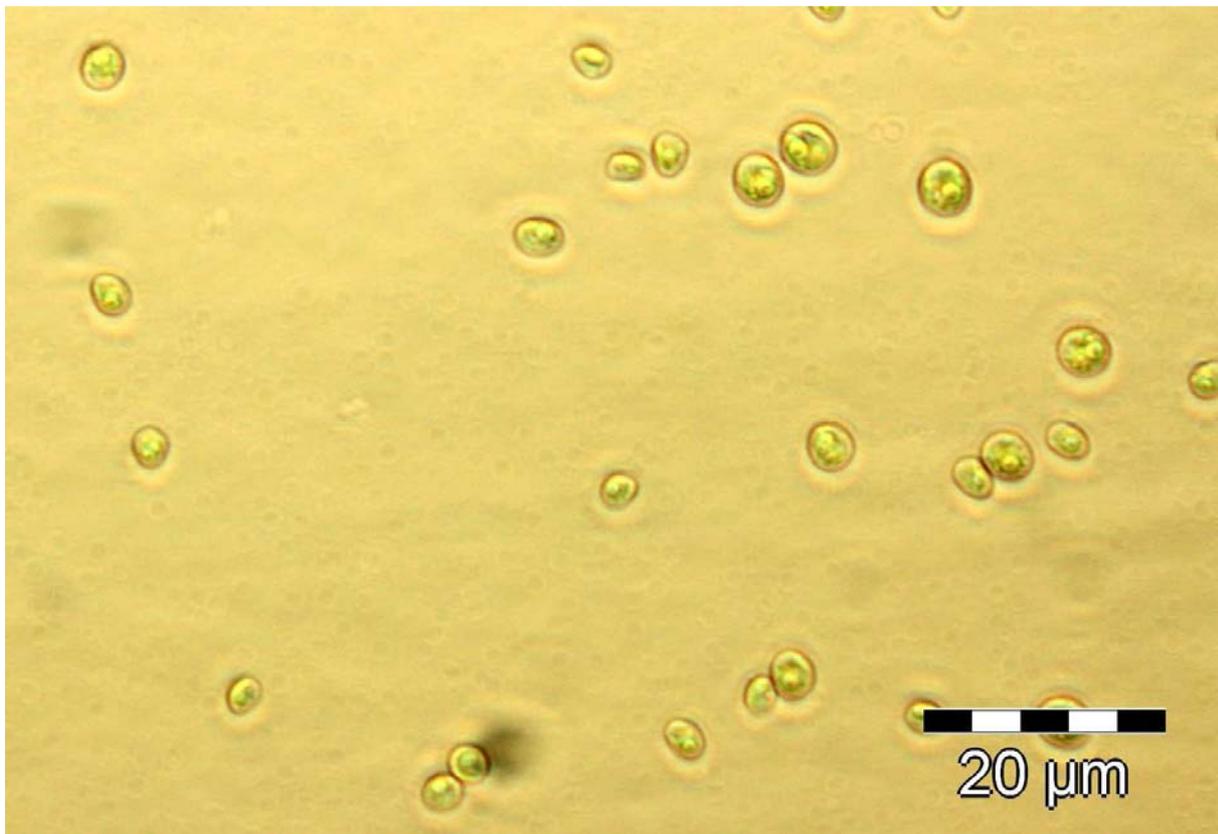


Abbildung 12: *Chlorella vulgaris* (Quelle: Eigene Fotografie)

3.1.2. CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

Der *Chlamydomonas reinhardtii* Stamm SAG 81.72 wurde bei der EPSAG der Universität Göttingen bestellt. Der Stamm wurde 1967 in einem Sumpf im Naturschutzgebiet Hartertse Venen, Niederlande, von H.W.Kroes isoliert. Er ist im Gegensatz zu *Chlorella* begeißelt.

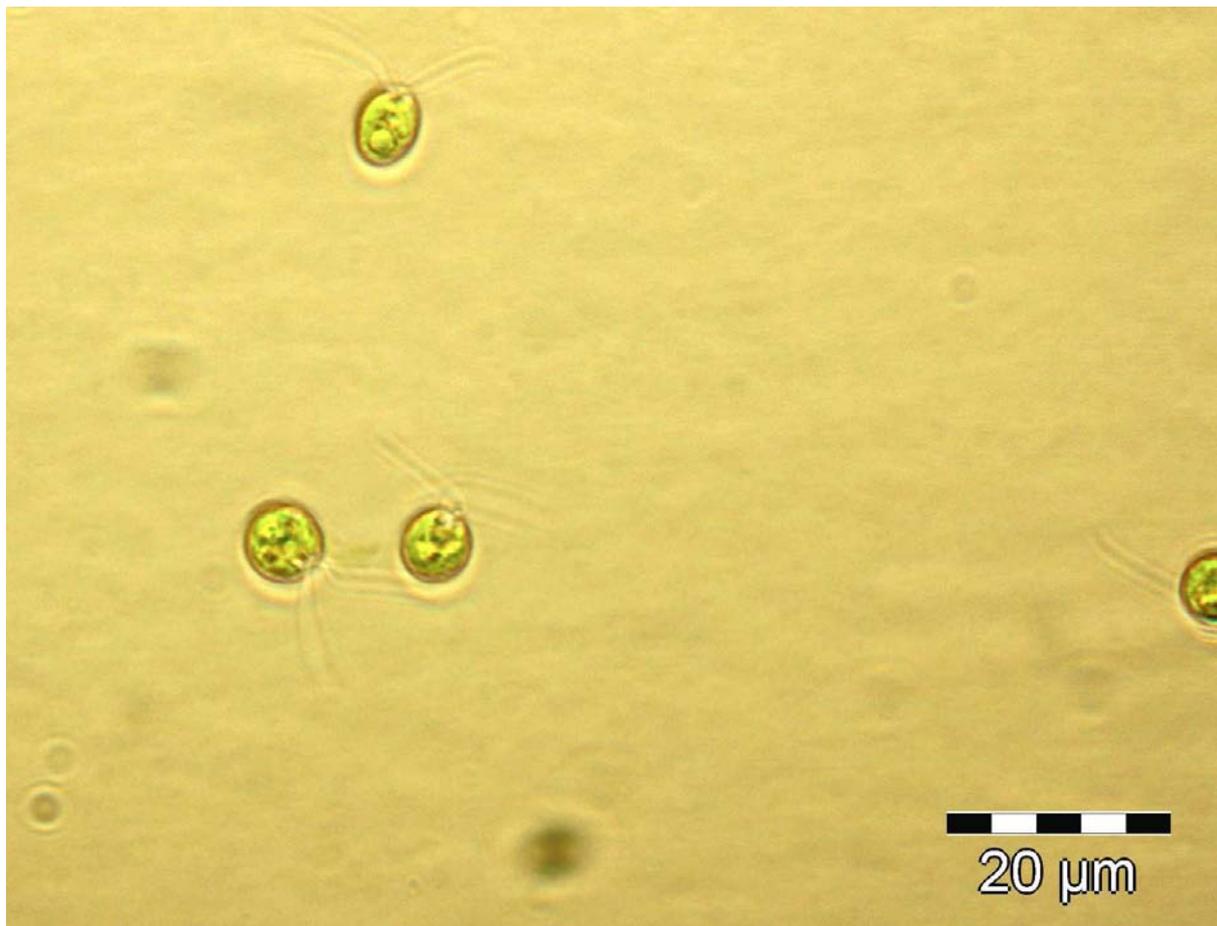


Abbildung 13: *Chlamydomonas reinhardtii* (Quelle: Eigene Fotografie)

3.2. KULTURMEDIEN

Grundsätzlich lassen sich Kulturmedien in Medien mit und ohne Kohlenstoffquelle unterscheiden. Der Hauptunterschied in der Praxis ist, dass Medien ohne Kohlenstoffquelle keine aseptische Arbeitsweise erfordern, denn bei geeignetem Inokulum mit Grünalgen ist kein Überwachsen durch andere Mikroorganismen zu erwarten. Photobioreaktoren, die steril kultiviert werden können, sind wesentlich komplexer aufgebaut und müssen auch autoklavierbar sein. Das verlangt spezielle Materialeigenschaften wie Hitzebeständigkeit und Druckfestigkeit. Weiters sind auch sicherheitstechnische Aspekte von Bedeutung. Die angegebenen Medien mit Kohlenstoffquelle wurden nur in Schüttelkolben kultiviert, da kein autoklavierbarer Photobioreaktor zu Verfügung stand.

Da Grünalgen verhältnismäßig geringe Zellkonzentrationen von etwa $1-5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ aufweisen, sind große Volumina notwendig, um viel Biomasse erzeugen zu können. Im Verlauf dieser Arbeit wurden Kulturmedien entwickelt, die als 1:100 Vorratslösungen hergestellt und gelagert werden können. Diese Lösungen ermöglichen eine schnelle und einfache Herstellung von Kulturmedien durch Verdünnen. Auch die Herstellung großer Volumina ist problemlos möglich. Der Arbeitsschritt des Einwiegens fällt nur einmalig an. An dieser Stelle wird die Verwendung des CT Mediums mit 1:100 Stammlösungen für die nicht-sterile Kultivierung empfohlen.

3.2.1. ERDDEKOKT

Manche Medien enthalten sogenannten "Erddekot". Dabei handelt es sich um einen wässrigen Auszug aus bestimmten Erden, der verwendet wird, wenn die genauen Erfordernisse des Mikroorganismus unbekannt sind oder nicht bedeutend sind. Mit Hilfe des Erddekots erhält man eine komplexe Zusammensetzung, die jedoch unbekannt ist. Die erfolgreiche Herstellung des Erddekots ist maßgeblich abhängig von der ausgewählten Erde. Empfohlen wird ungedüngte Gartenerde, die keinen Spritzmitteln ausgesetzt wurde. Nicht geeignet sind lehmige Erden oder sumpfige Gebiete (Andersen, 2005).

3.2.2. SPURENELEMENTE

Spurenelementlösungen enthalten meist die Elemente Eisen, Mangan, Zink, Kupfer, Kobalt, Molybdän. Den Lösungen wird EDTA zugesetzt, das etwa Eisenionen durch Chelatbildung in Lösung hält, welche sonst ausfallen würden. Eisen kann zum limitierenden Faktor in Algenkulturen werden und spielt eine Schlüsselrolle im Stoffwechsel der Organismen. Nitrat- und Nitritreduktasen etwa benötigen Eisen (Pirt, 1977).

3.2.3. ESP-AG MEDIUM (EPSAG UNIVERSITÄT GÖTTINGEN)

Tabelle 1: ESP-Ag Medium der Universität Göttingen

Substanz	Formel	Menge	Einheit
Kaliumnitrat	KNO_3	0,2	g
Dikaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	0,02	g
Magnesiumsulfat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,02	g
Spurenelemente Lösung		5	mL
Erddekot		30	mL

Mit Wasser auffüllen auf Gesamtvolumen : 1L

Für die Herstellung des ESP-Basalmediums werden 0,1% Protease-Pepton hinzugefügt. Die Medien lassen sich mit 1,5% Agar verfestigen.

3.2.4. HERSTELLUNG DES ERDDEKOKTS

Eine 6 Liter Flasche wird zu ein Drittel mit geeigneter Erde gefüllt. Für den Erddekot in dieser Arbeit wurde Erde aus einer Grünanlage beim Wiener Donaukanal entnommen. Die Flasche wird mit Wasser bis 5 cm über der Erde gefüllt und gut gemischt. Um die komplexen Substanzen in der Erde nicht zu zerstören wird im strömendem Dampf fraktioniert sterilisiert.

3.2.5. HERSTELLUNG DER SPURENELEMENTE LÖSUNG (EPSAG UNIVERSITÄT GÖTTINGEN)

Für die Herstellung der Spurenelemente Lösung nach EPSAG werden zuerst Stammlösungen der einzelnen Salze hergestellt und davon dann das angegebene Volumen hinzugefügt.

Tabelle 2: Spurenelemente Lösung (EPSAG Göttingen)

Substanz	Formel	Stammlösung [g*L⁻¹]	Menge	Einheit
Zinksulfat	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	1	1	mL
Mangansulfat	MnSO ₄ * 4 H ₂ O	1	2	mL
Borsäure	H ₃ BO ₃	2	5	mL
Cobaltchlorid	CoCl ₂ * 2 H ₂ O	0,2	5	mL
Natriummolybdat	Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,2	5	mL
Kupfersulfat	CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,005	1	mL
Wasser	H ₂ O		981	mL
Eisensulfat	FeSO ₄ * 7 H ₂ O		0,7	g
Na ₂ EDTA	Na ₂ C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈		0,8	g

Die Komponenten werden in 2 Lösungen getrennt autoklaviert.

Lösung 1: 881 mL H₂O + Stammlösungen ohne FeSO₄ + 0,4 g EDTA

Lösung 2: 100 mL H₂O + 0,7 g FeSO₄ + 0,4 g EDTA

3.2.6. "KUHLE" MEDIUM FÜR EINZELLIGE GRÜNALGEN (EPSAG GÖTTINGEN)

Tabelle 3: "Kuhl" Medium für einzellige Grünalgen

Substanz	Formel	Menge	Einheit
Kaliumnitrat	KNO_3	1011,1	mg
Natriumdihydrogenphosphat	NaH_2PO_4	621	mg
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	89	mg
Magnesiumsulfat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	20	mg
Calciumchlorid	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	14,7	mg
Eisensulfat - EDTA	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	6,95	mg
Borsäure	H_3BO_3	0,061	mg
Mangansulfat	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,169	mg
Zinksulfat	ZnSO_4	0,287	mg
Kupfersulfat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,00249	mg
Ammoniummolybdat	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	30	mL

Mit Wasser auffüllen auf Gesamtvolumen : 1L

3.2.7. CT MEDIUM

Mit den folgend beschriebenen Stammlösungen lassen sich einfach und schnell große Mengen an Algenmedium herstellen.

Das CT Algenmedium besteht aus der Spurenelemente Lösung, der Phosphat Lösung und der Calcium- und Magnesiumlösung, die allesamt 1:100 verdünnt werden. Dem Medium muss noch eine Stickstoffquelle hinzugefügt werden, wobei Kaliumnitrat verwendet wird. Eine Konzentration von $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$ ist gut geeignet.

Für die Herstellung der Spurenelemente Lösung wird zuerst 0,5 L Wasser vorgelegt. Die Salze nach Tabelle 4 werden eingewogen und einzeln hinzugegeben. Auf einem Magnetrührer wird die Lösung mit NaOH auf $\text{pH} = 7,2$ gestellt und auf einen Liter aufgefüllt. Dann wird eine Stunde bei ca. 80°C gerührt. Die entstandene Lösung ist tiefrot und klar.

Tabelle 4: Spurenelemente Stammlösung 1:100

Substanz	Formel	Menge	Einheit
Eisenchlorid	$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	4	g
EDTA Natriumsalz	$\text{Na}_2 \text{ C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	15	g
Mangansulfat	$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,01	g
Borsäure	H_3BO_3	0,01	g
Natriummolybdat	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,01	g
Kupfersulfat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,01	g
Zinksulfat	ZnSO_4	0,01	g

Phosphat Stammlösung 1:100

Es werden 47,6 g (0,4 Mol) Natriumdihydrogenphosphat NaH_2PO_4 eingewogen und in einem Liter Wasser gelöst.

Calcium- und Magnesium Stammlösung 1:100

Es werden 2,94 g (0,02 Mol) Calciumchlorid $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ und 20,3 g (0,1 Mol) Magnesiumchlorid $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ eingewogen und in einem Liter Wasser gelöst.

Herstellung von 10 L CT-Algenmedium

5 L RO-Wasser werden in einem 10 L Gefäß vorgelegt. Dann werden je 100 mL Spurenelemente Stammlösung, Phosphat Stammlösung und Calcium- und Magnesiumstammlösung hinzugefügt. Für eine KNO_3 Konzentration von 1 gL^{-1} werden 10g KNO_3 hinzugefügt. Dann wird das Gefäß auf 10 L aufgefüllt und gut gemischt.

3.3. KULTIVIERUNG IM SCHÜTTELKOLBEN

Die Mikroalgen wurden in Schrägagarröhrchen von der Stammsammlung erhalten. Zur weiteren Kultivierung hat sich folgende Vorgehensweise bewährt.

Material

- 300 mL Schüttelkolben mit Schikanen, mit Watte verschlossen (steril)
- 100 mL ESP-AG Medium (steril)
- Kulturröhrchen
- Laminar Flow Werkbank
- Pipetten und Spitzen (steril)
- Impföse
- Ethanol 70 % (w/w)
- Handschuhe
- Orbital shaker Thermo Scientific MaxQ 3000
- Beleuchtung
- Brutraum mit $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$

Alle Schritte werden in der Laminar Flow Werkbank durchgeführt. Die Werkbank wird mit Ethanol 70 % (v/v) gereinigt und Handschuhe werden getragen.

100 mL ESP-AG Medium werden in einen 300 mL Schüttelkolben mit Schikanen überführt. Mit einer Impföse wird ein bewachsenes, grünes Stückchen Kultur aus dem Schrägagarröhrchen entnommen und in den Schüttelkolben überführt. Der Schüttelkolben wird wieder mit dem Wattestopfen verschlossen und auf einen Orbital Schüttler gestellt, welcher mit 4 Neonröhren im Abstand von 70 cm beleuchtet wird. Der Schüttler befindet sich in einem 25°C Brutraum. Die Drehzahl wird auf 130 Umdrehungen pro Minute eingestellt.

3.4. BAU DES GLAS PHOTOBIOREAKTORS

Grundsätzlich eignet sich jedes transparente Gefäß, welches man mit Medium befüllen kann und mit einer Begasung versehen kann, als Photobioreaktor. Für den ersten Photobioreaktor wird ein Glastubus mit Durchmesser = 8cm und Länge = 50cm verwendet. In den unteren Gummistopfen werden 2 Löcher gebohrt, eines für den Gasanschluss und eines für das Auslassventil. Der obere Gummistopfen wird soweit wie möglich aufgebohrt, damit die einströmende Luft entweichen kann. Verschluss werden die Stopfen mit 2 Teflonringen und 3 Gewindestangen, die mit Muttern verschraubt werden. Die Beleuchtung wird seitlich angebracht und besteht aus 4 Leuchtstoffröhren. Begasung wird mit einer Minipumpe für Aquarien mit einer Druckleistung von 0,2 bar. Der Durchfluss wird nicht geregelt und ergibt sich aus der Pumpleistung.



Abbildung 14: Glas Photobioreaktor

3.5. BAU DES POLYETHEN PHOTOBIOREAKTORS

Die Zielsetzung war, einen Photobioreaktor zu bauen, der möglichst kostengünstig ist und sich einfach upscalen lässt. Die Entscheidung fiel auf Schlauchfolien aus Polyethylen, welche für Verpackungszwecke verwendet werden. Sie sind weit verbreitet, kostengünstig und ausreichend transparent. Das bestellte Polyethylen ist zwar nicht dauerhaft UV stabil, doch wäre dieses Problem einfach zu lösen. Es gibt am Markt auch UV stabile Kunststoffmischungen auf PE Basis. Man kann bei einem ausgereiften Photobioreaktor auch Polyfluoride verwenden, die extrem resistent sind. Hier kämen aber auch Umweltprobleme auf, da Polyfluoride nicht abbaubar sind. Bei der Zersetzung von Polyfluoriden würde die hochgiftige Flusssäure entstehen.

Die Schlauchfolie wurde bei der Firma dm-folien GmbH (<http://www.dm-folien.com/>) bestellt. Es handelte sich um eine Schlauchfolie mit einer Breite von 8 cm und einer Stärke von 100µm. Das entspricht einem Durchmesser von 5,09 cm. Hier gilt es, einen Kompromiss zwischen großem Volumen und großem Lichteintrag zu finden. Je dicker der Schlauch, umso mehr Algen können kultiviert werden, jedoch bei weniger Lichteintrag und geringerer Wachstumsrate.

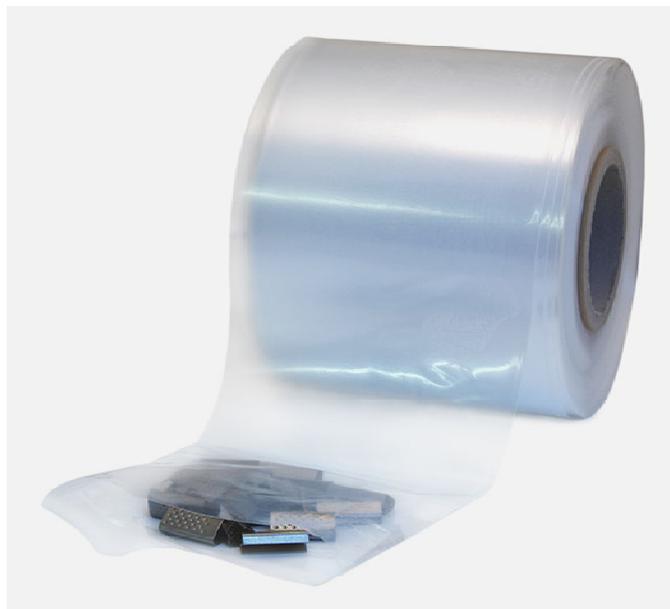


Abbildung 15: Schlauchfolie aus Polyethylen für Verpackungszwecke (Quelle: <http://www.allpax.de/>, besucht 20.08.2013 10:51)

Die Schläuche werden auf 2 m Länge geschnitten und am oberen Ende an ein Holzbrett, welches mit Löchern versehen ist, montiert. Dies geschieht mit Hilfe eines Handtackers. Es werden 8 - 10 Klammern getackert. Damit kann das Gewicht des gefüllten Schlauchs, welches etwa 2,5 kg beträgt, ausreichend gesichert werden.



Abbildung 16: Photobioreaktor im Testlauf ohne Algen. Gut sichtbar sind die aufsteigenden Gasblasen.

Am unteren Ende des Schlauchs müssen Gaszufuhr und Ablassventil versehen werden. Dies gestaltet sich äußerst schwierig, da sich die dünnen Schläuche nur schwer abdichten lassen. Es werden mehrere Varianten getestet, die alle zu keinem Erfolg führten. Teilweise sind sie zwar anfangs dicht, werden jedoch nach Tagen leak. Die Kultivierung der Algen dauert mehrere Wochen, daher ist dauerhafte vollständige Dichtheit wichtig. Während des 1. Hauptversuchs wurden 2 Reaktoren undicht und konnten nicht mehr ausgewertet werden. Um dies zu vermeiden und Dichtheit sicherzustellen werden die Schläuche für den 2. Hauptversuch am unteren Ende verschweißt. Nur durch diese Variante sind die Reaktoren vollständig dicht. Das Gas wird durch einen Schlauch von oben zugeführt und mit einer Fritte in feine Bläschen

dispergiert. Proben werden mit Hilfe einer 100 mL Spritze und eines langen Schlauchs entnommen. Mit Hilfe eines langen Schlauchs kann der Reaktor auch abgelassen werden, jedoch verbleiben einige wenige mL im Reaktor.



Abbildung 17: Das untere Ende der Schlauchreaktoren wird verschweißt. Am Ende des Gasschlauchs befindet sich eine Gasfritte.

Für die Begasung wird Druckluft verwendet, die mit 5% CO₂ angereichert wird. Der Druckluft Schlauch führt durch einen Aktivkohlefilter, weil die Druckluft Reste von Kohlenwasserstoffen enthält, die das Wachstum der Algen beeinträchtigen könnte. Der Aktivkohlefilter besteht aus einem 20cm langen Glasrohr, welches an beiden Enden ein Gewinde besitzt. An die Stöpsel lässt sich der Gasschlauch anschließen. Das Glasrohr wird zuerst mit etwas Watte gefüllt, damit die Kohlepartikel zurückgehalten werden. Anschließend wird das Glasrohr mit Aktivkohle und wieder etwas Watte gefüllt. Der Aktivkohlefilter wird in Abbildung 18 gezeigt.



Abbildung 18: Der Aktivkohlefilter dient der Reinigung der Druckluft, in der unerwünschte Substanzen wie Kohlenwasserstoffe aus dem Kompressor enthalten sein können.

Das CO₂ wird durch eine Gasflasche bereitgestellt. Sowohl CO₂ als auch die Druckluftzufuhr können mit einem Durchflussregler geregelt werden. Die beiden Gasschläuche werden mit einem T-Stück verbunden und in eine 2 L Flasche geleitet, welche mit Wasser gefüllt ist. Diese Flasche hat die Aufgabe, die beiden Gase zu mischen und zu befeuchten. Die Druckluft ist sehr trocken und führt zu großem Volumensverlust im Reaktor. Durch vorheriges Befeuchten in der Mischflasche kann dieser Effekt wesentlich reduziert werden. Aus sicherheitstechnischen Gründen wird ein metallener Berstschutz um die Flasche gestellt. Der Berstschutz fängt im Falle einer Explosion der Flasche umherfliegende Glassplitter ab. Um eine Explosion zu vermeiden, muss darauf geachtet werden, dass die Flasche keinem hohen Druck ausgesetzt wird. Das kann passieren, wenn etwa der Austrittsschlauch zugeklemmt wird.



Abbildung 19: Mischflasche mit Berstschutz. Die Mischflasche, in dieser Abbildung leer, wird zur Befeuchtung mit Wasser befüllt.

Nach dem Austritt des Gasgemisches muss das Gas auf alle Einzelreaktoren (Schläuche) aufgeteilt werden. Dafür wird oberhalb der Reaktoren ein Polypropylen Abwasserrohr angebracht. Das Rohr wird mit kleinen Löchern versehen, an denen Stutzen für Gasschläuche montiert werden können. Somit steht das ganze Rohr unter Druck, weshalb auch der Abschlussstopfen gesichert werden muss. Es zeigt sich, dass bereits minimale Unterschiede in der Füllhöhe der Reaktoren zu großen Unterschieden in der Begasung führen. Ein Unterschied von 1 cm entspricht einem Druckunterschied von 1 mBar. Wenn ein Reaktor etwa um 5 cm niedriger befüllt ist, ist der Gegendruck 5 mBar geringer. Das führt zu einer wesentlich stärkeren Begasung. Daher werden an alle Gasschläuche kleine Schlauchklemmen montiert, mit denen der Durchfluss grob geregelt werden kann. Weiteren Einfluss hat das Material des Gasschlauchs. Es sollten alle Gasschläuche aus demselben Material bestehen. Kleine Unterschiede in der Länge der Gasschläuche haben hingegen kaum Einfluss.



Abbildung 20: Gasverteilungssystem. An der Unterseite des PP-Rohres sind Gasstutzen montiert. Von diesen führen die Gasschläuche zu den einzelnen Schlauchreaktoren.

Im Betrieb muss beachtet werden, dass die Schläuche nicht zu hoch gefüllt werden. Sobald die Begasung eingeschaltet wird, steigt die Wassersäule um etwa 10 %. Dies kann zu einem Überlaufen der Reaktoren führen.

Für die Beleuchtung werden hinter den Schläuchen Neonröhren angebracht. 8 Neonröhren sorgen für eine starke Beleuchtung. 4 Neonröhren lassen sich separat abschalten, damit es am Anfang des Wachstums zu keiner Photoinhibierung kommt. Aus Sicherheitsgründen wird zwischen den Reaktoren und den Lampen eine durchsichtige Folie montiert.

Nach dem Befüllen der Schläuche kommt es nach einiger Zeit zu einer leichten Dehnung im Umfang, sodass die Füllhöhe um einige Zentimeter sinkt. Dies muss aber nicht weiter beachtet werden.

3.6. BIOMASSE TROCKENSUBSTANZ (BTS) BESTIMMUNG

Die BTS Bestimmung bei autotroph kultivierten Mikroalgen ist verhältnismäßig schwierig, weil die BTS unter $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ beträgt. Daher sollten zumindest 20 mL entnommen werden. Sorgfältiges Arbeiten und genaues Einwiegen ist für eine genaue Messung unbedingt erforderlich.

20,0 ml Algensuspension werden abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm). Der Überstand wird verworfen, wobei vorsichtig abpipettiert oder abgesaugt werden muss. Überstand abgießen ist grundsätzlich nicht möglich, da das Pellet leicht mit abgegossen wird. Das Pellet wird in 20,0 ml RO-Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm). Bei Verwendung von Minimalmedien ohne Kohlenstoffquelle ist ein Waschschrift ausreichend. Das Pellet wird mit 2 mal 10,0 ml in ein zuvor gewogenes Schraubfläschchen aus Glas überführt und 24h bei 105°C in einen Trockenschrank gestellt. Das Schraubfläschchen wird aus dem Trockenschrank genommen und für mindestens 3 Stunden in einen Exsikkator gestellt und abgewogen. Der gemessene Wert $\times 50$ entspricht der Biomasse Trockensubstanz in $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.7. OPTISCHE DICHTEN - OD_{600} UND OD_{680}

Die Messung der optischen Dichte erlaubt eine schnelle und einfache Einschätzung der Biomasse Trockensubstanz. Chlorophyll hat ein Absorptionsmaximum bei 680 nm, weshalb neben 600 nm auch bei 680 nm gemessen wird. Eine OD_{600} von 1 entspricht grob einer BTS von 0,5 g/L.

3.8. ZELLZAHL BESTIMMUNG MITTELS THOMAKAMMER

Für die Bestimmung der Zellzahl wird eine Thomakammer der Marke Assistent verwendet. Die Tiefe der Thomakammer beträgt 0,100 mm und die Fläche $A = 0,0025 \text{ mm}^2$. Die Thomakammer wird sorgfältig mit Ethanol 70% (v/v) gereinigt und getrocknet. Die Stege werden leicht angefeuchtet und das Deckglas wird aufgesetzt. Es sollten farbige Newton Ringe sichtbar sein. Die Probe wird gut gemischt und vorsichtig mit einer kleinen Pipette seitlich in die Kammer gefüllt. Die Thomakammer wird unter ein Auflichtmikroskop gelegt und mit einer Zählhilfe werden die Zellen bei Vergrößerung 400x ausgezählt. Die Zellzahl sollte zwischen 20 - 200 pro Großquadrat sein, das entspricht einer Zellzahl von $5 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^7$. Bei höheren Zellzahlen muss verdünnt werden.

$$\text{Großquadrat} \times 250\,000 = \text{Zellzahl}/\text{mL}$$

Formel 1: Zellzahl Bestimmung mittels Thomakammer

3.9. STÄRKENACHWEIS

Ein einfacher und schneller Nachweis von Stärke ist mit Lugol'scher Lösung möglich. Lugol'sche Lösung ist Iod in Kaliumiodid gelöst. Eine 0,01M Iod Konzentration ist ausreichend für den Stärkenachweis. Lugol'sche Lösung ist selbst stark gefärbt, daher ist ausreichendes Verdünnen notwendig, um den Nachweis nicht zu stören.

10 mL der Algenkultur werden abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 5 mL 10% KOH in 50% EtOH resuspendiert. Das Röhrchen wird 30 min im Ultraschallbad auf Eis behandelt. Das Pellet wird abzentrifugiert und mit 2 mL 5% HCl resuspendiert. Mit einem Tropfen Lugol'scher Lösung tritt bei Vorhandensein von Stärke eine intensive Blaufärbung auf.

3.10. STÄRKE ANALYTIK

Die heutige Standard Methode in der Lebensmittelanalytik für die quantitative Bestimmung von Stärke erfolgt enzymatisch. Es wird die Glucose vor und nach der Spaltung mit Amylase gemessen. Die Glucose selbst wird enzymatisch über den Verbrauch an NADH gemessen. Dabei werden die Enzyme Hexokinase und Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase verwendet. Diese Methode erfordert jedoch eine gewisse Menge an Probe.

Bei der Kultivierung von Algen kommt es zu verhältnismäßig geringen Biomassekonzentrationen von unter $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Es sollten nur maximal 20 mL für eine Probe entnommen werden, da sonst nach mehreren Messungen der Reaktor zu sehr an Volumen verliert. Bei Algen sind Stärkekonzentrationen von 5-50% der Biomasse zu erwarten. Bei 20 mg Biomasse, die etwa in 20 mL Probe enthalten sind, sind somit geschätzte 1-10 mg Stärke zu erwarten.

Diese geringe Menge kann mit den heute üblichen Testkits nicht enzymatisch bestimmt werden. Daher wurde im Lauf dieser Arbeit eine Methode entwickelt, die eine schnelle und einfache quantitative Stärkebestimmung der Algenbiomasse ermöglicht. Dafür wird die Algenbiomasse mit Salzsäure aufgeschlossen und anschließend die Glucose auf der HPLC bestimmt. Vor der Spaltung mit Salzsäure konnte keine Glucose nachgewiesen werden, daher stört der intrazelluläre Gehalt an Glucose die Messung nicht. Probleme bereiten allerdings der Flowthrough, der teilweise spät im Chromatogramm sichtbar wird und den Glucose Peak verdeckt.

Aus dem Anteil Glucose lässt sich der Anteil an Stärke berechnen. Bei der Hydrolyse wird pro abgespaltenes Molekül Glucose ein Molekül Wasser angefügt.

$$\% \text{ Stärke} = \% \text{ Glucose} * \frac{M (\text{Glucose} - \text{Wasser})}{M (\text{Glucose})}$$

Formel 2: Berechnung der Stärkekonzentration

3.11. HYDROLYSE DER ALGEN FÜR DIE HPLC

20 mL der Algenkultur werden abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm). Der Überstand wird möglichst vollständig abgesaugt und das Pellet wird mit 2 x 2,5 mL HCl (8M) in ein Pyrex Glas Röhrchen überführt. Das Röhrchen wird im Wasserbad bei 70°C 2h erhitzt, wobei nach einer Stunde gevortext wird. Das Röhrchen wird nach dem Abkühlen zentrifugiert (5 min, 5000 rpm). Der Überstand wird in HPLC Röhrchen überführt, wobei ein 0,2 µm Filter verwendet wird. Für eine genaue Messung sollte das Zellpellet lyophilisiert werden.

Nach der Hydrolyse können die Proben auf der HPLC gemessen werden.



Abbildung 21: Hydrolysierte Algenbiomasse zur Messung der Glucose auf der HPLC

3.12. MESSUNG DER GLUCOSE AUF DER HPLC

Es werden folgende Parameter für die Messung verwendet:

Tabelle 5: Parameter der HPLC Messung

Pumpe	Agilent, G1310A IsoPump
Vorsäule	Micro-Guard cartridge (BIO RAD, Cat. #125-0129)
Säule	Aminex HPX 87H, 300 x 7.8 mm (BIO RAD, Cat.#125-0140)
RI-Detector	Agilent, G1362A RID; 25 °C
Autosampler	Agilent, G1329A ALS; 10 °C
Laufmittel	2 M Salzsäure
Autosampler temperature	10 °C
Column temperature	25 °C
RI-Detector temperature	25 °C
Gradient	Isokratisch
Flow	0.450 ml min ⁻¹ (~ 50 bar)
Injektionsvolumen	20 µl
Retentionszeit	11.5 min
Kalibration	100 mg L ⁻¹ - 2000 mg L ⁻¹

3.13. LYOPHILISIERUNG

Die Zellpellets, welche sich in 50 mL Falcon Röhrchen befinden, werden in einen Glasbehälter für die Gefriertrocknung gegeben und bei -20°C eingefroren. Zu beachten ist, dass die Falcon Röhrchen nicht verschlossen sind. Die Lyophilisierungsanlage wird eingeschaltet und der Druck wird beobachtet, bis er auf 1-2 mBar gefallen ist. Nun wird der Glasbehälter mit den Falcon Röhrchen an die Lyophilisierungsanlage angeschlossen. Nach 4-6 Stunden ist das Zellpellet vollständig getrocknet. Bei Entfernung des Glasbehälters wird darauf geachtet, möglichst langsam die Luft einströmen zu lassen.

3.14. NON-PURGEABLE ORGANIC CARBON (NPOC) UND TOTAL NITROGEN (TN)

Der organische Kohlenstoff wird als sogenannter NPOC-Wert gemessen. Dabei wird die Probe angesäuert, um Carbonate und gelöstes CO₂ auszutreiben. Es gehen bei diesem Verfahren auch flüchtige Säuren wie Ameisensäure oder Essigsäure verloren. Die Analyse ist schnell und liefert reproduzierbare Werte.

Der Gesamtstickstoff wird als TN-Wert gemessen. Der verwendete TOC Analysator ermöglicht neben der Messung des Gesamtgehalts von Kohlenstoff durch Zusatz eines TN-Detektors die simultane Bestimmung des Gesamtstickstoffs. Der Gesamtstickstoff ist bei der Kultivierung von Algen ein wichtiger Parameter, da bei Stickstofflimitierung Speicherstoffe wie Stärke und Lipide gebildet werden.

Als Analysengerät wird ein Shimadzu TOC-L_{CPH/CPN} Analyser verwendet. Als Standardsubstanzen werden für die TOC Bestimmung Kaliumhydrogenphthalat und für die TN Bestimmung Kaliumnitrat verwendet. Für die NPOC/TN Bestimmung wird der Überstand verwendet, der bei der BTS Bestimmung anfällt. Die Lösungen werden in 20 mL Probenröhrchen für TOC überführt und in den Autosampler gestellt.

Bei der Kultivierung der Algen wird als Stickstoffquelle Kaliumnitrat verwendet. Die TN Konzentration lässt sich daraus wie folgt berechnen.

$$c(TN) = c(KNO3) * \frac{M(N)}{M(KNO3)}$$

Formel 3: Berechnung des Gesamtstickstoffgehalts (TN)

Tabelle 6: Analysenparameter der TN und NPOC Messung

Analysenmodus	Lineare Regression
Temperatur	680°C
Injektionsvolumen	50 µl
Verdünnung	Nein
Wiederholungen	3 von 5
Standards NPOC	50, 100, 200, 400 ppm
Standards TN	5, 10, 50, 100 ppm
Waschzyklen	2
Begasungsdauer	90 s
Begasungsfluss	50 ml min ⁻¹
Verdünnungsfaktor	1.015 (Durch Zugabe von 1.5 % HCl)

3.15. QUALITATIVE BESTIMMUNG DER FETTSÄUREN MIT GC-MS

Mit GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometer) lassen sich Fettsäuren sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmen. Die Fettsäuren von Chlorella werden qualitativ auf einem Agilent Technologies 7890A GC-System bestimmt. Bei der Trennsäule handelt es sich um eine J&W 19091N-202 Innowax 260 °C: 25 m x 200 µm x 0.4 µm Säule. Es wird ein Agilent Technologies 7693 Autosampler verwendet und für die Massenspektrometrie wird ein Agilent Technologies 5975C Inert MSD Triple-Axis Detektor verwendet.

Um die Fettsäuren auf der GC-MS messen zu können, müssen diese erst mit Methanol verestert werden. Die Reaktionslösung besteht aus Methanol und Salzsäure im Verhältnis 10:1 (v/v).

20,0 mg Algenbiomasse werden mit 5,5 mL Reaktionslösung vermischt. Die Mischung wird im Wasserbad bei 90°C für 120 Minuten erhitzt. Die Mischung wird abgekühlt und 1 ml RO-Wasser wird hinzugefügt und gut vermischt. Die wird mit 2mL Hexan vermischt und für 20 Sekunden auf einem Vortex gut vermischt. Dabei werden die veresterten Fettsäuren (FAMES) extrahiert. Die organische Phase wird in ein Eppendorf Röhrchen pipettiert und mit einer Spatelspitze trockenem Na₂SO₄ versetzt, um das vorhandene Wasser zu entfernen. Dann wird die Lösung in ein sauberes GC Röhrchen pipettiert und in den Autosampler gestellt.

4. ERGEBNISSE

4.1. KULTIVIERUNG IM SCHÜTTELKOLBEN

Die ersten Kultivierungsansätze werden in Schüttelkolben mit Schikanen durchgeführt. Es ist anfangs noch ungewiss, ob die bestellten Organismen überhaupt wachsen würden. Bereits die ersten Ansätze zeigen Wachstum der Algen.

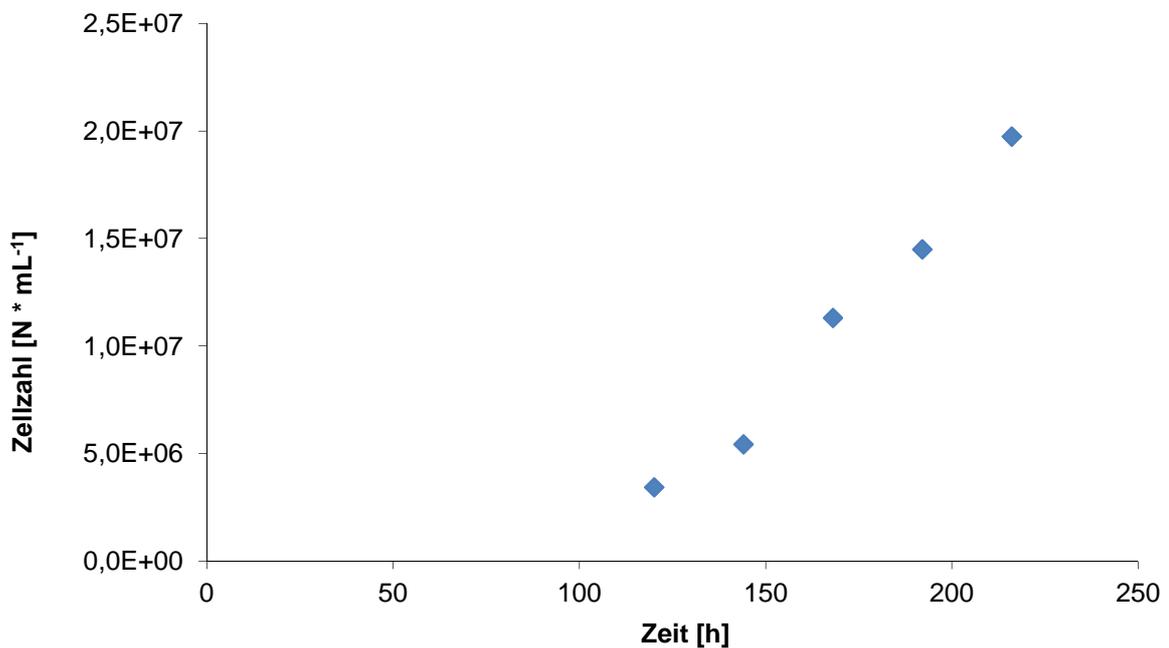


Abbildung 22: Chlorella in ES-P Medium

Wie in Abbildung 22 ersichtlich ist, dauert die lag Phase allein bereits 100 Stunden. *Chlorella vulgaris* produziert Stärke und Lipide, wenn Stickstoff limitiert kultiviert wird. Um den Zeitpunkt der Stickstofflimitierung herauszufinden sowie um überhaupt einmal Stärke zu finden, werden 7 Ansätze mit verschiedenen Nitratkonzentrationen hergestellt. Die Kulturen werden in 1000 mL Schüttelkolben gehalten und das Wachstum wird mit OD_{600} beobachtet. Ein Ansatz enthält zusätzlich $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Natriumacetat. Natriumacetat sollte die Stärkesynthese anregen (Ball, 1998).

Ergebnisse

In Abbildung 23 zeigt sich, dass der Ansatz mit Natriumacetat anfangs zu erhöhtem Wachstum führt, jedoch gegen Ende mit den anderen Ansätzen vergleichbar ist. Das ist zu erklären, weil Chlorella Acetat als Kohlenstoffquelle benutzt. Geringstes Wachstum hat der Ansatz mit $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, was ebenfalls plausibel ist, da als erstes Stickstofflimitierung auftritt. Bei den anderen Ansätzen tritt dieses Muster jedoch nicht auf, sodass kein Unterschied im Wachstum der einzelnen Ansätze zu erkennen ist. Die Kulturen werden am Ende alle mit Lugol'scher Lösung auf Stärke getestet. Die Nachweise fallen negativ aus.

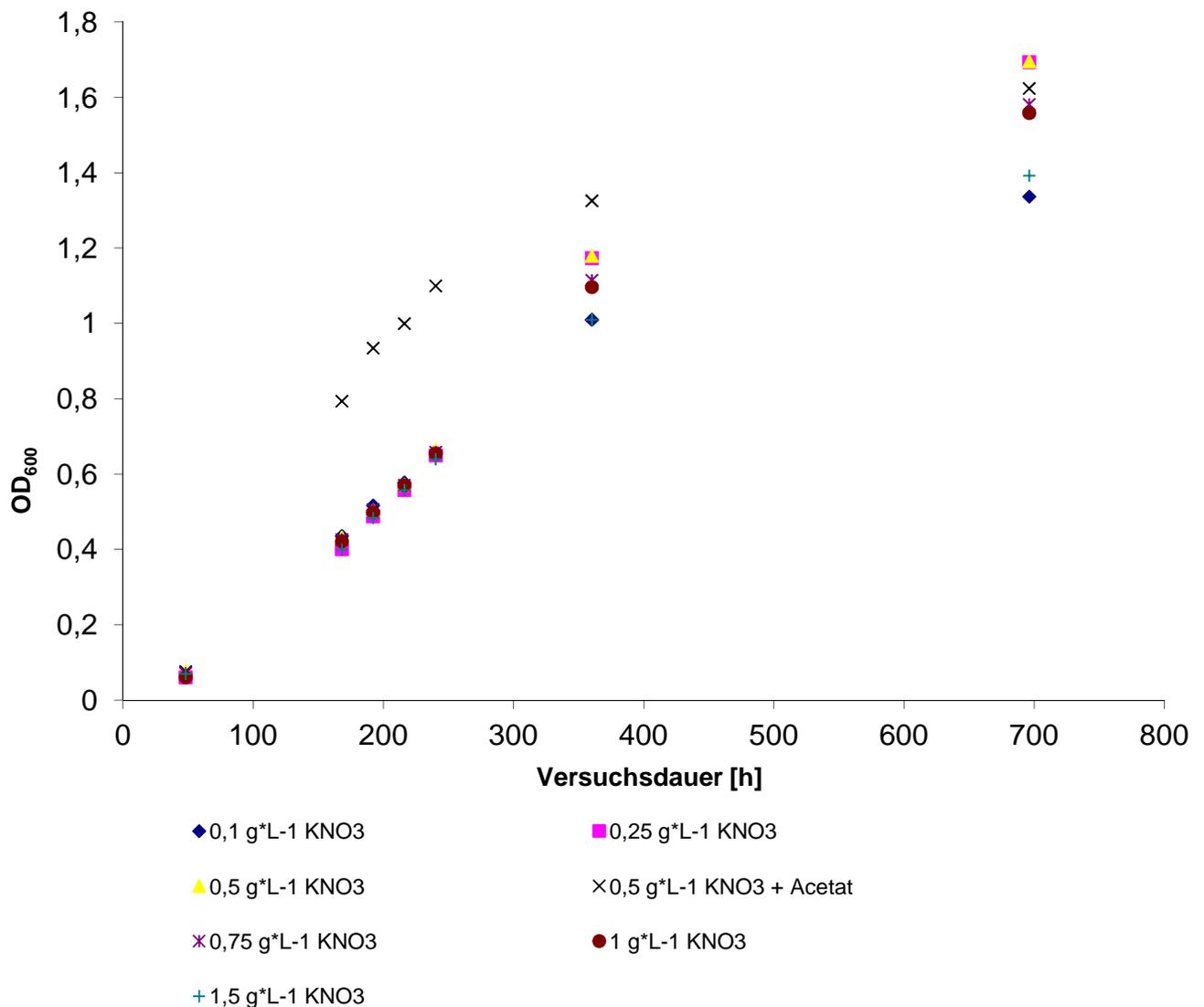


Abbildung 23: Chlorella in "Kuhl" Medium mit verschiedenen Stickstoffkonzentrationen. Nach etwa 300 Stunden kommt es zu leicht unterschiedlichem Wachstum. Ausnahme ist der Ansatz mit zusätzlichem Acetat, welches von Chlorella als Kohlenstoffquelle verwertet wird.

4.2. KULTIVIERUNG IM GLAS PHOTOBIOREAKTOR

Der Glas PBR besitzt ein Volumen von 2 L und ermöglicht eine photoautotrophe Kultivierung. Hier darf kein ES-P Medium verwendet werden, welches Pepton enthält. Bei Medien mit zusätzlicher Kohlenstoffquelle würde Chlorella sofort überwachsen werden. Die Kultivierung erfolgt mit "Kuhl" Medium ohne Kohlenstoffquelle. Die Kulturen werden mit OD_{600} und OD_{680} Messungen überwacht.

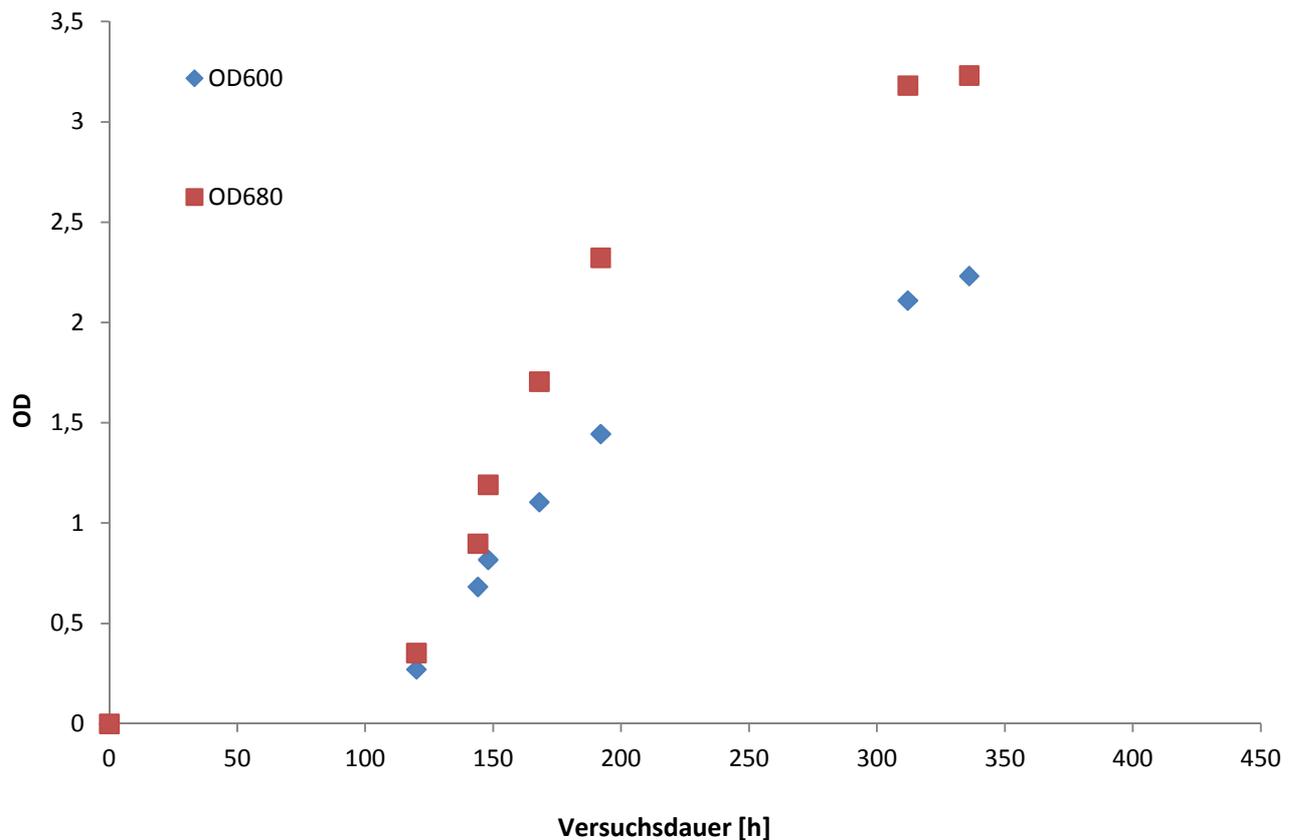


Abbildung 24: Chlorella im Glas Photobioreaktor. Die Kurven werden mit zunehmender Versuchsdauer flacher und die Kultur kann positiv auf Stärke getestet werden .

Ab Stunde 312 werden die Kurven flacher. Mit der Kultur wird ein Stärkenachweis durchgeführt. Der Nachweist fällt positiv aus und somit hat diese Kultur erstmals Stärke gebildet.

4.3. FETTSÄUREMUSTER EINER STATIONÄREN CHLORELLA KULTUR

Neben Stärke werden auch Lipide als Speicherstoffe gebildet. Mit einer 400h alten Chlorella Kultur wird der Versuch unternommen, die Fettsäuren auf der GC-MS zu analysieren. Die Analyse wird rein qualitativ durchgeführt.

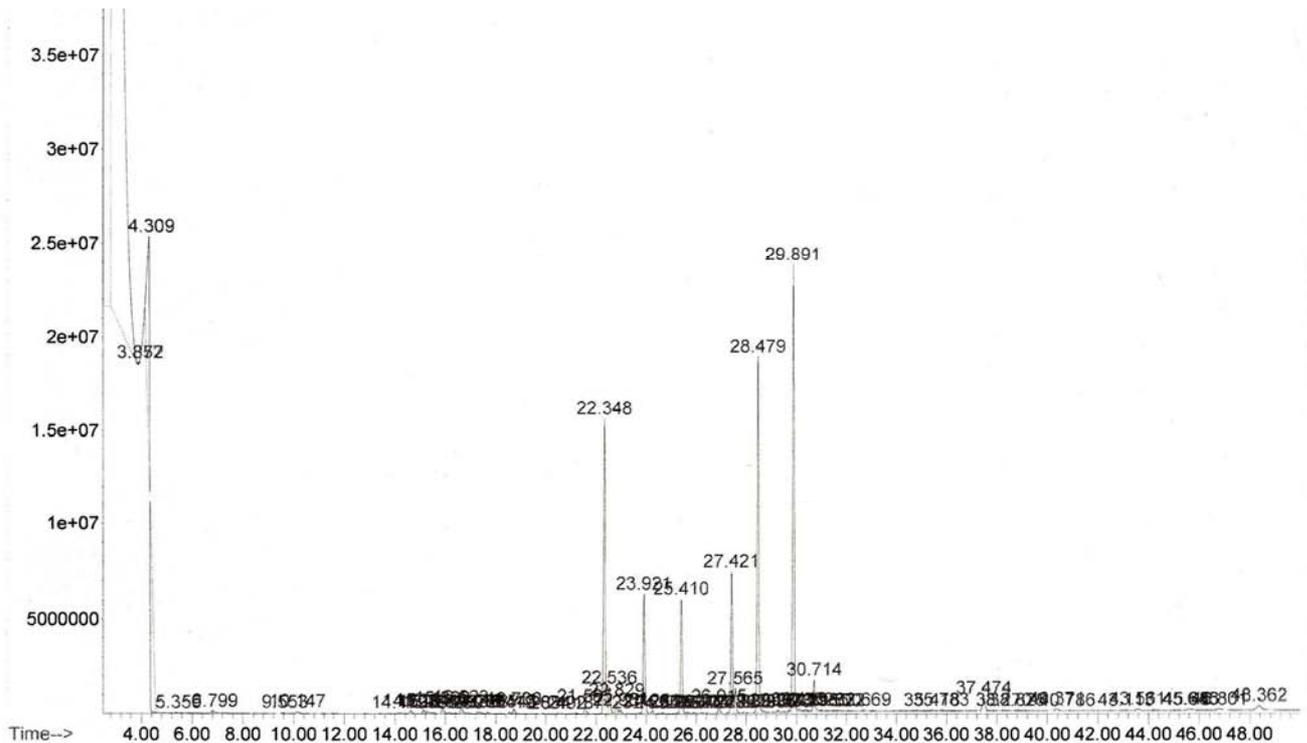


Abbildung 25: Das Fettsäurespektrum einer stationären Chlorella Kultur zeigt 6 Peaks.

Die sechs Hauptpeaks werden in folgender Tabelle gezeigt.

Tabelle 7: Auswertung der GC-MS Analyse

Retentionszeit	Substanz	Referenz #	CAS #	Qualität
22,348	Hexadecanoic acid, methyl ester	121186	000112-39-0	99
23,920	7, 10 - Hexadecadienoic acid, methyl ester	92502	016106-03-9	95
25,410	7, 10, 13 - Hexadecatrienoic acid, methyl ester	133590	999133-59-3	99
27,421	13 - Octadecenoic acid, methyl ester	60010	999060-01-2	99
28,479	9, 12 - Octadecadienoic acid, methyl ester, "Linoleic Acid"	92609	000112-63-0	99
29,891	9, 12, 15 - Octadecatrienoic acid, methyl ester, "Linolenic Acid"	133732	00301-00-8	99

4.4. KULTIVIERUNG IN SCHLAUCHREAKTOREN 1.HAUPTVERSUCH

Nach der Fertigstellung der Reaktoren werden in 6 Schlauchreaktoren *Chlorella vulgaris* Kulturen angesetzt. Es ist zum Zeitpunkt der Fertigstellung unklar, ob die Reaktoren der langen Kultivierungsdauer von 500 Stunden standhalten werden. Daher werden Doppelansätze gemacht. Dadurch soll im Falle eines Ausfalls der zweite Reaktor eine Kultivierung bis zum Ende ermöglichen. Folgende Ansätze werden gemacht.

Tabelle 8: Startbedingungen des 1.Hauptversuches

Reaktor	Volumen	Medium	KNO ₃	TN	Begasung	c(CO ₂)
PBR 1	2,4 L	CT	250 mg*L ⁻¹	35 mg*L ⁻¹	0,5 L*min ⁻¹	5% (v/v)
PBR 2	2,4 L	CT	250 mg*L ⁻¹	35 mg*L ⁻¹	0,5 L*min ⁻¹	5% (v/v)
PBR 3	2,4 L	CT	500 mg*L ⁻¹	70 mg*L ⁻¹	0,5 L*min ⁻¹	5% (v/v)
PBR 4	2,4 L	CT	500 mg*L ⁻¹	70 mg*L ⁻¹	0,5 L*min ⁻¹	5% (v/v)
PBR 5	2,4 L	CT	750 mg*L ⁻¹	105 mg*L ⁻¹	0,5 L*min ⁻¹	5% (v/v)
PBR 6	2,4 L	CT	750 mg*L ⁻¹	105 mg*L ⁻¹	0,5 L*min ⁻¹	5% (v/v)

Begast werden die Reaktoren mit Druckluft und 5% CO₂ mit einer Durchflussrate von 0,5 L*min⁻¹. Bei Stunde 300 ist PBR 4 ausgefallen. Bei Stunde 320 ist PBR 2 ausgefallen. Diese Reaktoren werden in den folgenden Auswertungen nicht berücksichtigt. Es kann mit allen 3 verschiedenen Stickstoffkonzentrationen eine Kultivierung zu Ende geführt werden. PBR 5 und PBR 6, die mit gleichen Bedingungen gestartet werden, können bis zum Ende kultiviert werden. Anhand Abbildung 26 und Abbildung 27 sieht man den Wachstumsverlauf aller Reaktoren. Unterschiede sind selbst zwischen PBR5 und PBR6 erkennbar, die mit gleichen Bedingungen gestartet wurden.

Ergebnisse

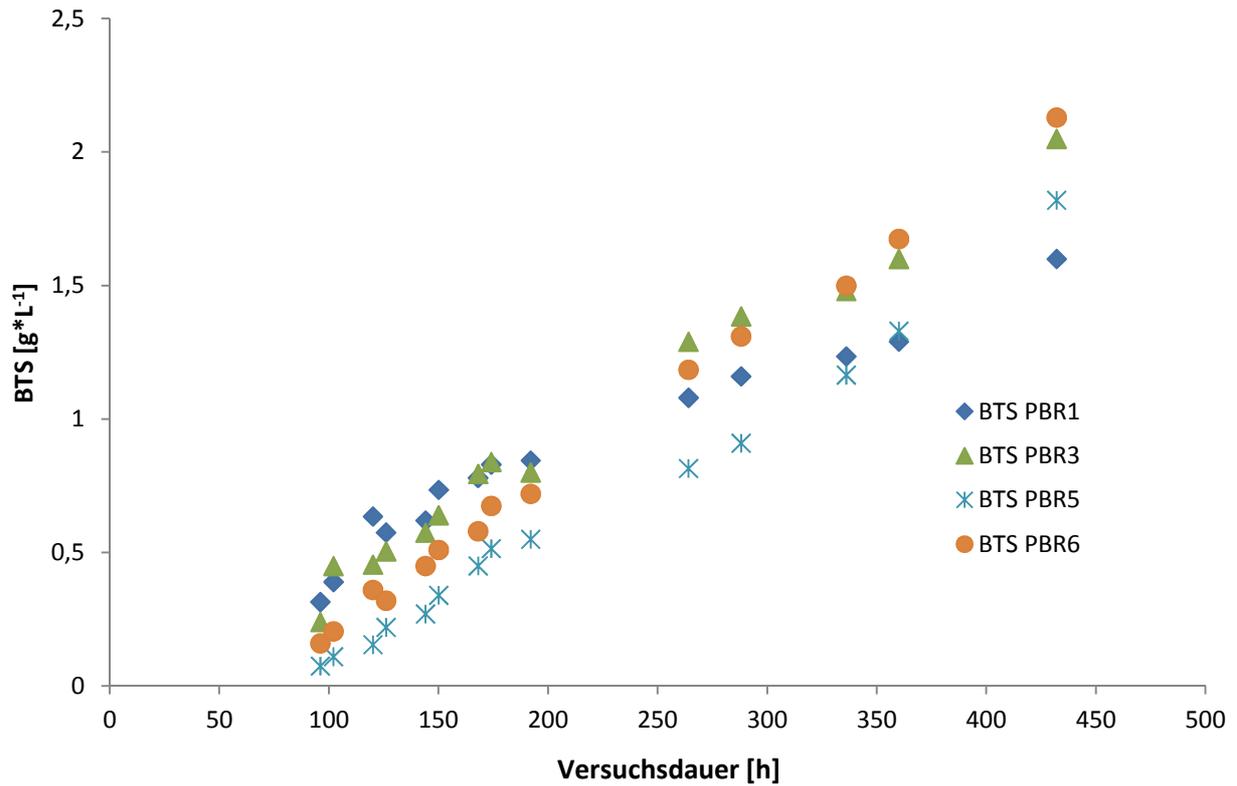


Abbildung 26: Biomasse Trockensubstanz der Schlauchreaktoren. Die Reaktoren mit verschiedener Stickstoffkonzentration zeigen ähnliches Wachstum. Das Wachstum ist linear.

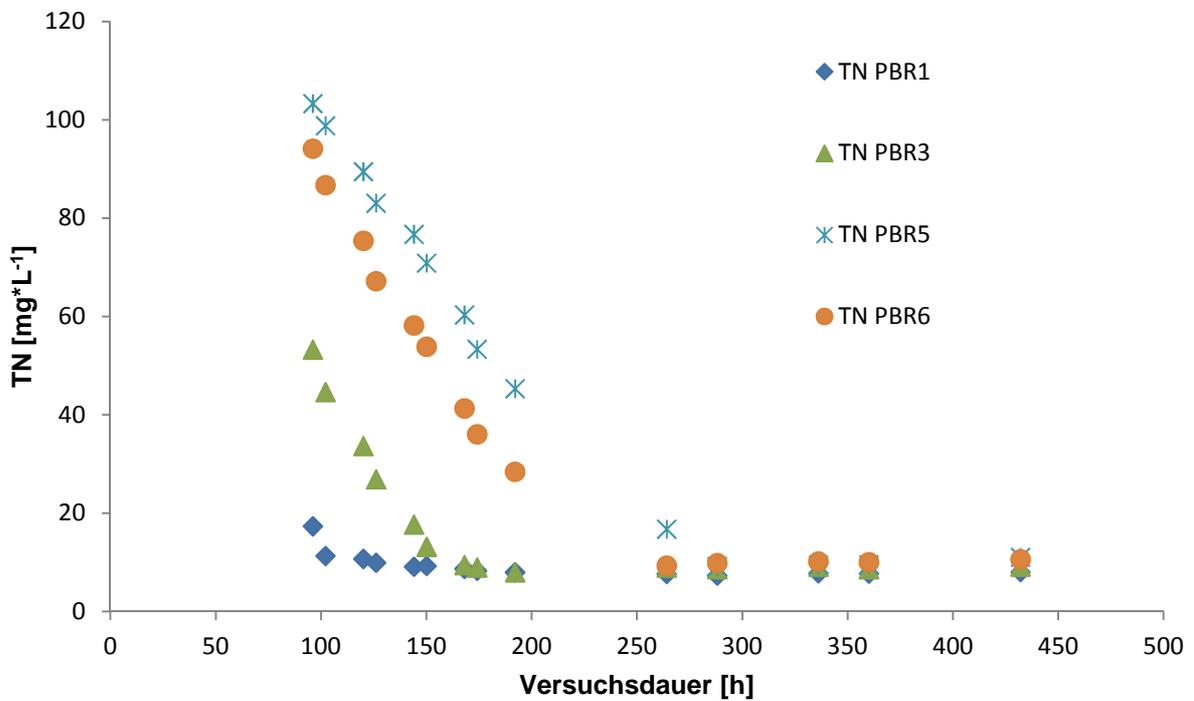


Abbildung 27: Der Gesamtstickstoff (TN) fällt bis zum Grenzwert von $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Bei höherer Startkonzentration (PBR5, PBR6) dauert es länger, bis der Grenzwert erreicht wird.

Photobioreaktor 1

PBR1 wird mit einer Nitratkonzentration von $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$ gestartet. Das entspricht einer Stickstoffkonzentration von $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. In Abbildung 28 ist der Wachstumsverlauf sichtbar. Es kommt beim Wachstum zu einer lag Phase von etwa 80 Stunden. Bei Stunde 120 fällt die Stickstoffkonzentration unter $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ und bleibt bis zum Ende der Fermentation bei $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Somit ist die Kultivierung ab Stunde 150 Stickstoff limitiert. Diese Limitierung lässt sich auch an der OD_{680} ablesen. Die OD_{680} steigt solange die TN fällt und bleibt dann konstant bei 2,3.

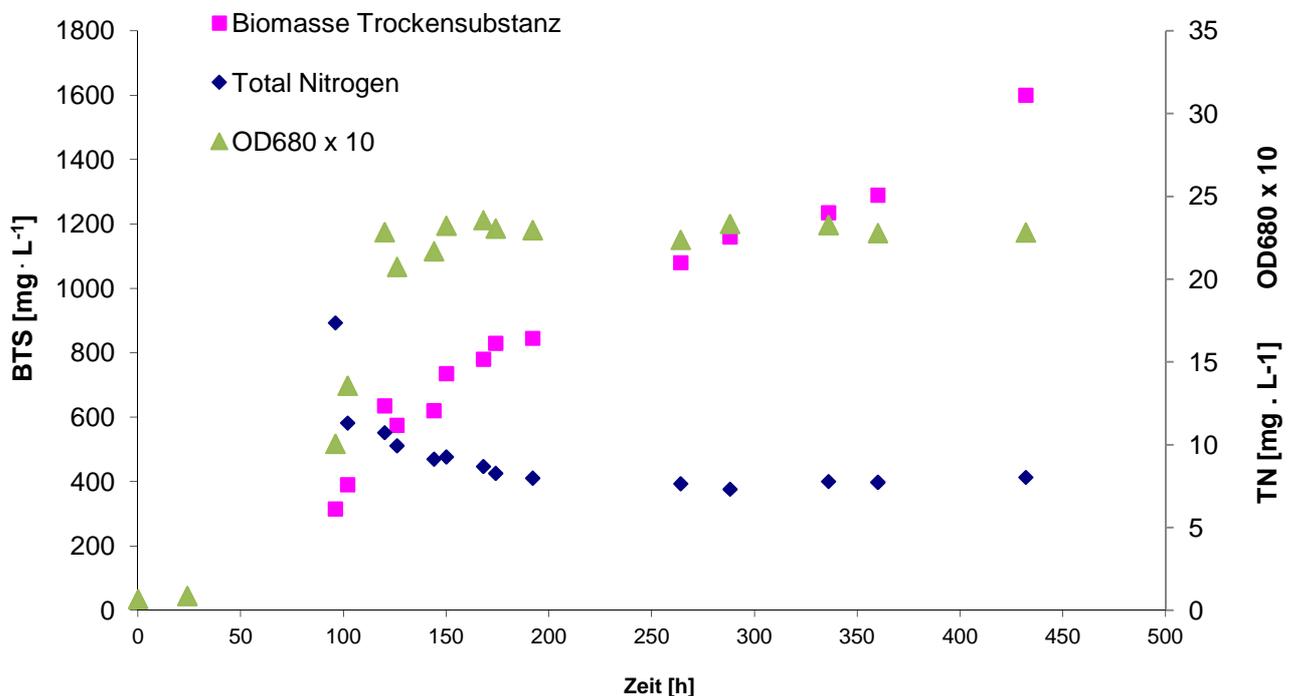


Abbildung 28: PBR1 ist bereits nach etwa 120 Stunden Stickstoff limitiert. Ab diesem Zeitpunkt bleibt die OD_{680} konstant, die Biomasse steigt aber weiter bis zum Ende des Versuchs.

Abbildung 29 zeigt, wie Stärke bei Stickstofflimitierung gebildet wird. Bei Stunde 126 kann erstmals Glucose in der hydrolysierten Biomasse nachgewiesen werden. Der Anteil Glucose an der Biomasse steigt bis Stunde 144 auf 8,0% (m/m). Danach sinkt der Stärkeanteil wieder und fällt bis zum Ende der Kultivierung bei Stunde 432 auf 1,1%. Das ist auf die Bildung von Lipiden zurückzuführen.

Ergebnisse

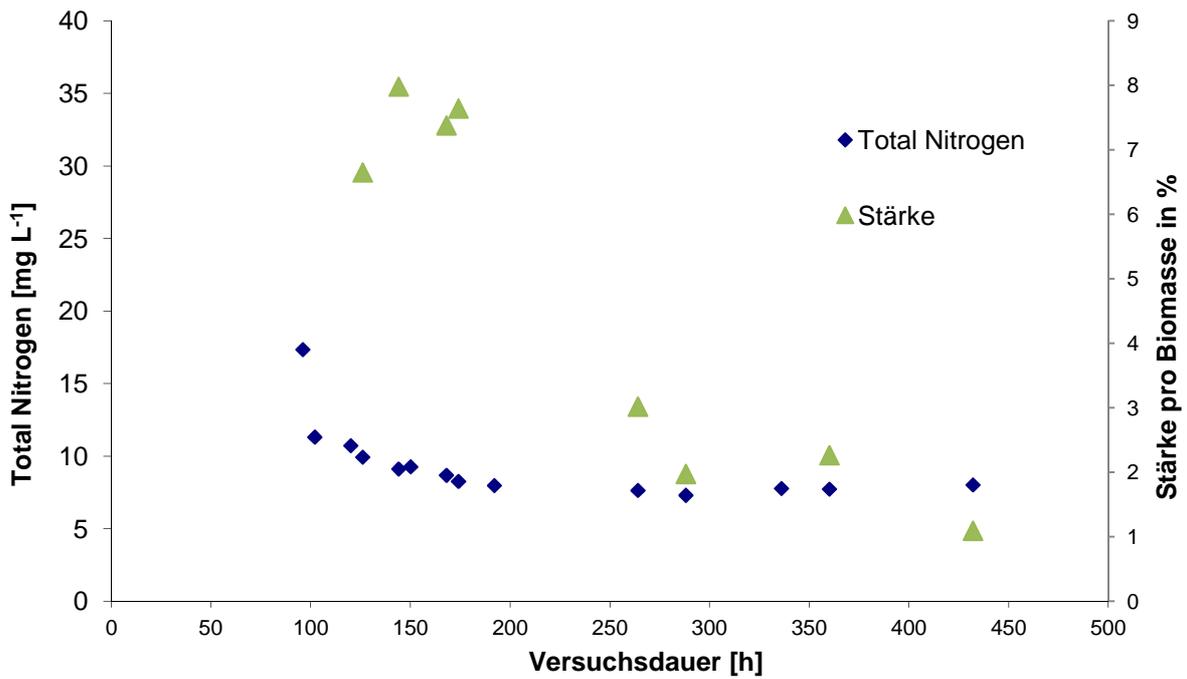


Abbildung 29: PBR1 ist etwa ab Stunde 120 Stickstoff limitiert. Die Zellen haben ab diesem Zeitpunkt Stärke gebildet bis maximal 8% der Biomasse Trockensubstanz. Danach ist der Stärkegehalt gesunken.

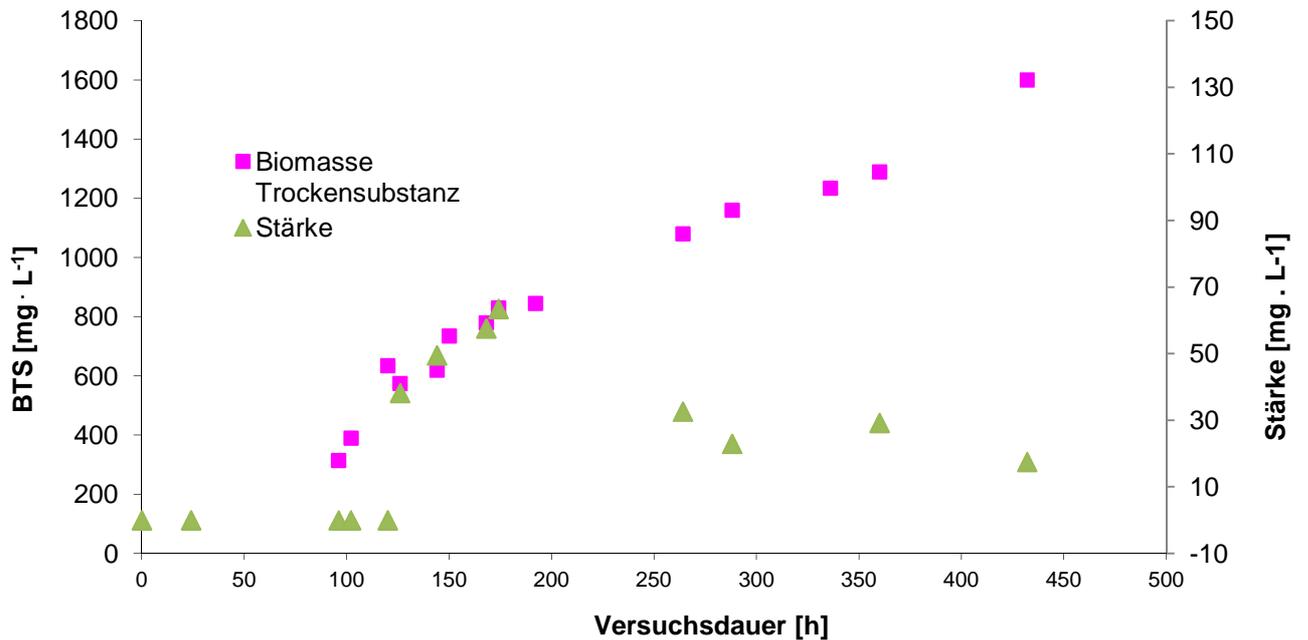


Abbildung 30: PBR1 bildet ab Stunde 120 Stärke. Der Gesamtstarkegehalt steigt bis Stunde 174 auf 63 mg*L⁻¹ und sinkt danach wieder.

Abbildung 30 zeigt die Stärkekonzentration und die Biomassekonzentration im zeitlichen Verlauf. Bei Stunde 174 kommt es zum höchsten Gesamtstarkegehalt von 63 mg*L⁻¹.

Photobioreaktor 3

PBR3 wird mit einer Nitratkonzentration von $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$ gestartet. Das entspricht einer Stickstoffkonzentration von $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Es kommt beim Wachstum zu einer lag Phase von etwa 80 Stunden. Ab diesem Zeitpunkt ist das Wachstum linear bei konstanter Rate. Bei Stunde 200 fällt die Stickstoffkonzentration unter $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ und bleibt bis zum Ende der Fermentation bei $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Somit ist die Kultivierung ab Stunde 200 Stickstoff limitiert. Wie in Abbildung 32 ersichtlich ist, ist bei Stunde 336 7,8% der Biomasse Stärke. Das Verhältnis sinkt im weiteren Wachstumsverlauf.

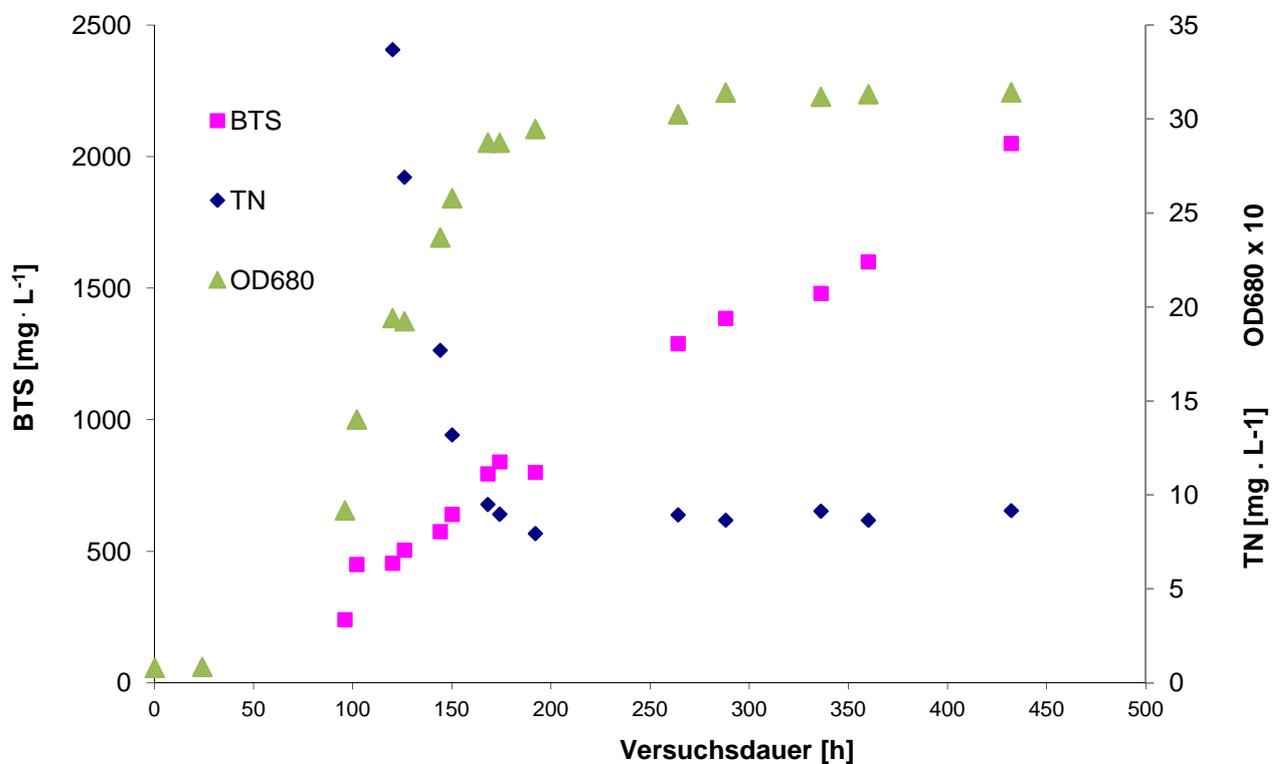


Abbildung 31: Wachstumsverlauf von PBR3 ist ähnlich wie bei PBR1, nur aufgrund der höheren Stickstoff Startkonzentration von $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ nach hinten versetzt. Stickstoff Limitierung tritt ab Stunde 200 ein und ab diesem Zeitpunkt bleibt auch die OD_{680} konstant. Die Biomasse Trockensubstanz (BTS) steigt weiter.

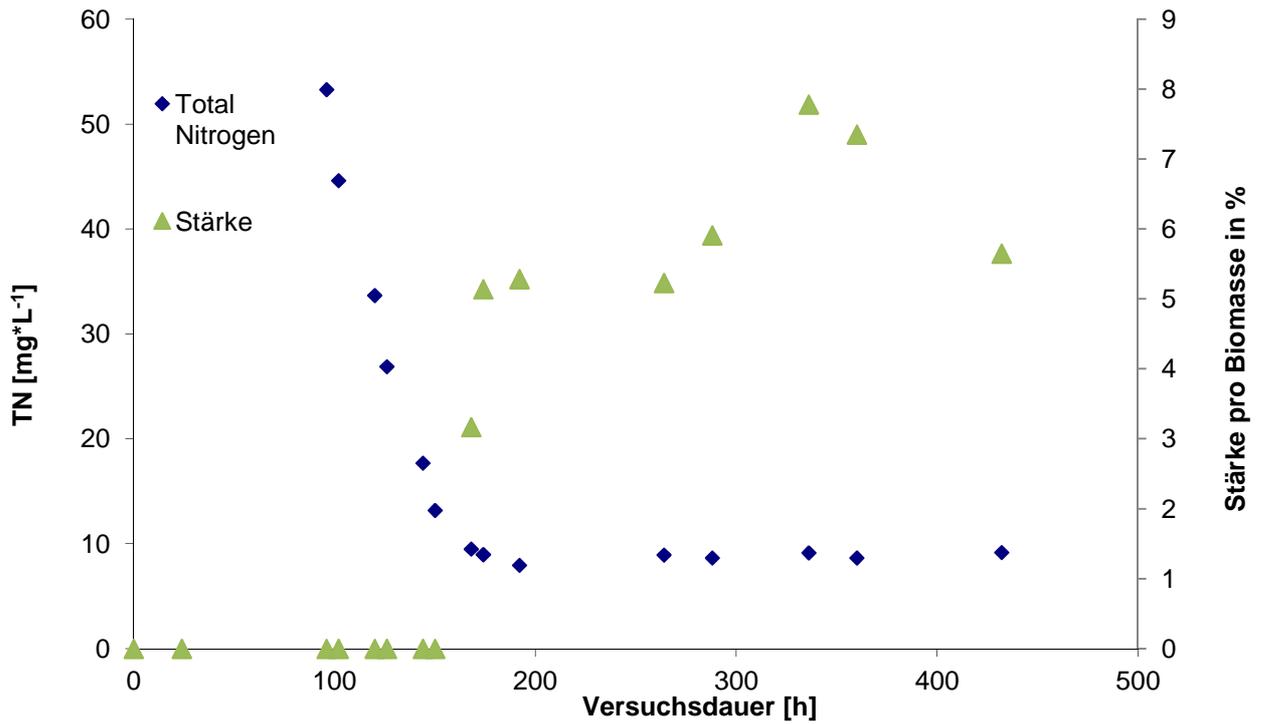


Abbildung 32: PBR3 bildet ab dem Zeitpunkt der Stickstoff Limitierung Stärke. Der höchste Stärkegehalt pro Trockenmasse ist 7,8% bei Stunde 336.

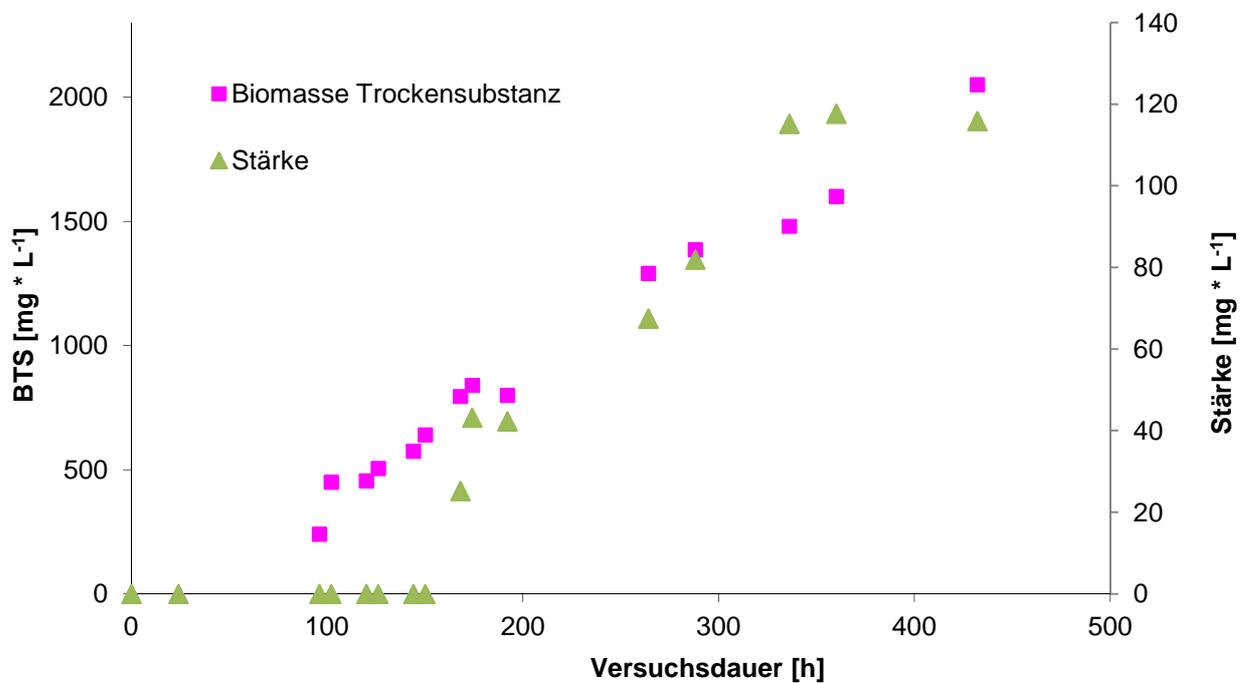


Abbildung 33: Die höchste Stärkekonzentration erreicht PBR3 mit 117 mg*L⁻¹ bei Stunde 360. Die Biomassekonzentration steigt bis zum Ende der Kultivierung auf 2050 mg*L⁻¹.

Ergebnisse

Abbildung 33 zeigt den zeitlichen Verlauf der Biomassekonzentration sowie der Stärkekonzentration. Das Maximum von $117 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Stärke ist bei Stunde 360 erreicht. Der Gesamtgehalt an Stärke steigt zwar oder bleibt gleich, jedoch fällt der Anteil an Stärke pro Biomasse.

Photobioreaktor 5

PBR5 wird mit einer Kaliumnitratkonzentration von $750 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$ gestartet. Das entspricht einer Stickstoffkonzentration von $105 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Der Wachstumsverlauf ist ähnlich wie bei den Reaktoren mit niedrigerer Stickstoffkonzentration. Unterschiedlich ist in erster Linie der Zeitpunkt der Stickstofflimitierung. Durch die höhere Startkonzentration ist dieser Zeitpunkt deutlich später.

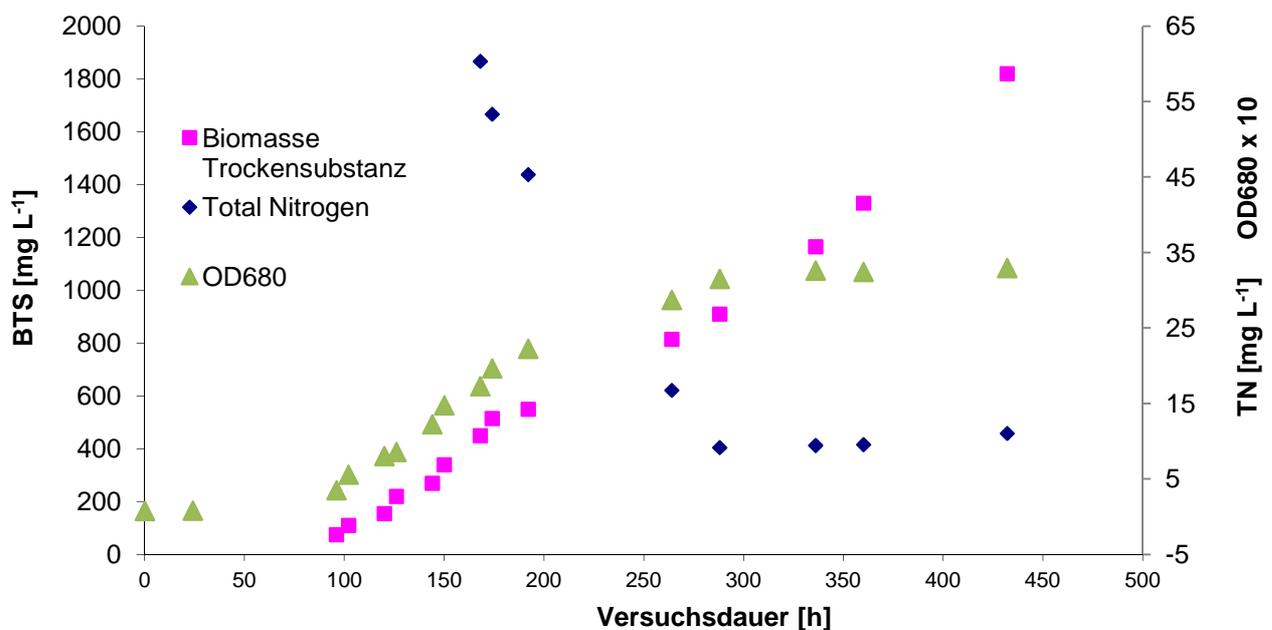


Abbildung 34: Wachstumsverlauf bei PBR5 ist ähnlich wie bei PBR1 und PBR3, nur aufgrund der hohen Stickstoff Startkonzentration tritt Stickstoff Limitierung erst bei Stunde 280 ein. Die OD_{680} bleibt ab diesem Zeitpunkt konstant. Die Biomasse Trockensubstanz steigt bis zum Ende der Kultivierung

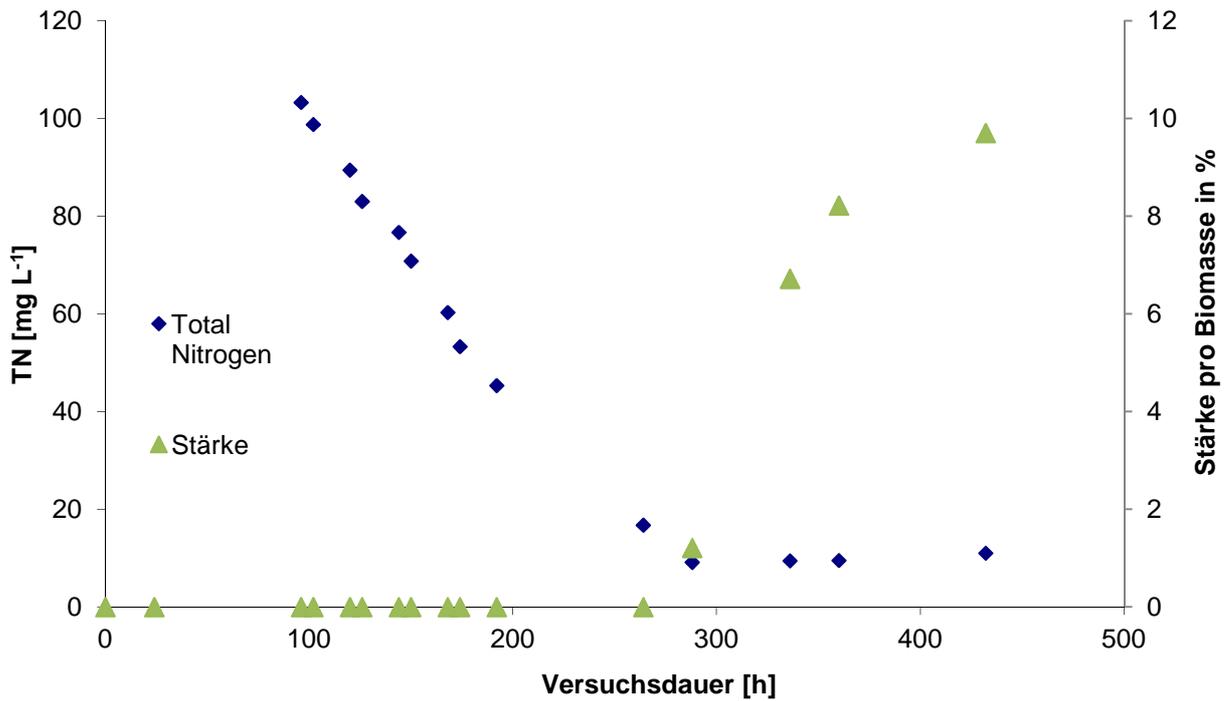


Abbildung 35: Ab dem Zeitpunkt der Stickstoff Limitierung bildet PBR5 Stärke. Der maximale Stärkegehalt pro Trockensubstanz ist 9,8% bei Stunde 430.

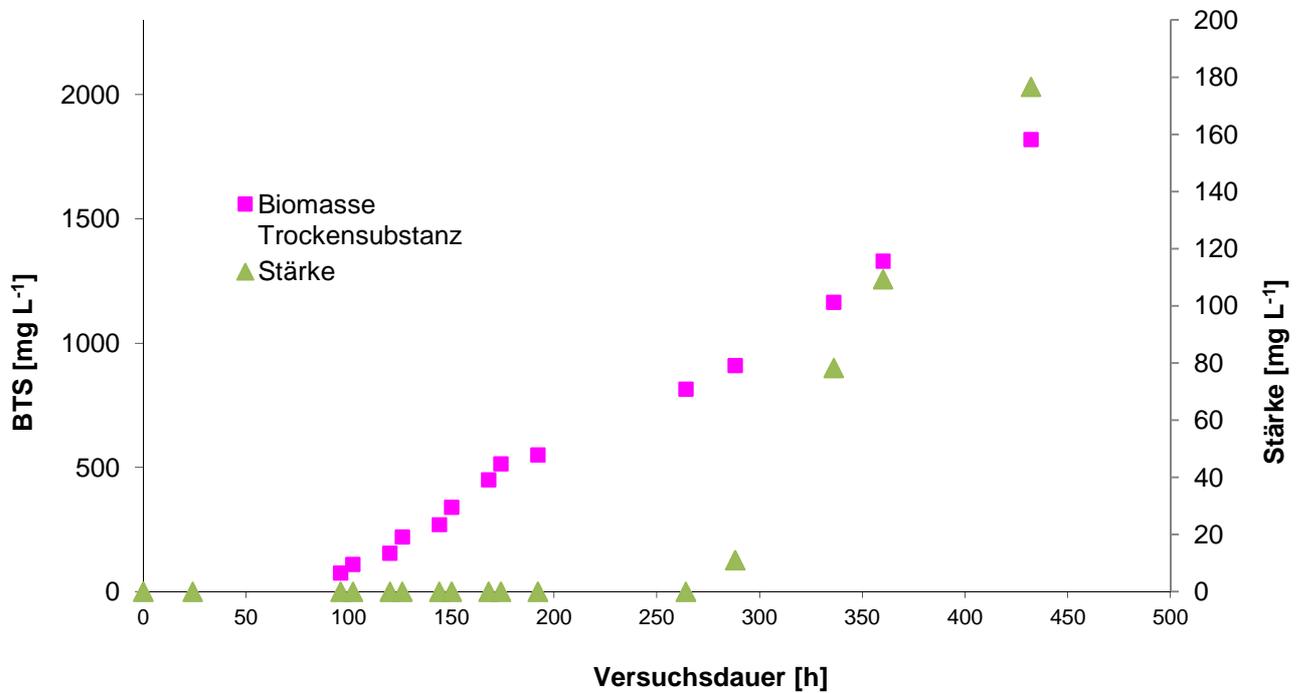


Abbildung 36: PBR5 bildet ab Stunde 280 Stärke. Die Biomasse Trockensubstanz steigt unabhängig davon bis zum Ende der Kultivierung.

4.5. VERSUCH EINER MIXOTROPHEN KULTIVIERUNG MIT GLYCERIN

Für den Versuch werden zwei Schlauchreaktoren mit CT Medium befüllt und $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$ wird als Stickstoffquelle hinzugefügt. Es werden $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glycerin hinzugefügt. Zwei weitere Schlauchreaktoren werden mit CT Medium gefüllt, mit $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$ versetzt und $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glycerin hinzugefügt.

Bereits nach 24 Stunden kommt es zur Trübung des Mediums und ein widerlicher Geruch deutet klar auf eine Kontamination hin.

4.6. KULTIVIERUNG IN SCHLAUCHREAKTOREN 2.HAUPTVERSUCH

Für den 2.Hauptversuch werden die Reaktoren an der Unterseite verschweißt. Dadurch kann Dichtheit sichergestellt werden. Durch den fehlenden Anschluss muss die Begasung durch einen Schlauch von oben durchgeführt werden. Da es zu Problemen bei der HPLC Messung gekommen ist, kann beim 2.Hauptversuch keine Stärke gemessen werden. Dieses Problem wird in der Diskussion genauer erläutert.

Tabelle 9: Startbedingungen des 2.Hauptversuchs

Reaktor	Volumen	Medium	KNO_3	TN	Begasung	$c(\text{CO}_2)$
PBR 1	2,4 L	CT	$250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$35 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$	5% (v/v)
PBR 2	2,4 L	CT	$250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$35 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$	5% (v/v)
PBR 3	2,4 L	CT	$500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$	Druckluft
PBR 4	2,4 L	CT	$500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$	5% (v/v)
PBR 5	2,4 L	CT	$750 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$105 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$	5% (v/v)
PBR 6	2,4 L	CT	$750 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$105 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$	5% (v/v)

Folgende Abbildungen zeigen die Wachstumskurven der 7 Photobioreaktoren. Bei Stunde 360 ist die CO_2 Gasflasche ausgegangen, dadurch ist es zu einem Knick in den Wachstumskurven gekommen. Photobioreaktor 3 wurde nur mit Druckluft begast und hat dadurch ein deutlich geringeres Wachstum.

Ergebnisse

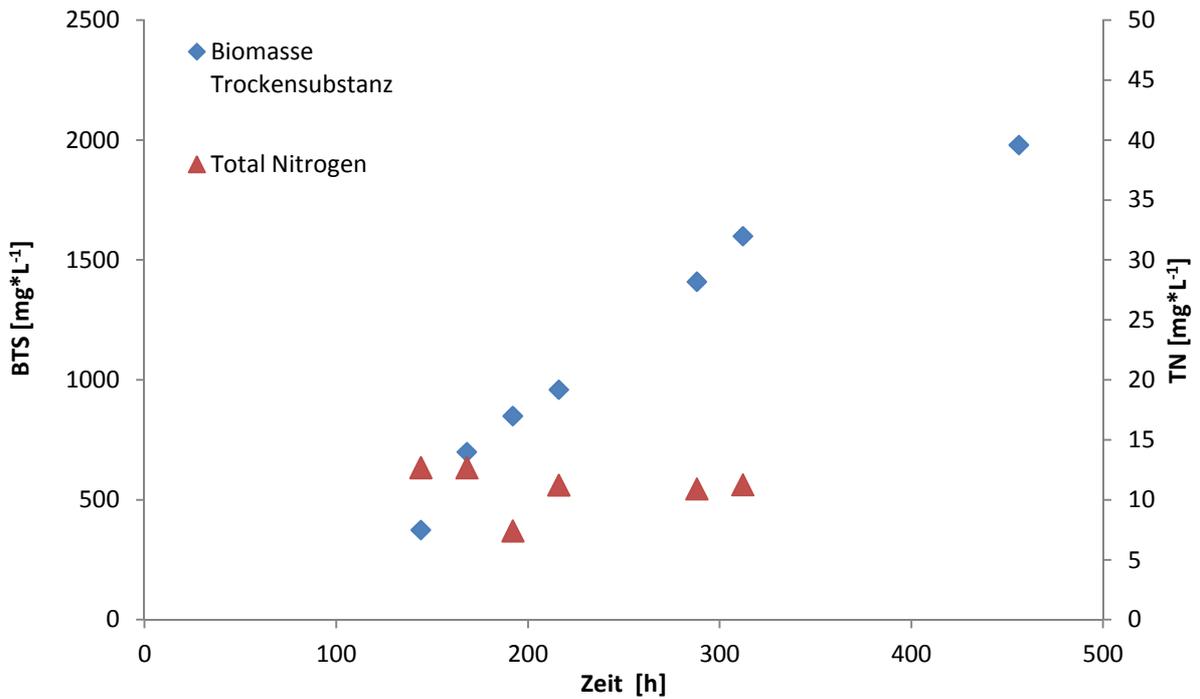


Abbildung 37: Die Biomasse Trockensubstanz bei Photobioreaktor 1 steigt bis zum Ende der Kultivierung auf 1980 mg*L⁻¹. Bei Stunde 360 ist die CO₂ Flasche ausgegangen und die Wachstumskurve wird flacher.

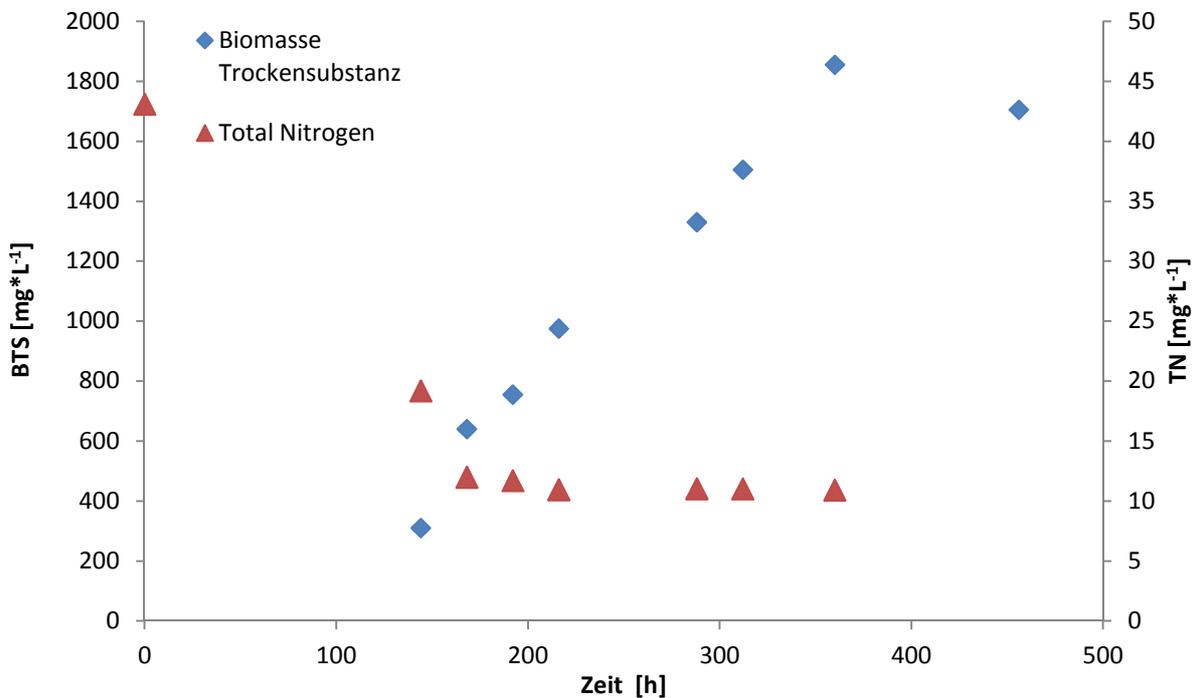


Abbildung 38: Biomasse Trockensubstanz Photobioreaktor 2 steigt bis 1855 mg*L⁻¹ bei Stunde 360 und fällt danach.

Ergebnisse

Der PBR3 wird ohne zusätzlichem CO₂ betrieben. Die Biomassetrockensubstanz liegt am Ende der Kultivierung bei 840 mg*L⁻¹ und ist somit deutlich geringer als die der anderen Reaktoren. Der Stickstoffgehalt im Medium fällt auch deutlich langsamer als bei Reaktoren mit zusätzlichem CO₂.

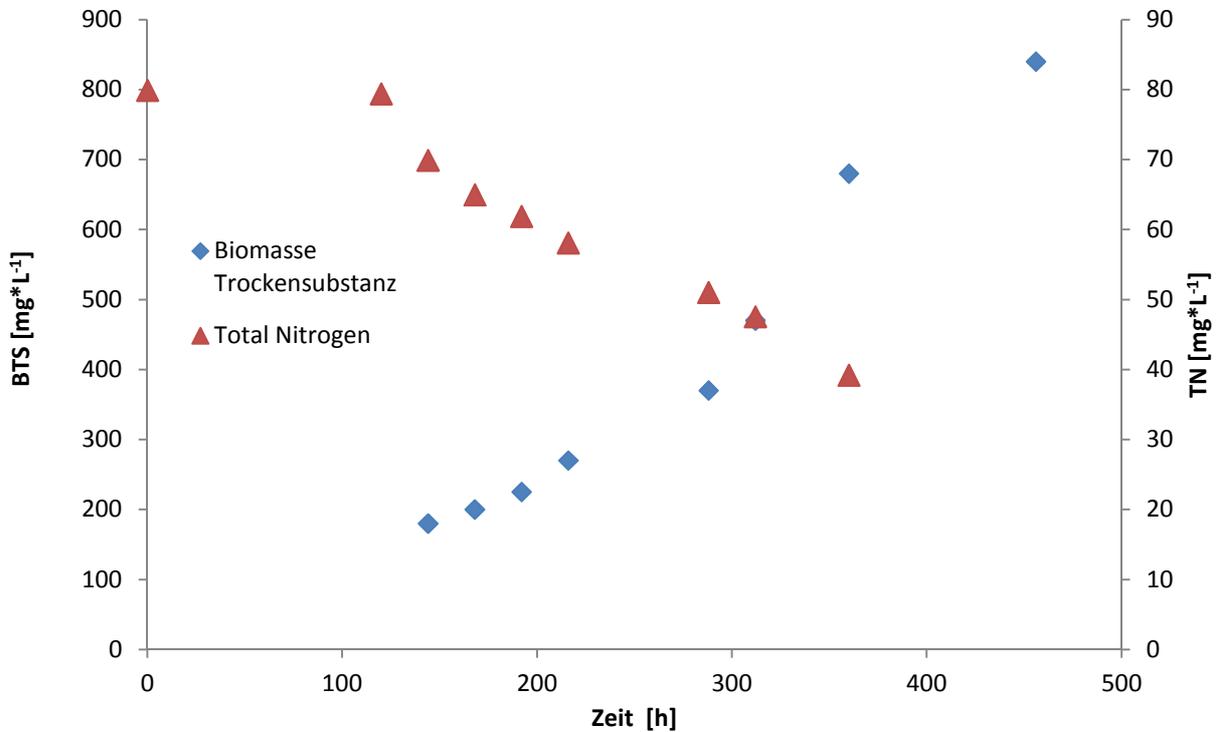


Abbildung 39: Die Biomasse Trockensubstanz bei Photobioreaktor 3 steigt deutlich langsamer, da kein zusätzliches CO₂ verwendet wird. Gleichermassen fällt auch der Gesamtstickstoff deutlich langsamer.

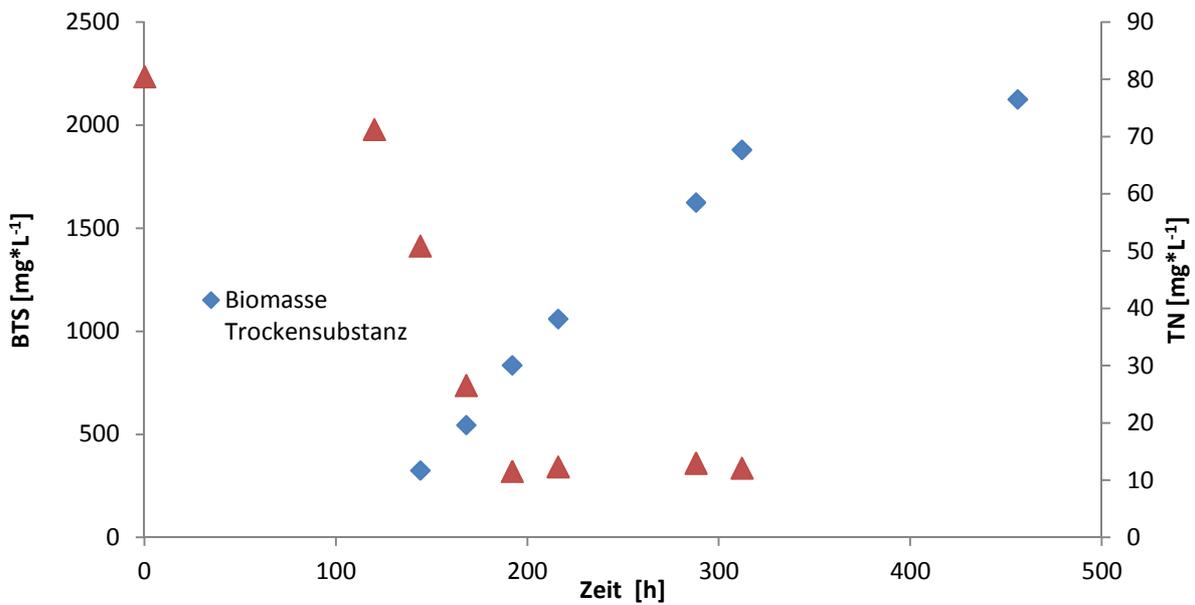


Abbildung 40: Die Biomasse Trockensubstanz Photobioreaktor 4 steigt bis zum Ende der Kultivierung auf 2125 mg*L⁻¹.

Ergebnisse

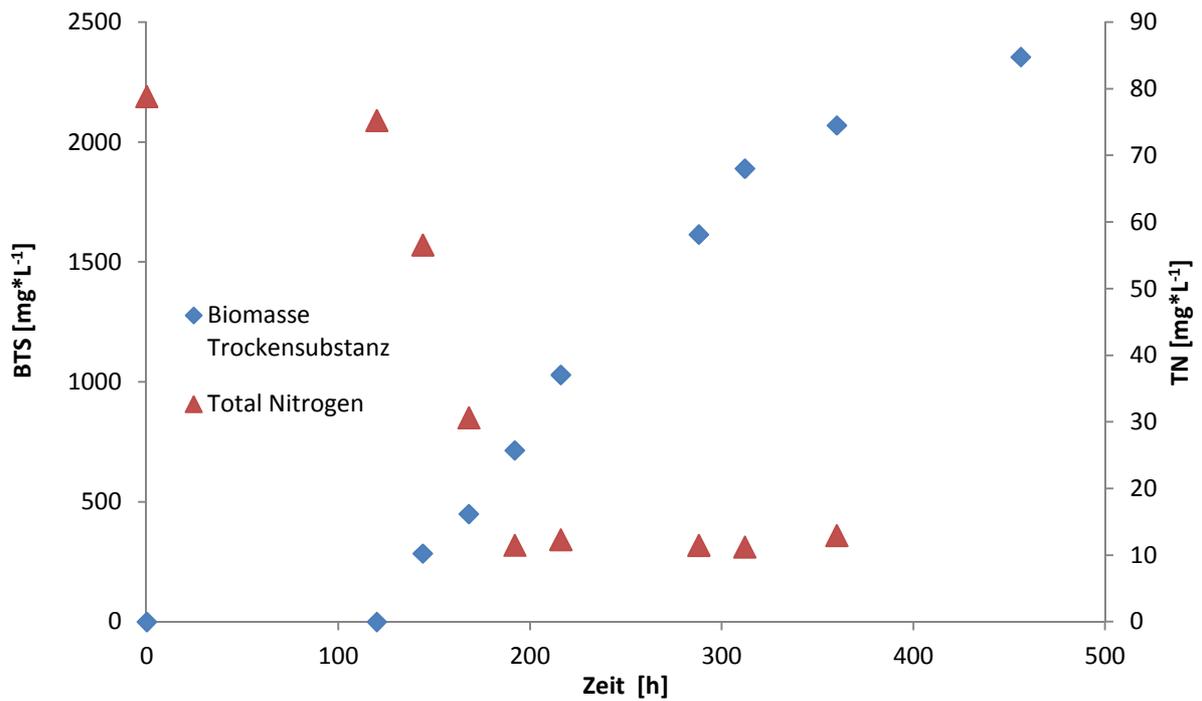


Abbildung 41: Die Biomasse Trockensubstanz bei Photobioreaktor 5 steigt bis auf $2355 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Der Knick in der Wachstumskurve ist aufgrund der leer gewordenen CO_2 Flasche zustande gekommen.

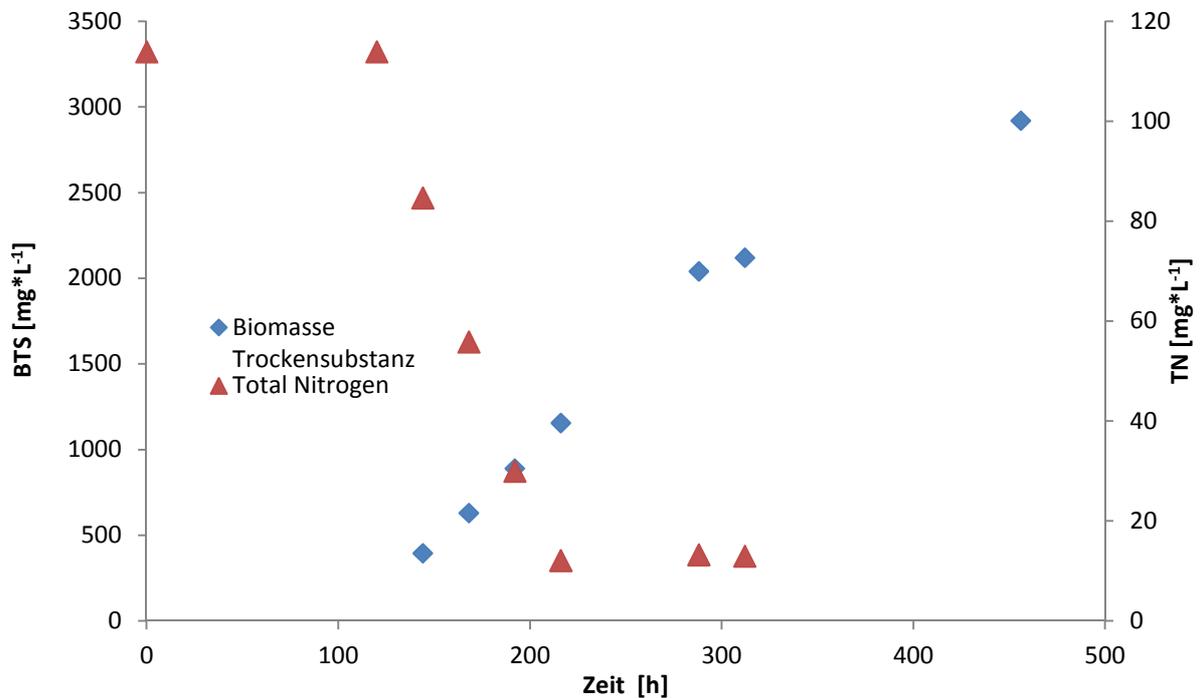


Abbildung 42: Biomasse Trockensubstanz bei Photobioreaktor 6 steigt bis zum Ende der Kultivierung auf $2929 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Mit Photobioreaktor 6 konnte eine Biomasse Trockensubstanz von $2920 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ erreicht werden. Es ist der höchste Wert aller Kultivierungen der vorliegenden Arbeit.

Ergebnisse

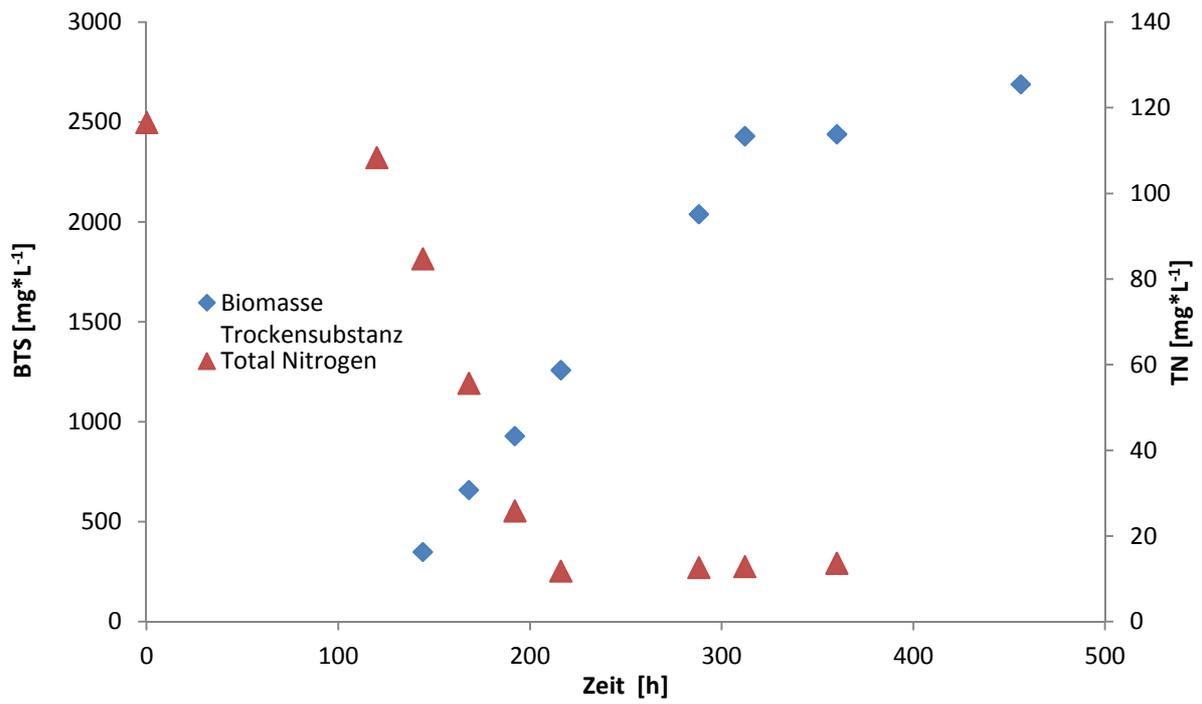


Abbildung 43: Die Biomasse Trockensubstanz bei Photobioreaktor 7 steigt bis auf 2690 mg*L⁻¹.

Bei Photobioreaktor 7 ist der Knick durch den Ausfall der CO₂ Flasche deutlich sichtbar.

4.7. ABSORPTIONSSPEKTREN VERSCHIEDENER CHLORELLA KULTUREN

Chlorella Kulturen, welche mit $0,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$ kultiviert werden, unterscheiden sich deutlich von denen mit $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$. Sie besitzen ein intensiveres Grün und sind dunkler. Anhand von Messungen der Absorptionsspektren wird dieser Effekt gezeigt. Typisch für Grünalgen ist, dass das Absorptionsmaximum bei 680 nm liegt. Bei den folgenden Absorptionsspektren ist ersichtlich, dass die Absorption bei weniger Stickstoff im Medium geringer ist.

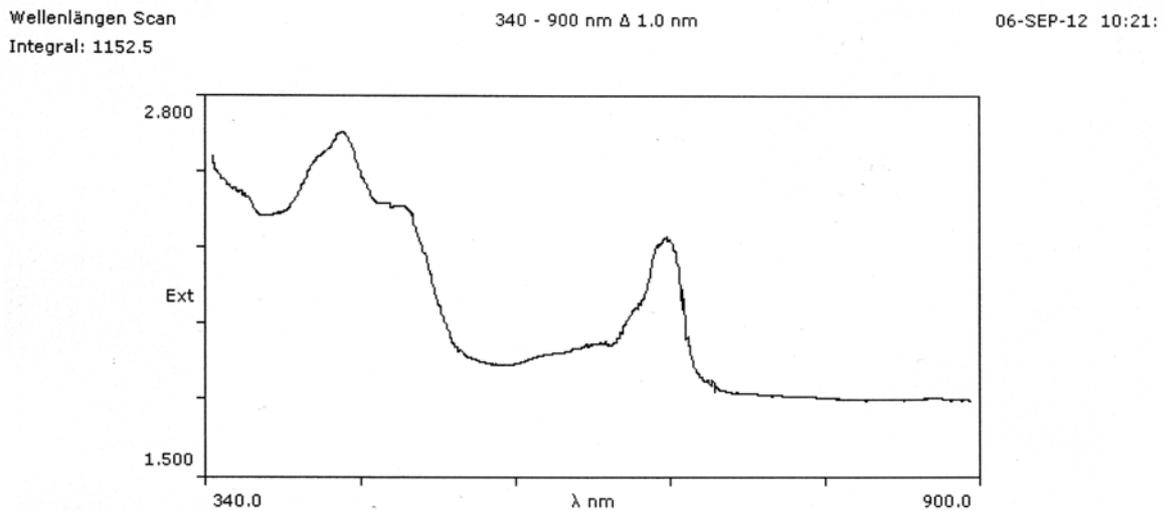


Abbildung 44: Absorptionsspektrum einer Chlorella Kultur mit $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$

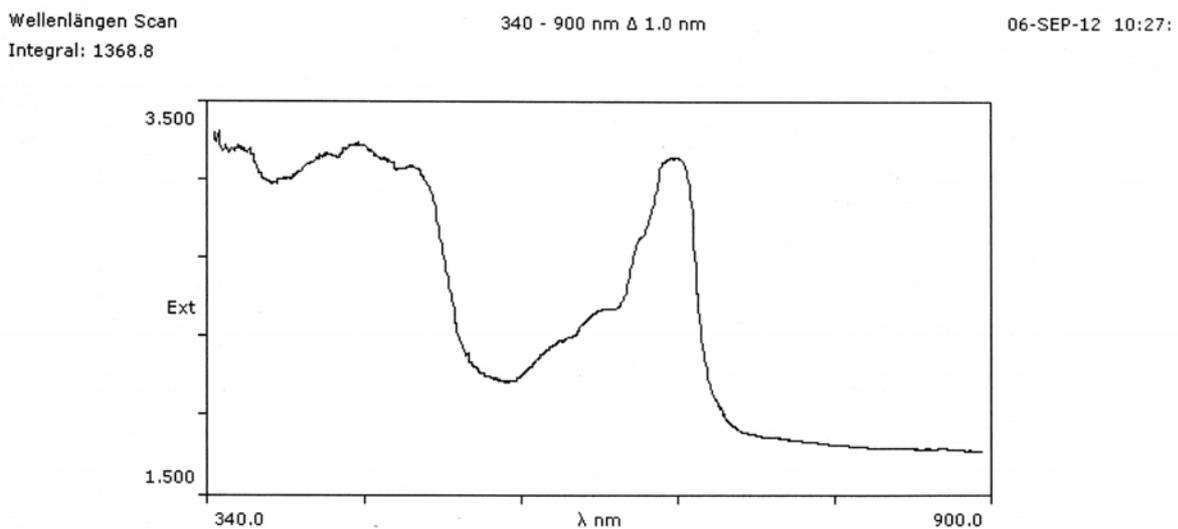


Abbildung 45: Absorptionsspektrum einer Chlorella Kultur mit $0,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$

5. DISKUSSION

5.1. LICHTVERSORGUNG DER ALGENKULTUREN

In dieser Arbeit wurde *Chlorella vulgaris* photoautotroph kultiviert, wobei als einzige Energiequelle Leuchtstoffröhren verwendet wurden. Neben Leuchtstoffröhren können auch LEDs, Metallhalogenlampen und andere künstliche Lichtquellen verwendet werden, jedoch bleiben die hohen Installations- und Betriebskosten ein Hauptproblem (Chen et al., 2011). Um große Mengen Algenbiomasse ökonomisch produzieren zu können, muss Sonnenlicht verwendet werden. Die Sonne scheint gratis und besitzt ein volles Spektrum an Lichtenergie (Chen et al., 2008). Daher werden auch ein Großteil der kommerziell kultivierten Algen in open ponds mit Sonnenlicht kultiviert (Pulz, 2001). Doch die Biomasse Produktion ist in open ponds schwach, denn die Kulturbedingungen lassen sich schwer kontrollieren und der open pond ist anfällig für Kontaminationen. Weiters dringt das Licht nur wenige Zentimeter ein und sorgt aber an der Oberfläche für UV Schädigungen der Zellen (Chen et al., 2008).

Licht hat auch entscheidende Einfluss auf die Stärkekonzentration in den Zellen. Unter normalen Wachstumsbedingungen zeigt die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* einen diurnalen Zyklus der Stärkekonzentration (Ral et al., 2006). Während der Lichtphase wird Stärke gebildet, die in der Dunkelphase wieder abgebaut wird.

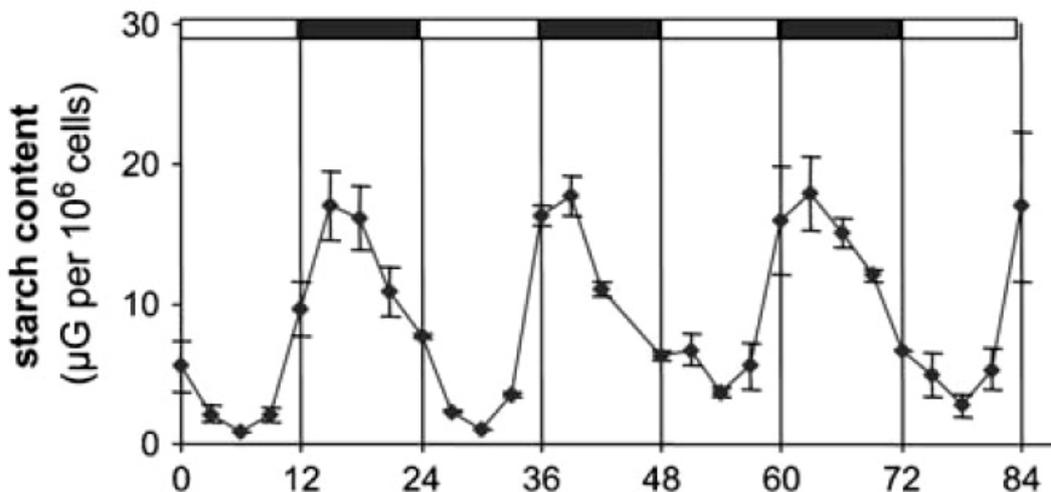


Abbildung 46: *Chlamydomonas reinhardtii* wird unter normalen Bedingungen kultiviert. Stärke wird während der Lichtphase gebildet und während der Dunkelphase abgebaut. (Quelle: Ral et al, 2006)

Wenn die Zellen einem Stickstoffmangel unterliegen, bricht der diurnale Zyklus zusammen und die Stärkekonzentration steigt über einen längeren Zeitraum durch die Bildung von Speicherstoffen an.

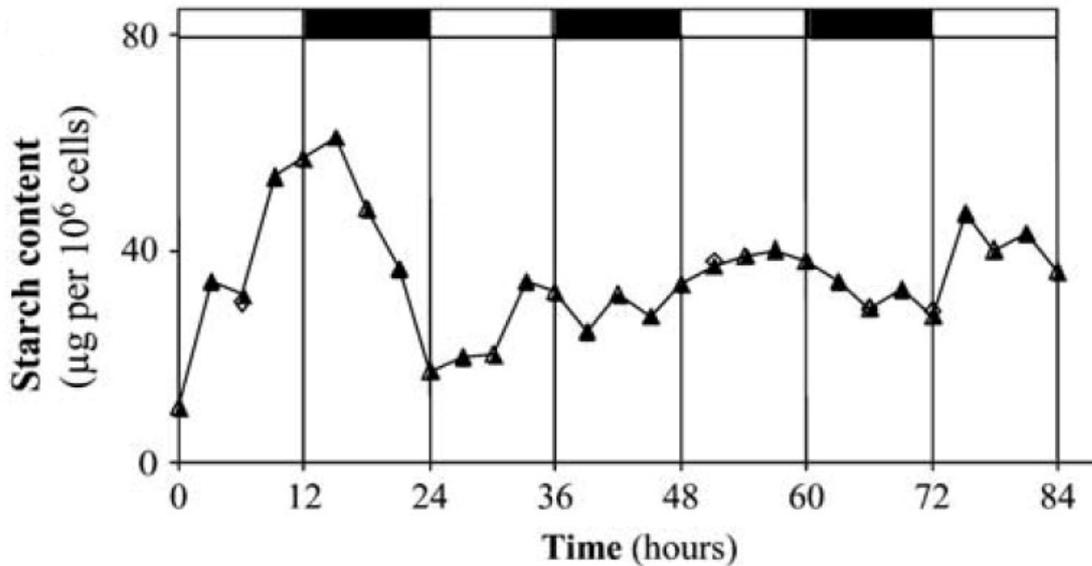


Abbildung 47: *Chlamydomonas reinhardtii* wird unter Stickstoff limitierenden Bedingungen kultiviert. Der diurnale Zyklus bricht zusammen. (Quelle: Ral et al, 2006)

BRANYIKOVA (2010) zeigen den großen Einfluss der Lichtintensität auf den Stärkegehalt. 8.5% Stärke pro Trockensubstanz konnten bei einer Lichtintensität von 215 mmol/(m²s¹) erreicht werden. 40% der Trockenmasse konnten bei 330 mmol/(m²s¹) erreicht werden.

Der diurnale Zyklus konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Grund dafür ist, dass die Analytik nicht derart geringe Konzentrationen erfassen konnte. Erst nach einigen Tagen der Stickstofflimitierung und starker Anreicherung ab etwa 2% der Trockensubstanz konnte Stärke bestimmt werden.

Die verwendeten Leuchtstoffröhren in dieser Arbeit sind als künstliche Beleuchtung für den Laboreinsatz geeignet, jedoch als künstliche Beleuchtung für die großtechnische Produktion auf Grund zu hoher Kosten ungeeignet.

5.2. CO₂ VERSORGUNG DER ALGENKULTUREN

Mikroalgen wie *Chlorella vulgaris* können CO₂ aus verschiedenen Quellen fixieren. Diese sind (1) CO₂ aus der Atmosphäre, welches einen Anteil von 390 ppm ausmacht, (2) CO₂ aus Industrieabgasen mit einem Anteil von maximal 15%, (3) fixiertes CO₂ in Form von löslichen Carbonaten und (4) CO₂ aus Gasflaschen, welches zuvor aus Industrieabgasen aufgereinigt und komprimiert wurde (Wang et al., 2008).

Abbildung 48 zeigt den Vergleich einer (1) Algenkultur mit 5% CO₂ - angereicherter Luft zu einer (2) normal begasten Algenkultur. Bei Stunde 312 hat (1) 1890 mg*L⁻¹ Biomasse gebildet und (2) hat 470 mg*L⁻¹ gebildet. Somit konnte die Produktion um den Faktor 4 erhöht werden und es wird deutlich, dass durch normale Aussenluft wesentlich geringere Produktivitäten zu Stande kommen.

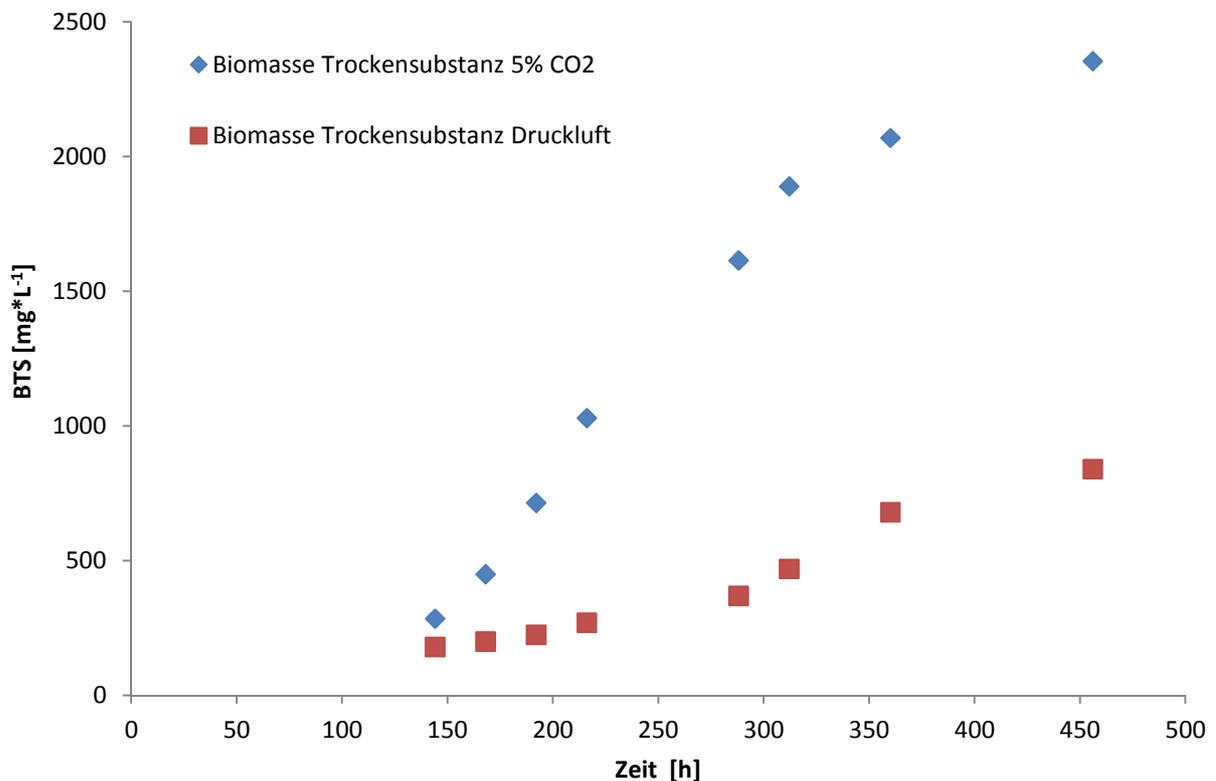


Abbildung 48: Die Biomasse Produktion wird durch CO₂ angereicherte Luft (5%) beachtlich gesteigert. Der Knick in der oberen Kurve kam durch das Ausgehen der CO₂ Flasche zustande. Die untere Kurve zeigt eine Vergleichkultur, welche mit Aussenluft begast wurde.

Für diese Arbeit wurde CO₂ aus Gasflaschen verwendet. Die Kosten für die Abtrennung und Komprimierung von CO₂ in Gasflaschen werden auf 30-50\$ pro Tonne geschätzt (Wang et al., 2008) und sind für eine ökonomische Algenzucht zu hoch. Es bleibt als aussichtsreichste Alternative die direkte Verwendung von Verbrennungsgasen industrieller Anlagen (Douskova, 2009).

5.3. HEKTARERTRÄGE VON MIKROALGEN

Prognosen über mögliche Hektarerträge von Mikroalgen in Photobioreaktoren, insbesondere von Anlagen, die mit CO₂ aus Industriebetrieben gespeist werden, sind aufgrund der sehr geringen Anzahl von derartigen Anlagen und der mangelnden Verfügbarkeit von Daten äußerst unsicher (Rodolfi et al., 2009). Weitestgehend untersucht sind open ponds, deren Produktivität liegt bei 1-25 g/m²/d (Schenk et al., 2008). *Chlorella* sp. erreichte in einem closed pond unter Glashaushbedingungen eine durchschnittliche Produktivität von 13,2 g/m²/d. (Hase et al., 2000). Bei angenommenen 300 Produktionstagen im Jahr, die in tropischen Klimazonen möglich sind, kommt man auf 39,6 Tonnen pro Jahr. Mais hat einen Körnermais Hektarertrag von 8-12 Tonnen pro Jahr (Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Mais>, besucht am 23.08.2013; <http://www.maiskomitee.de/web/public/Fakten.aspx/Statistik/Deutschland/FI%C3%A4chenertr%C3%A4ge> besucht am 23.08.2013). Damit wären Algen in open ponds in der Produktivität Mais überlegen, jedoch ist zu beachten, dass die Ernte von Algen energieaufwendig ist, da große Mengen Wasser entfernt werden müssen. Die Ernte von kann bis zu 30% der Gesamtkosten ausmachen und neue Erntetechnologien sind Gegenstand der Forschung (Mata et al., 2010).

Mit geschlossenen Photobioreaktoren können höhere Produktivitäten erzielt werden, doch auch die Kosten sind wesentlich höher. Die Literatur ist bei den Zahlen uneinheitlich.

Tabelle 10: Biomasse Produktivität von verschiedenen Mikroalgen in geschlossenen Photobioreaktoren (Quelle: Brennan et al., 2010)

Species	Reactor type	Volume (l)	X _{max} (g l ⁻¹)	P _{aerial} (g m ⁻² day ⁻¹)	P _{volume} (g l ⁻¹ day ⁻¹)	PE (%)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Airlift tubular	200	3	-	1.5	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Airlift tubular	200	-	20	1.2	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Airlift tubular	200	-	32	1.9	2.3
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Inclined tubular	6	1.5	-	1.47	-
<i>Arthrospira platensis</i>	Undular row tubular	11	6	47.7	2.7	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Outdoor helical tubular	75	-	-	1.4	15
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Parallel tubular (AGM)	25,000	-	13	0.05	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Bubble column	55	1.4	-	0.06	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Airlift tubular	55	7	-	0.41	-
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Flat plate	440	-	-	0.27	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Flat plate	25,000	-	10.2	-	-
<i>Spirulina platensis</i>	Tubular	5.5	-	-	0.42	8.1
<i>Arthrospira</i>	Tubular	146	2.37	25.4	1.15	4.7
<i>Chlorella</i>	Flat plate	400	-	22.8	3.8	5.6
<i>Chlorella</i>	Flat plate	400	-	19.4	3.2	6.9
<i>Tetraselmis</i>	Column	ca. 1,000	1.7	38.2	0.42	9.6
<i>Chlorococcum</i>	Parabola	70	1.5	14.9	0.09	-
<i>Chlorococcum</i>	Dome	130	1.5	11.0	0.1	-

5.4. EVALUIERUNG DES POLYTHEN LOW-COST PHOTOBIOREAKTOR

Verschiedene Low-Cost Systeme wurden in den letzten Jahren entwickelt (Wijffels et al., 2010). Insbesondere um das Thema Algenbiomasse für die Produktion von Biodiesel hat sich eine lebendige Start-Up Szene entwickelt. Die Aussagen der Start-Ups über die Produktivitäten ihrer Systeme sind jedoch oft wissenschaftlich unhaltbar (Mascarelli, 2009).

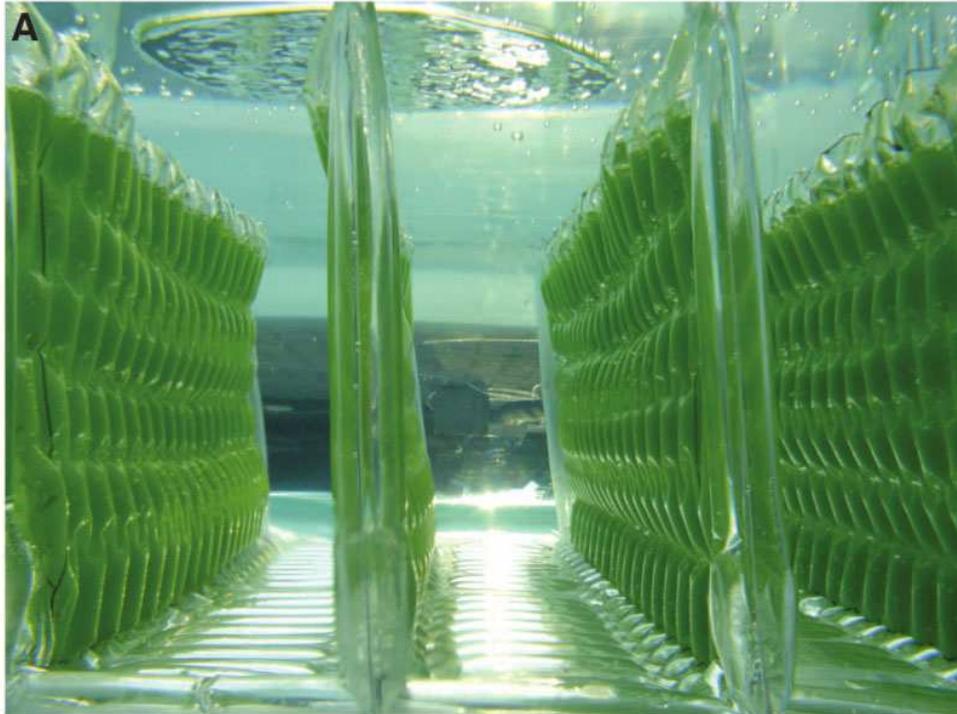


Abbildung 49: Das Start-Up Proviron hat ein System für die Massenkultivierung von Algen entwickelt. Die Reaktoren sind aus Polyethylen und liegen unter Wasser, um nicht zu überhitzen. (Quelle: Wijffels et al., 2009)



Abbildung 50: Photobioreaktoren von Solix Biofuels zur Massenkultivierung von Algen. Die Reaktoren liegen unter Wasser und ähneln dem System von Proviron. (Quelle: Wijffels et al., 2009)

An der Universität Florenz wurde der sogenannte "Green Wall Panel" Photobioreaktor entwickelt. Dieser low-cost Reaktor aus Kunststoff wurde intensiv untersucht und es wird gezeigt, dass bei mediterranem Klima bis zu 20 Tonnen Lipide pro Hektar und Jahr produziert werden können (Rodolfi, 2008).



Abbildung 51: Der "Green Wall Panel" Photobioreaktor an der Universität Florenz. (Quelle: Wijffels et al., 2009)



Abbildung 52: Der in dieser Arbeit entwickelte Photobioreaktor produziert Algenbiomasse. Polyethylen Schlauchfolien sind kostengünstig und leicht zu beschaffen. 8 Leuchtstoffröhren sorgen für eine starke Beleuchtung.

Mit Hilfe von Polyethylen Schlauchfolien können verhältnismäßig günstig Flächen für die Algenzucht genutzt werden. Der Preis der Schlauchfolie liegt bei etwa 10 Cent pro Meter. Um ein 1 Hektar großes Feld damit zu besetzen, wären die Kosten geschätzte 5 000 - 10 000 € hoch. Dazu kommen noch die Stützstrukturen sowie Schläuche für Begasung und Ernte. Die Lebensdauer ist bei der Verwendung spezieller Kunststoffmischungen wie Polyfluoriden sehr hoch. Wie viele Jahre so ein System tatsächlich haltet, kann nur ein Praxistest ermitteln.

Energie- und damit kostenintensiv ist allerdings die Begasung, die für ständige Durchmischung sorgt und einen hohen Gasaustausch ermöglicht. Das System muss bei Hitzetagen und starker Sonneneinstrahlung auch gekühlt werden, was die Kosten weiter erhöht. Beachtliche Kosten würde auch zusätzlich verwendetes CO₂ verursachen, welches aber für höchste Produktivität notwendig ist.

5.5. STICKSTOFFLIMITIERUNG UND STÄRKEPRODUKTION

Durch Stickstofflimitierung stellt *Chlorella vulgaris* wie auch andere Mikroalgen den Stoffwechsel grundlegend um und beginnt mit der Synthese von energiereichen Speicherstoffe wie Stärke und Lipide (Pirt et al., 1977) (Rodolfi, 2009) (Mata et al., 2010) (Brennan et al., 2010) (Brányiková et al., 2010).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Chlorella vulgaris* bis zu einer Grenze von $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Gesamtstickstoff diesen assimilieren kann. Der Stickstoff wurde in Form von Kaliumnitrat zugesetzt, somit gilt diese Grenze für Nitratstickstoff. Kulturen, denen anfangs mehr Nitrat zugesetzt wurde, assimilierten diesen mit der gleichen Rate wie Kulturen mit weniger Stickstoff. Sie waren dadurch zu einem späteren Zeitpunkt limitiert, wie Abbildung 53 zeigt.

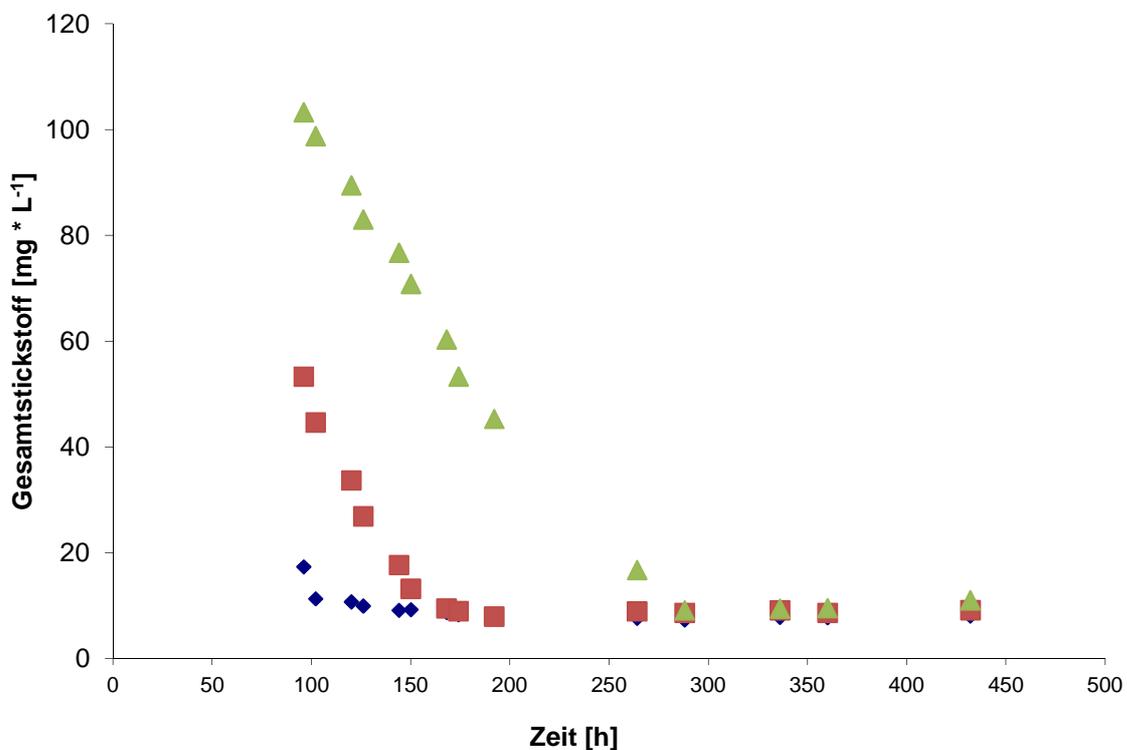


Abbildung 53: 3 Kulturen werden mit unterschiedlichen Stickstoff-Startkonzentrationen angesetzt. Stickstoff aus Kaliumnitrat wird bis zu einer Grenze von $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ assimiliert.

Zwischen Stunde 100 und Stunde 200 wurden die Proben immer um 10h und um 16h gezogen. Bei den Kurven ist ersichtlich, dass während der Lichtphase der Abfall der Stickstoffkonzentration steiler ist. Die Kontrolle des Stickstoffgehalts im Medium ist essentiell, denn ab dem Zeitpunkt der Limitierung beginnt die Alge mit der Produktion Stärke. Neben dem Stickstoffgehalt wurde auch die OD_{680} der Kultur gemessen.

Chlorophyll weist ein Absorptionsmaximum bei 680 nm auf. Diese Absorption korreliert mit dem Stickstoffgehalt, wie in folgender Abbildung ersichtlich ist.

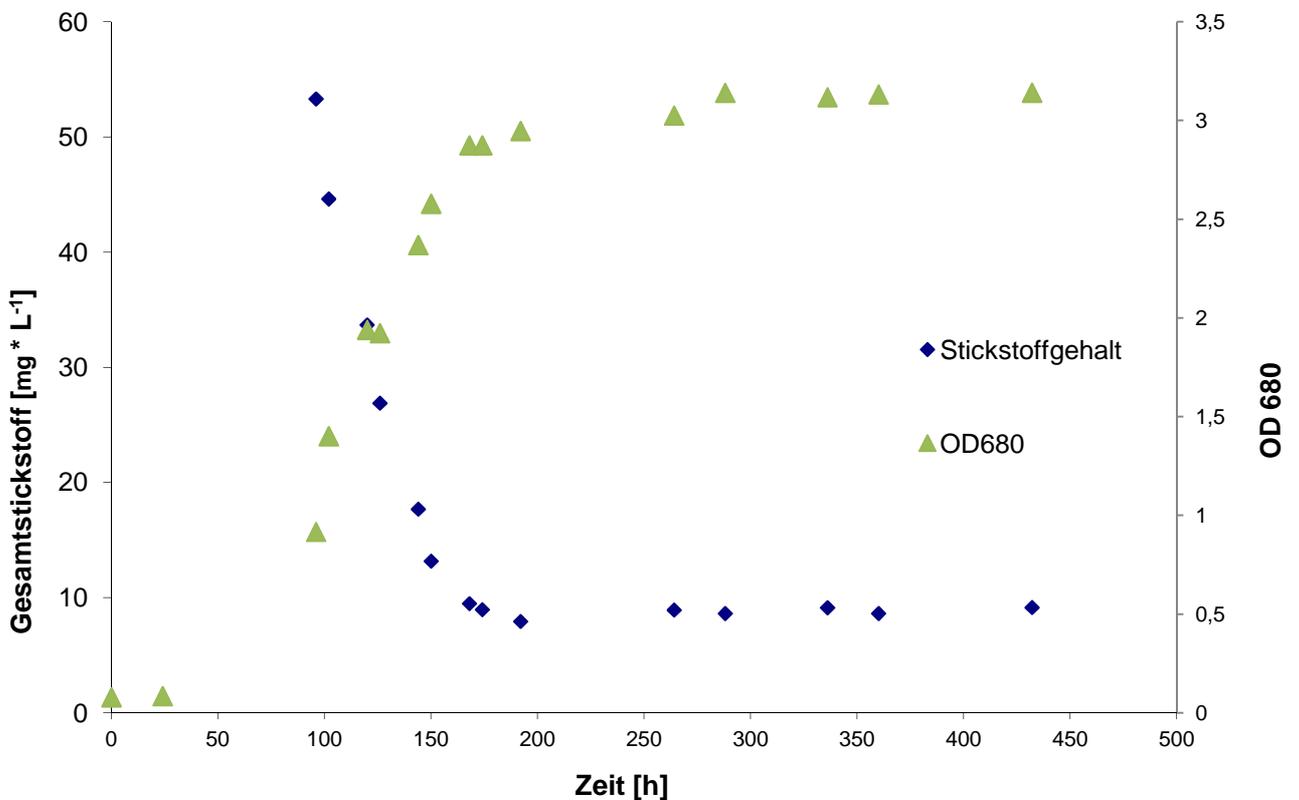


Abbildung 54: Korrelation des Stickstoffgehalts mit der OD₆₈₀ Absorption. Ab dem Zeitpunkt der Stickstofflimitierung bei Stunde 170 bleibt auch die OD₆₈₀ konstant.

Solange der Stickstoffgehalt im Medium fällt, steigt die OD₆₈₀ an. Ab dem Zeitpunkt, ab dem kein weiterer Stickstoff assimiliert werden kann, bleibt auch die OD₆₈₀ konstant. Somit stoppt die Zelle die Synthese von Chlorophyll bei Stickstofflimitierung. Zu diesem Ergebnis kamen auch FERNANDES et al. (2013).

Durch diesen Umstand lässt sich der Zeitpunkt der Stickstofflimitierung mit der sehr einfachen OD₆₈₀ Messung feststellen.

Der Stärkegehalt ist bei der Kultivierung im 1.Hauptversuch bis maximal 9,7% der Biomasse bei PBR5 gestiegen. Den höchsten Gesamtstärkegehalt hatte PBR5 mit 176 mg*L⁻¹ Stärke. In der Literatur werden Stärkekonzentrationen von 50% und mehr beschrieben (Brányiková et al., 2010). Dieser Wert konnte mit 9,7% nicht annähernd erreicht werden. Vermutlich hat die Alge bereits früh mit der Bildung von Lipiden als Speicherstoff begonnen. Durch Lipide kann die Zelle weit mehr Energie speichern als durch Stärke. Auch wurden keine zusätzlichen Anstrengungen unternommen, in den

Stoffwechsel der Alge einzugreifen. Durch verschiedene Kohlenstoffquellen, die man zu bestimmten Zeiten der Kultivierung zusetzt, könnte der Stärkegehalt der Alge erhöht werden (Ball, 1998). Hier ist aber wieder die Gefahr einer Kontamination zu beachten. Die Zellteilung hat entscheidenden Einfluss auf die Stärkeproduktion und durch die Verwendung von Cycloheximid kann der Stärkegehalt weiter erhöht werden (Brányiková et al., 2010). Doch Cycloheximid ist als hochtoxisches Umweltgift völlig ungeeignet für eine Massenkultivierung.

In Abbildung 55 wird der zeitliche Verlauf der Stärkekonzentration bei PBR3 gezeigt. Bei Stunde 336 steigt der Stärkegehalt auf 7,8% der Biomasse. Danach fällt der Stärkegehalt bis zum Ende der Kultivierung auf 5,6%. Lipide konnten in stationären Chlorella Kulturen nachgewiesen werden, wie das Fettsäurespektrum aus Kapitel 4.3 zeigt.

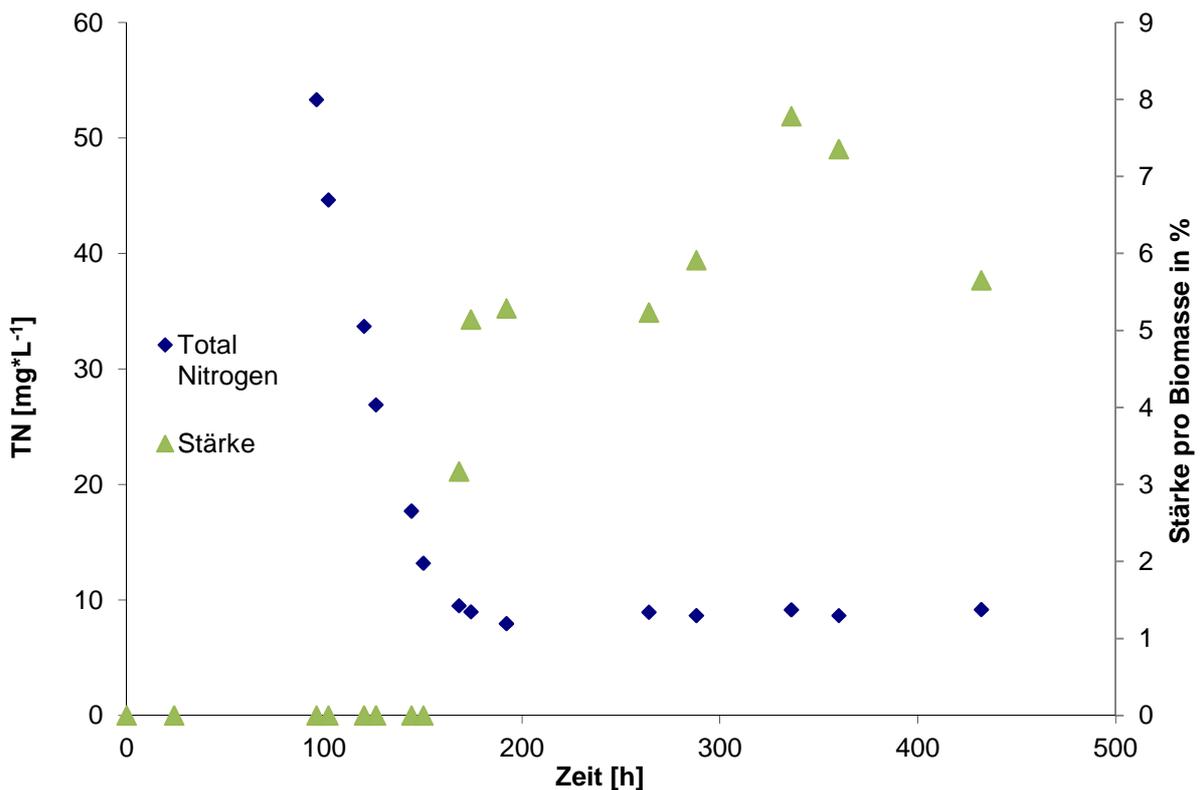


Abbildung 55: Der Gehalt an Stärke pro Biomasse bei Photobioreaktor 3 im zeitlichen Verlauf. Bei Stunde 150 ist die Kultur Stickstoff limitiert und beginnt mit der Synthese von Stärke. Am Ende der Kultivierung sinkt der Stärkegehalt wieder.

Die Vermutung, dass *Chlorella vulgaris* bei Stickstofflimitierung zuerst Stärke bildet und dann mit der Synthese von Lipiden beginnt und daher auch Stärke abbaut, konnte von FERNANDES et al. (2013) belegt werden. Folgende Abbildung zeigt *Parachlorella kessleri* in einem nährstoffarmen Medium (Medium 0,1). Es wird anfangs die Synthese von Stärke bevorzugt bis etwa 30% der Trockensubstanz. Dann produziert die Kultur vermehrt Lipide und baut Stärke gleichzeitig wieder ab. Am 7ten Tag wird die Kultur in ein nährstoffreiches Medium geführt (Medium 1), wodurch es zu einem rapiden Abbau beider Speicherstoffe kommt.

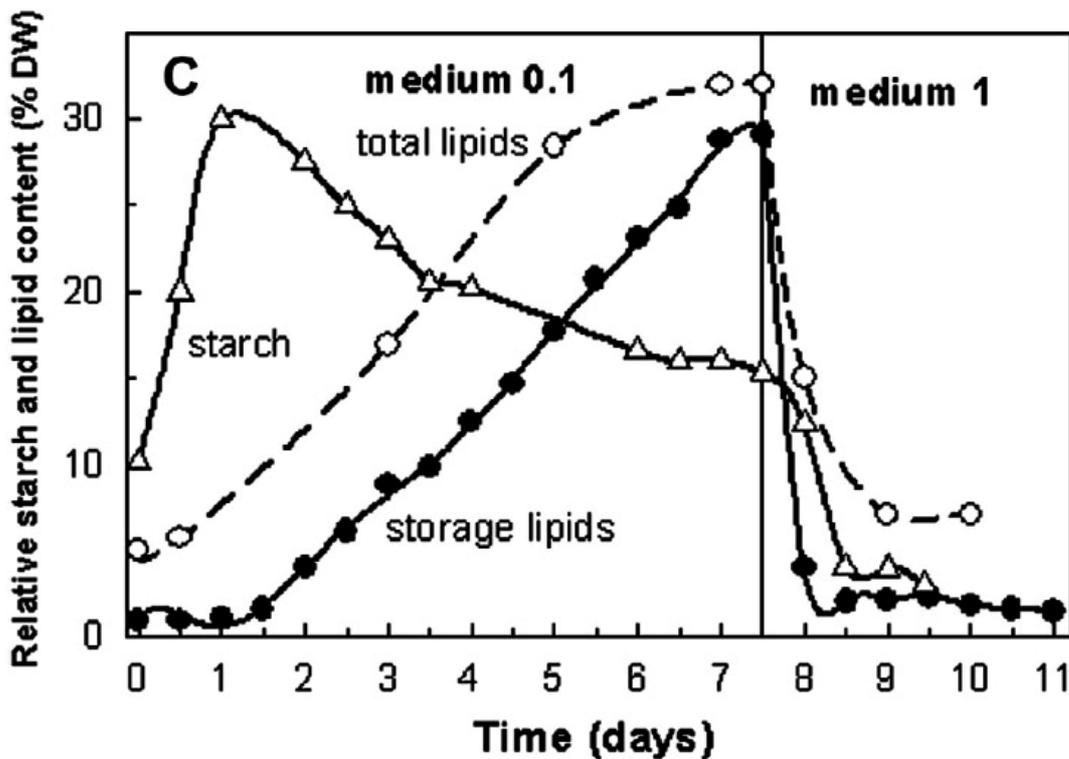


Abbildung 56: *Parachlorella kessleri* wird in einem nährstoffarmen Medium kultiviert (Medium 0,1), wodurch es zur Bildung von Stärke und Lipiden kommt. Bei der Überführung in ein nährstoffreiches Medium (Medium 1) kommt es zu einem rapiden Abbau der Speicherstoffe. (Quelle: Fernandes et al., 2013)

5.6. HANDHABUNG VON PHOTOAUTOTROPHEN MIKROORGANISMEN

Im Laufe der Kulturversuche zeigte sich bald eines der Hauptprobleme in der Handhabung photoautotropher Organismen. Die Wachstumsraten sind verglichen mit *E.coli*, *S.Cerevisiae* oder anderen Heterotrophen sehr gering und Ansätze dauern mehrere Wochen. Diese geringe Wachstumsrate ist vor allem den geringen Gasaustausch zurückzuführen. CO₂ dient den Algen als einzige Kohlenstoffquelle. Somit sind sie Kohlenstoff limitiert, was sich auch am linearen Wachstum der Algen bemerkbar macht. Es werden Versuche unternommen mit Hydrogencarbonat das Wachstum zu beschleunigen. Diese führen jedoch alle zu keinem Wachstum und trüben Ausfällungen im Schüttelkolben.

Weiters hat man sehr dünne Kulturen von meist 0,5 - 3 g*L⁻¹. Dadurch ist wenig Material für Analysen zur Verfügung und es müssen entsprechend große Volumina verwendet werden, um über den langen Zeitraum der Kultivierung laufend Analysen durchführen zu können.

Für eine einzelne BTS Messung muss mindestens 20 mL entnommen werden. Dadurch konnten bei den Kulturen im Schüttelkolben keine BTS-Messungen durchgeführt werden, denn es war nicht ausreichend Volumen vorhanden. Es wurde auf die zeitaufwendige Methode der Zellzahlbestimmung mittels ausgewichen.

Weiters ist auch die lag Phase mit etwa 100 Stunden sehr hoch im Vergleich mit Heterotrophen, deren Gesamtkultivierungsdauer oft nur 100 Stunden beträgt.

5.7. PROBLEME DER ANALYTIK BEIM 2.HAUPTVERSUCH

Zielsetzung des 2. Hauptversuches war, die Handhabung der Photobioreaktoren weiter zu verbessern. Durch mehrere Kultivierungsversuche werden Schwachstellen im System erst offensichtlich. Die Schlauchreaktoren stellten sich im ersten Hauptversuch als teilweise undicht heraus. Von 6 gestarteten Reaktoren konnten nur 4 zu Ende kultiviert werden. Daher werden im 2.Hauptversuch die Schlauchreaktoren am unteren Ende verschweißt. Dadurch konnte tatsächlich Dichtheit sichergestellt werden und alle Reaktoren wurden bis zum Ende kultiviert. Für die Probenahme musste eine Spritze verwendet werden, mit der das Probevolumen angesaugt wurde. Die Schlauchreaktoren wurden durch einen Gasschlauch mit Fritte, der von oben eingeführt wird, begast.

Es haben sich beim 2. Hauptversuch Probleme ergeben, die beim 1. Hauptversuch nicht aufgetreten sind. Die Glucosemessung auf der HPLC hat nur sehr mangelhaft funktioniert. Die Messwerte waren bei niedriger Zellkonzentration gut, sie wurden jedoch bei höherer Zellkonzentration unauswertbar. Der Flowthrough wurde sehr lang und erschien zur gleichen Zeit im Chromatogramm. Im ersten Hauptversuch waren Flowthrough und Glucose Peak nahe und überlappten sich zwar teilweise, konnten jedoch gut ausgewertet werden. Anhand der folgenden Chromatogramme wird das Problem erläutert, dass zu unauswertbaren Glucose Messungen und damit zu keinen Stärkemessungen führte.

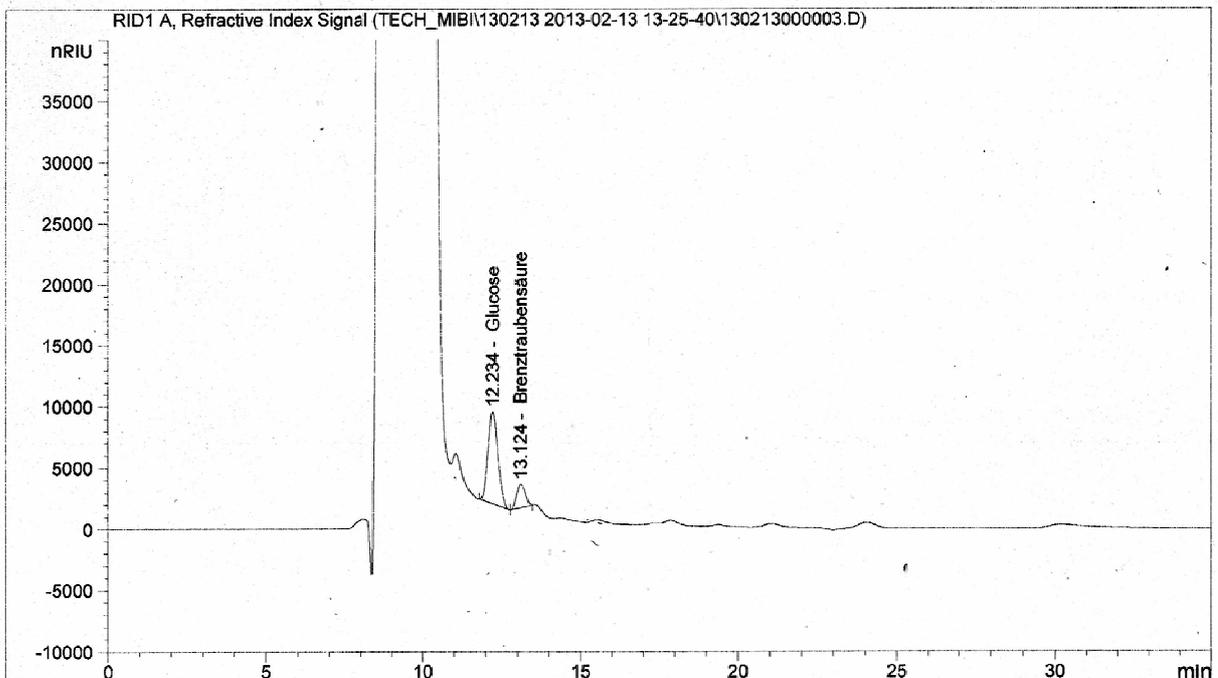


Abbildung 57: Beispiel für ein gut auswertbares Chromatogramm

Diskussion

In Abbildung 57 sieht man ein gut auswertbares Chromatogramm. Der Flowthrough ist klar vom Glucose Peak getrennt. Glucose kommt etwa 2 Minuten nach dem Ende des Flowthroughs. Es handelt sich um eine Probe mit 14 mg Algenbiomasse. Bei dem 1. Hauptversuch waren alle Chromatogramme auswertbar. Bei dem 2. Hauptversuch konnten nur Chromatogramme mit niedriger Zellkonzentration ausgewertet werden. Bei höherer Zellkonzentration überlagerte sich der Flowthrough mit dem Glucose Peak, wie in Abbildung 58 erkennbar ist.

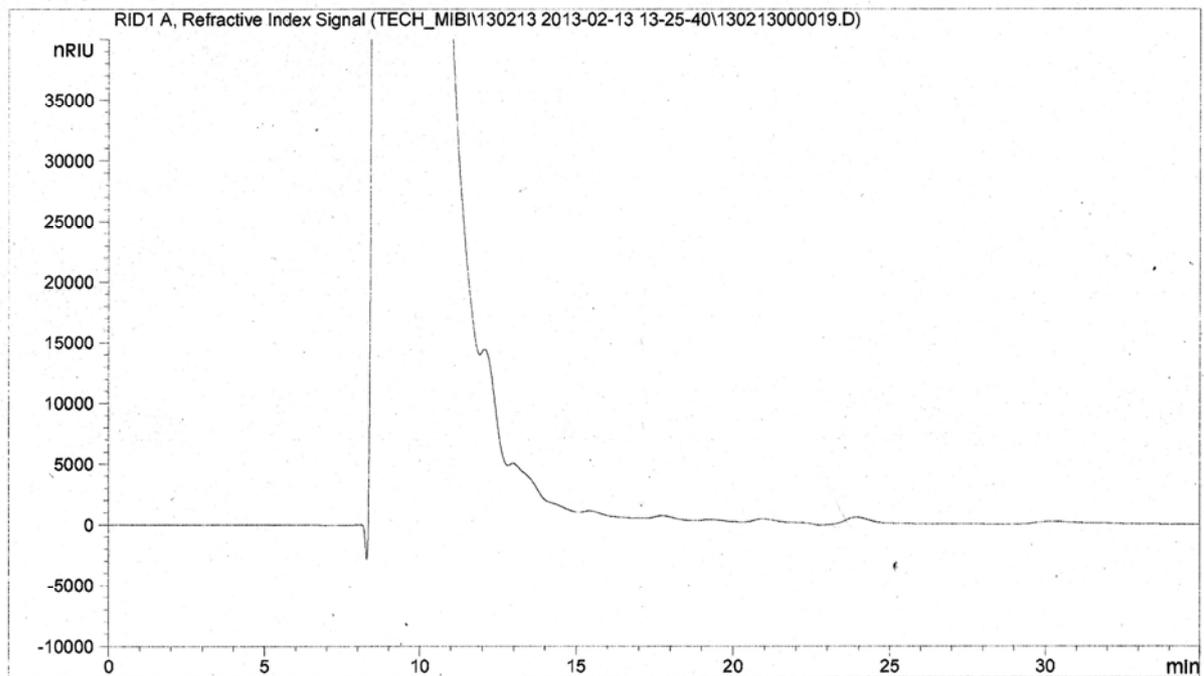


Abbildung 58: Beispiel für ein nicht auswertbares Chromatogramm. Der Glucosepeak ist zwar gut erkennbar (min 12.2), jedoch vom Flowthrough stark überlagert und daher unauswertbar.

Abbildung 58 zeigt ein nicht auswertbares Chromatogramm. Der Glucosepeak ist zwar deutlich sichtbar, jedoch unauswertbar. Glucose kommt bei Minute 12,23. Der Flowthrough hat sich derart verlängert und nach hinten verlagert, dass er den Glucosepeak zu stark überlappt. Es konnte nicht herausgefunden werden, woran diese Verbreiterung des Flowthroughs liegt. Die Bedingungen waren die gleichen wie beim 1. Hauptversuch, dennoch waren beim 2. Hauptversuch Proben mit höherer Zellkonzentration unauswertbar. Oben abgebildetes Chromatogramm zeigt eine Probe mit 19,2 mg Algenbiomasse. Bei 14 mg Algenbiomasse konnte die Messung noch ausgewertet werden, wie in Abbildung 57 ersichtlich ist.

5.8. MIXOTROPHE KULTIVIERUNG VON CHLORELLA

Bei der autotrophen Kultivierung ist CO₂ die einzige Kohlenstoffquelle für den Aufbau der Biomasse. Da sich CO₂ erst im Medium lösen muss und von der Zelle energieaufwendig reduziert wird, sind die Wachstumsraten wesentlich geringer als bei der Verwendung von Kohlenstoffquellen wie Glucose, Acetat oder Glycerin. Glycerin fällt bei der Herstellung von Biodiesel in großen Mengen an und ist aufgrund des niedrigen Preises eine potentiell interessante Kohlenstoffquelle für die Produktion von Algenbiomasse.

Der Versuch, Chlorella mit Glycerin mixotroph zu kultivieren, ist aufgrund einer frühen Kontamination gescheitert. Für organische Kohlenstoffquellen ist die Verwendung eines aseptischen Photobioreaktors notwendig.

5.9. ABSORPTIONSSPEKTREN

In Kapitel 4.7 sind Absorptionsspektren verschiedener *Chlorella* Kulturen abgebildet. Deutlich wird anhand dieser Spektren, dass *Chlorella*, welche früh Stickstoff limitiert ist, deutlich heller ist und daher weniger Licht absorbiert. Die verschiedenen Farben von Stickstoff limitierten Kulturen werden auch in der Literatur beschrieben (Rudolfi et al., 2009) (Fernandes et al., 2013). Eines der Hauptprobleme von Photobioreaktoren ist, dass das Licht nur wenige Zentimeter in das Medium eindringt. Hier könnte die frühe Stickstofflimitierung zu verbessertem Wachstum führen, denn die Biomasse nimmt auch nach der Limiterung noch deutlich zu. Abbildung 59 zeigt, wie die Absorption bei 680 nm Wellenlänge ab Stunde 192 konstant bleibt. Die Biomasse nimmt aber noch stark zu von 800 auf über 2000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

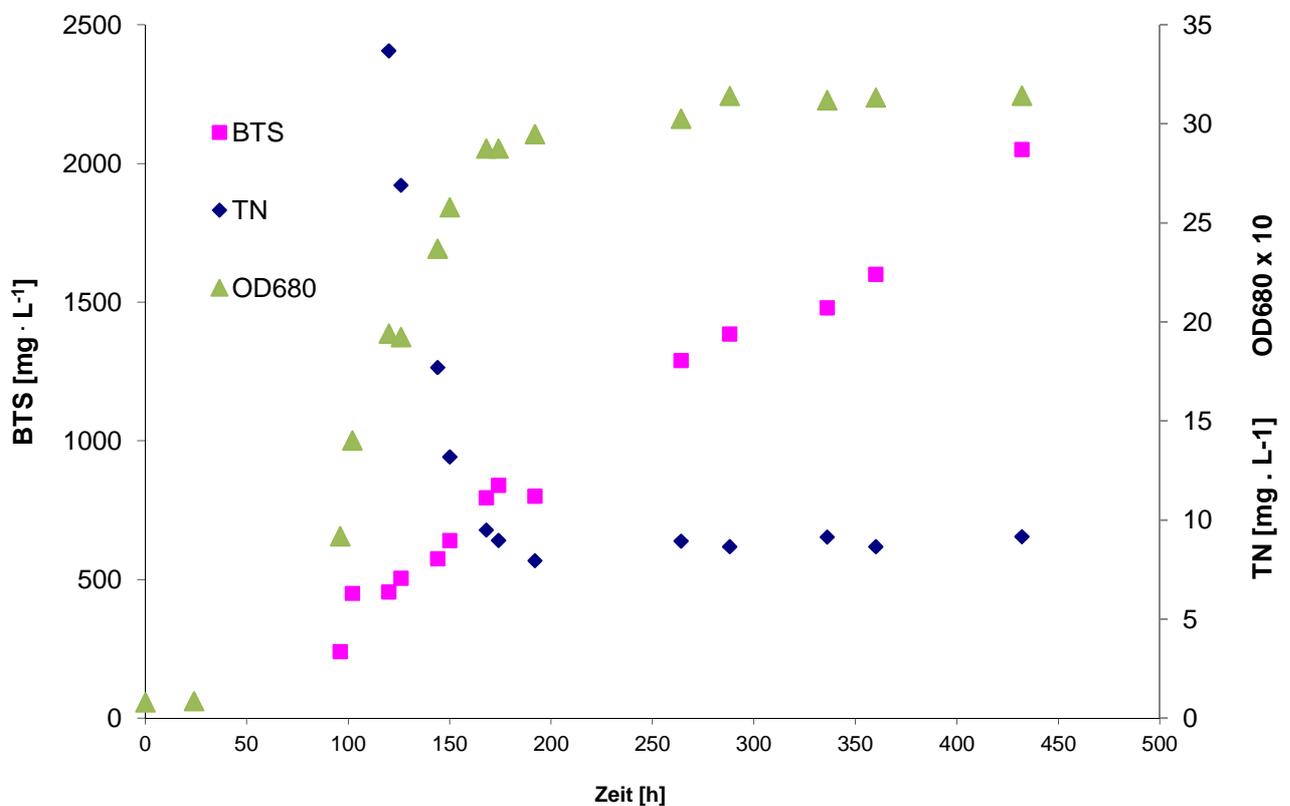


Abbildung 59: Ab Stunde 170 ist die Kultur Stickstoff limitiert und die OD_{680} bleibt konstant. Die Biomasse Trockensubstanz nimmt aber noch stark zu von $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ auf über $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

6. SCHLUSSFOLGERUNG

Die vorliegende Arbeit zeigt, wie Grünalgen photoautotroph in verschiedenen Systemen kultiviert werden können. Chlorella zeigt sowohl in Schüttelkolben als auch in den geplanten und gebauten Polyethen - Photobioreaktoren Wachstum. Verschiedene Kulturmedien werden getestet und ein Medium wird entwickelt, welches sich durch die einfache Handhabung mittels Stammlösungen auszeichnet.

Das Design von Photobioreaktoren ist essentiell für die Massenkultivierung. Es wird bewusst auf Polyethen gesetzt, da es kostengünstig und weit verbreitet ist. Durch eine Begasung mit 5% CO₂ kann das Wachstum deutlich gesteigert werden. Bei den im Labor gebauten Polyethen Reaktoren handelt es sich um begaste Säulen-reaktoren. Die Begasung dient der Durchmischung sowie der Zufuhr von CO₂.

Die Reaktoren sind verhältnismäßig einfach aufgebaut, jedoch ist es nicht möglich, aseptisch zu kultivieren. So führte die mixotrophe Kultivierung mit Glycerin zu Kontamination und Abbruch. Bei autotropher Kultivierung kam es zu keinen Kontaminationsproblemen.

Schwierigkeiten in der Handhabung von photoautotrophen Organismen sind die lange Kultivierungsdauer von 500 Stunden und mehr sowie die geringen Biomasse Konzentrationen von meist unter 3 g*L⁻¹.

Stärke wird von Grünalgen unter Stickstoff limitierenden Bedingungen gebildet. In dieser Arbeit wurde erfolgreich Stärke produziert. Die stärkehaltige Biomasse könnte vielfältig verwendet werden. Beispielsweise könnte sie chemisch hydrolysiert werden zur Produktion von Plattformchemikalien und Feinchemikalien. Man könnte sie auch weiter fermentieren zur Produktion von Biogas oder die Stärke selbst aufreinigen.

Grünalgen haben großes Potenzial für eine "grüne Chemie" der Zukunft zu sorgen. Darunter versteht man eine Industrie, die versucht auf nachhaltige Weise, umweltschonend und energieeffizient Konsumgüter sicherzustellen. Dieses Potenzial ergibt aus der 10-50 fachen Biomasse Produktivität, die Algen verglichen mit Landpflanzen zeigen. Um Algen jedoch konkurrenzfähig einsetzen zu können, müssen in erster Linie die Photobioreaktoren für die Massenkultivierung weiter verbessert werden sowie ökonomische Erntemethoden entwickelt werden.

7. LITERATUR

Acién Fernández, F. ., Hall, D. O., Cañizares Guerrero, E., Krishna Rao, K., & Molina Grima, E. (2003). Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor. *Journal of Biotechnology*, 103(2), 137–152. doi:10.1016/S0168-1656(03)00101-9

Andersen, Robert A. (2005): Algal culturing techniques. Academic Press. ISBN:978-0120884261

Ball, Steven G. (1998): Regulation of Starch Biosynthesis. In *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, pp. 549-567. Kluwer Academic Publishers.

Becker, W.: Microalgae in human and animal nutrition, p. 312–351. In Richmond, A. (ed.), *Handbook of microalgal culture*. Blackwell, Oxford (2004).

Belitz, H.D.; W. Grosch, P.Schieberle (2008): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. ISBN: 978-3-540-73201-3

Brányiková, I., Maršáľková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., & Vítová, M. (2011). Microalgae--novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and bioengineering*, 108(4), 766–76. doi:10.1002/bit.23016

Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009

Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource technology*, 102(1), 71–81. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.159

Choi, S.-L., Suh, I. S., & Lee, C.-G. (2003). Lumostatic operation of bubble column photobioreactors for *Haematococcus pluvialis* cultures using a specific light uptake rate as a control parameter. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(4), 403–409. doi:10.1016/S0141-0229(03)00137-6

Corma, A., Iborra, S., & Velty, A. (2007). Chemical Routes for the Transformation of Biomass into Chemicals.

Domininghaus, Hans; Peter Elsner, Peter Eyerer, Thomas Hirth. (2008):
Kunststoffe, Eigenschaften und Anwendungen
Springer Verlag
EBook-ISBN: 9783540724018
Print-ISBN (Hardback): 9783540724001

Douskova, I., Doucha, J., Livansky, K., Machat, J., Novak, P., Umysova, D., Zachleder, V., et al. (2009). Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(1), 179–85. doi:10.1007/s00253-008-1811-9

Fernandes, B., Teixeira, J., Dragone, G., Vicente, A. a, Kawano, S., Bišová, K., Přebyl, P., et al. (2013). Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. *Bioresource technology*, 144, 268–74. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.096

Field, C. B. (1998). Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science*, 281(5374), 237–240.
doi:10.1126/science.281.5374.237

FSI, Zahlen und Fakten zur Stärke-Industrie 2012, Fachverband der Stärke-Industrie e.V.

Hase, R., Oikawa, H., Sasao, C., Morita, M., & Watanabe, Y. (2000). Photosynthetic production of microalgal biomass in a raceway system under greenhouse conditions in Sendai city. *Journal of bioscience and bioengineering*, 89(2), 157–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16232719>

Lee, E. T.-Y., & Bazin, M. J. (1990). A laboratory scale air-lift helical photobioreactor to increase biomass output rate of photosynthetic algal cultures. *New Phytologist*, 116(2), 331–335. doi:10.1111/j.1469-8137.1990.tb04722.x

Li Y, Horsman M, Wu N, Lan CQ, Dubois-Calero N. Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress* 2008;24(4):815–20.

Mascarelli, A. L. (2009). Gold rush for algae. *Nature*, 461(7263), 460–1.
doi:10.1038/461460a

Mata, T. M., Martins, A. a., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020

Muller-Feuga, A.: Microalgae for aquaculture. The current global situation and future trends, p. 352–364. In Richmond, A. (ed.), *Handbook of microalgal culture*. Blackwell, Oxford (2004).

Ogbonna, J.C., Soejima, T., Tanaka, H., 1999. An integrated solar and artificial light system for internal illumination of photobioreactors. *J. Biotechnol.* 70, 289–297.

Pirt, M. W., & Pirt, S. J. (1977). Photosynthetic production of biomass and starch by *Chlorella* in chemostat culture. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*, 27(6), 643–650. doi:10.1002/jctb.5020270604

Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3), 287–293. doi:10.1007/s002530100702

Ral, J.-P., Colleoni, C., Wattebled, F., Dauvillée, D., Nempont, C., Deschamps, P., Li, Z., et al. (2006). Circadian clock regulation of starch metabolism establishes GBSSI as a major contributor to amylopectin synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology*, 142(1), 305–17. doi:10.1104/pp.106.081885

Richmond, Amos (2004): *Handbook of microalgal culture, biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science, Oxford. 1.ed, ISBN: 9780632059539

Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), 100–12. doi:10.1002/bit.22033

Rubio, F., Fernandez, F., Perez, J., Camacho, F., & Grima, E. (1999). Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. *Biotechnology and bioengineering*, 62(1), 71–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099515>

Torzillo, G., Pushparaj, B., Bocci, F., Balloni, W., Materassi, R., Florenzano, G., 1986. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. *Biomass* 11, 61–74.

Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O., et al. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, 1(1), 20–43.
doi:10.1007/s12155-008-9008-8

Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87–96.
doi:10.1263/jbb.101.87

Tegge, Günther, (2004): Stärke und Stärkederivate. 3. Auflage, Behr's Verlag
ISBN : 978-3-89947-075-8

Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource technology*, 99(10), 4021–8.
doi:10.1016/j.biortech.2007.01.046

Ugwu, C. U., Ogbonna, J. C., & Tanaka, H. (2005). Characterization of light utilization and biomass yields of *Chlorella sorokiniana* in inclined outdoor tubular photobioreactors equipped with static mixers. *Process Biochemistry*, 40(11), 3406–3411. doi:10.1016/j.procbio.2005.01.023

Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(5), 707–18. doi:10.1007/s00253-008-1518-y

Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5993), 796–9. doi:10.1126/science.1189003

Yamaguchi, K. (1997).: Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *J. Appl. Phycol.*, 8, 487–502

8. ANHANG



Maintenance of Cultures

Cultures sent to customers remain alive for at least 14 days provided that the following precautions are observed. Cultures should be unpacked immediately after receipt and stored at 15-18°C under low light intensity (north window, no direct sun light, or weak white fluorescent light). Screw caps or vessels should be loosened but not removed. Further maintenance or multiplication of cultures requires transfer into new culture media. This presupposes experience in simple microbial techniques.

Many species are cultivated and dispatched on agar media for safety reasons but develop their morphological characteristics only in liquid media, e.g. flagellates, colony-forming Volvocales and Chlorococcales. For teaching purposes these species should be transferred into liquid media 2-3 weeks before demonstration, e.g. into Soil Water Media, Basal Medium, or Desmidiacean Medium.

Culture Media

The following media have proved suitable for the maintenance of cultures in test tubes at the SAG for many years. The recipes originate from E. G. Pringsheim and W. Koch, unless stated otherwise. It must be emphasized that the maintenance medium indicated is not always the best medium for the cultivation of a species. There are other media which are just as suitable, e.g. those given in the catalogues of other culture collections of algae (Thompson et al., 1988, Watanabe and Nozaki, 1994, Andersen et al., 1991, Rippka and Herdman, 1992, Starr and Zeikus, 1993). Mass algal culture often requires more concentrated media (for recipes and methods consult Kuhl and Lorenzen, 1964; Starr, 1971; Stein, 1973; Guillard, 1975; Werner, 1982; Castenholz, 1988; Richmond, 2004; Andersen, 2005).

All solutions should be made up with de-ionized water. Media are usually prepared from stock solutions of macronutrients, trace metals, and vitamins which are added to a large proportion of the final volume of water in order to avoid precipitation. Media may be used as liquid or solidified by 1.0-1.5% agar. Before sterilization the agar has to be dissolved in the medium in a steamer. After this test tubes should be filled with 10 ml of the hot medium, closed with cotton plugs, sterilized (usually by autoclaving at 121°C for 15 min.) and may be stored for several weeks, after cooling, in a refrigerator. Solid media for Cyanobacteria are prepared by mixing, after cooling to 50°C, equal volumes of separately autoclaved double strength solutions of the mineral salts medium and either agar to give a final agar concentration of 0.6-1.0 %.



1. Basal Medium (= ES "Erddekot + Salze")

	stock solution [g/100 ml]	nutrient solution [ml]
KNO ₃	1	20
K ₂ HPO ₄	0.1	20
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	20
soil extract *		30
micronutrient solution **		5
de-ionized or distilled water		905

* Preparation of soil extract: Fill a 6 litre flask one third with garden or leaf soil of medium, but not too great humus content which does not contain fertilizers or plant protective agents. Success of soil extract depends on selection of suitable soils. Those with high clay content are usually less satisfactory. Add de-ionized water until it stands 5 cm above the soil and sterilize by heating in a steamer for one hour twice in a 24 h interval. Separate the decanted extract from particles by centrifugation. Fill into small containers of stock solution each of a size appropriate to making a batch of media, autoclave for 20 min at 121°C and store in the refrigerator.

** Preparation of the micronutrient solution:

	stock solution [g/100 ml]	applied solution
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	1 ml
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.1	2 ml
H ₃ BO ₃	0.2	5 ml
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.02	5 ml
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.02	5 ml
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0005	1 ml
de-ionized or distilled water		981 ml
FeSO ₄ · 7H ₂ O		0.7 g
EDTA (Titriplex III, Merck)		0.8 g

Autoclave the components separately in two solutions which are united after cooling.

Solution I: 881 ml distilled water + stock solutions of salts without FeSO₄ + 0.4 g EDTA

Solution II: 100 ml distilled water + 0.7 g FeSO₄ + 0.4 g EDTA

The following modifications of the Basal Medium proved suitable for many strains:

a) Basal Medium with Beef Extract (= ESFL "Erddekot + Salze + Fleisch"): Basal Medium (Medium 1) with 0.1 % beef extract.

b) Basal Medium with Peptone (= ESP "Erddekot + Salze + Peptone"):

Basal Medium (Medium 1) with 0.1% proteose-peptone.

c) Basal Medium with 10 % Euglena Medium and Vitamins (= +V "Erddekot + Salze + Euglena gracilis Medium + Vitamine"):

Basal Medium (Medium 1) plus 10 % Euglena Medium (medium 9) and the vitamins B₁ (5 x

10⁻⁴ g/l) and B₁₂ (5 x 10⁻⁶ g/l), added in sterile solution after autoclaving.



Sammlung von Algenkulturen Göttingen
Culture Collection of Algae

Medium Recipe

Version 03.2007

12. Medium for Unicellular Green Algae (= K "Kuhl")

	[mg/1000 ml]
KNO ₃	1011.1
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	621
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	89
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	14.7
FeSO ₄ · 7H ₂ O (Fe-EDTA complex *)	6.95
H ₃ BO ₃	0.061
MnSO ₄ · H ₂ O	0.169
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.287
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.00249
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.01235

* Preparation of the Fe-EDTA complex: 0.69 g FeSO₄ · 7 H₂O and 0.93 g disodium-salt of EDTA (Titriplex III, Merck) are dissolved in 80 ml of de-ionized or distilled water by boiling for a short time. After the solution has cooled down to room temperature it is made up to 100 ml. It contains in 1 ml the amount of iron stated above.

Ref.: Kuhl, A. and Lorenzen, H. - Handling and culturing of Chlorella. In: D. M. Prescott, ed., Methods in cell physiology. Vol. I, p. 152-187, Academic Press, New York and London, 1964.



References

- Andersen, R.A.; Jacobson, D.M. & Sexton, J.P. – Provasoli-Guillard Center for Culture of Marine Phytoplankton. Catalogue of Strains. 98pp. West Boothbay Harbor, Maine, USA, 1991.
- Andersen, R.A.; Morton, S. L. & Sexton, J.P. – Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton. 1997 List of Strains. J. Phycol. 33 (suppl): 1-75, 1997.
- Castenholz, R.W. – Culturing methods for Cyanobacteria. In: L. Packer and A.N. Glazer, eds., Cyanobacteria. Methods of Enzymology 167 (1988), 68-93.
- Guillard, R.R.L. – Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W.L. Smith and M. H. Chanley, eds., Culture of marine invertebrate animals. pp.29-60, Plenum Book Publ. Corp., New York, 1975.
- Kuhl, A. & Lorenzen, H. – Handling and culturing of *Chlorella*. In: D.M. Prescott, ed., Methods in cell physiology. Vol.1, pp. 152-187, Academic Press, New York and London, 1964.
- Rippka, R. & Herdman, M. – Pasteur Culture Collection of Cyanobacterial Strains in Axenic Culture. Vol.1, Catalogue of strains. 103pp., Institut Pasteur, Paris, France, 1992.
- Starr, R.C. – Algal Cultures – sources and methods of cultivation. In: A. San Pietro, ed., Photosynthesis. Part A, pp. 29-53, Methods in Enzymology vol. 23, Academic Press, New York, 1971.
- Starr, R.C. & Zeikus, J.A. – UTEX – The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. J. Phycol. Suppl. 29 (1993).
- Stein, J.R. ed. – Handbook of phycological methods. Culture Methods and growth measurements, pp. 448, Cambridge at the University Press, London, New York, 1973.
- Thompson, A.S.; Rhodes, J.C. & Pettman, I. – Culture Collection of Algae and Protozoa. Catalogue of strains. 164pp., Natural Environment Research and Council, England, 5th edit., 1988.
- Watanabe, M.M. & Nozaki, H. – NIES-Collection. List of strains, microalgae and protozoa. 4th edit., 127pp. The National Institute for Environmental Studies, Japan, 1994.
- Werner, D. – Biologische Versuchobjekte. Kultivierung und Wachstum ausgewählter Versuchsorganismen in definierten Medien. 432pp. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1982.

Further recommended literature about culturing algae:

- Andersen, R.A. (ed.) (2005) Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, Burlington. ISBN 0-12-088426-7.**
- Belcher & Swale (1982) Culturing Algae - a guide for schools and colleges. ISBN 1-871105-04-8 (ask for at ccap@sams.ac.uk). (Currently unavailable).
- Isaac & Jennings (1995) Microbial Culture. Bios Scientific Publ., Oxford. ISBN 1-872748-92-9.**
- Richmond (ed.) (2004) Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publ., London. ISBN 0-632-05953-2.**
- Streble & Krauter (2006) Das Leben im Wassertropfen. Kosmos (Franckh-Kosmos), Stuttgart. ISBN 3-440-10807-4.

