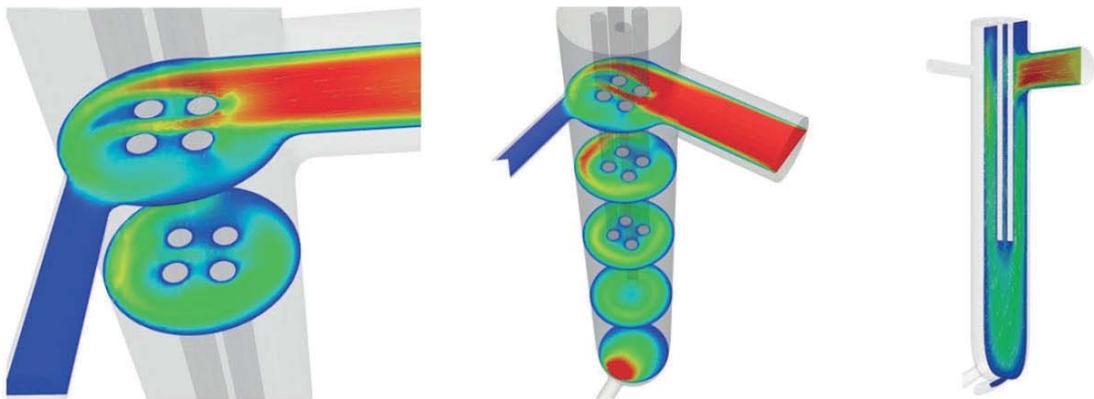


Stephan Alexander Kuhne

Fermentation von phototrophen Organismen zur Produktion von biotechnologischen Wertstoffen



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Fermentation von phototrophen Organismen
zur Produktion von biotechnologischen Wertstoffen





Fermentation von phototrophen Organismen zur Produktion von biotechnologischen Wertstoffen

Dem Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik
der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

von

Herrn

Dipl. Biol. Stephan Alexander Kuhne

aus Düren

Datum der mündlichen Prüfung:	21.07.2015
Dekan:	Prof. Dr. Christian Schindler
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Hans-Jörg Bart
Begutachter:	Prof. Dr. Roland Ulber Prof. Dr. Christoph Syldatk Prof. Dr. Kai Muffler

Kaiserslautern, 2015

D 386



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2015

Zugl.: (TU) Kaiserslautern, Univ., Diss., 2015

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2015

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2015

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9079-1

eISBN 978-3-7369-8079-2



„Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.“

Albert Einstein





Für meine Eltern





Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulber dafür bedanken, dass er mir ermöglicht hat ein spannendes Thema im Rahmen der Promotion an seinem Lehrstuhl zu bearbeiten. Dabei habe ich es als besonders angenehm empfunden, die erforderlichen Arbeitspakete selbständig zu priorisieren, neue hinzuzunehmen und offensichtliche Sackgassen nicht zwingend bis zum Ende erkunden zu müssen. Darüber hinaus kam es mir persönlich sehr entgegen, in einem interdisziplinären Projekt zusammen mit dem Lehrstuhl für Experimentelle Ökologie zu arbeiten, da ich hierdurch stets Anknüpfungspunkte zu meinem vorherigen Studium hatte und nicht völlig in das kalte Wasser der Verfahrenstechnik gestoßen wurde. An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Lakatos bedanken, der mir von der biologischen Seite aus stets mit Rat und Tat zur Seite stand, immer ein offenes Ohr für mich hatte und mit vielen guten Ideen zum Erfolg meiner Promotion beigetragen hat. Gleiches gilt für Herrn Prof. Dr. Muffler, der als damaliger Gruppenleiter der Bioverfahrenstechnik mein erster Ansprechpartner war. Egal was es für Fragen gab, er hatte immer für mich Zeit und stets gute Vorschläge zur Verbesserung. Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Sylatk für seine Arbeit und Mühe zur Berichterstattung dieser Arbeit bedanken, sowie bei Herrn Prof. Dr. Bart für den Vorsitz.

Weiterhin gilt mein Dank natürlich den übrigen Kollegen des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik, welche mich als Neankömmling nicht nur mit offenen Armen aufgenommen haben, sondern durch ihre Freundlichkeit ein Arbeitsklima geschaffen haben, welches man sich zur Promotion nur wünschen kann. Besonders möchte ich hier Alexander Thiel, Aline Pasteur, Steffen Wollny, Thomas Hering und Christin Schlegel erwähnen, mit denen ich auch neben der Arbeit viele schöne Stunden verbracht habe.

Zudem möchte ich allen Studenten danken, die durch ihre Arbeit zu dieser Promotion beigetragen haben. Hier möchte ich besonders Frau Dorina Strieth und Herr Andreas Weber erwähnen, die mir während mehrerer Arbeiten treu geblieben sind und viele gute Ergebnisse geliefert haben.

Besonderer Dank gebührt natürlich Dir, Jenny, da Du mir immer zur Seite gestanden und gerade in der letzten Zeit der Promotion auch selbst häufig zurückgesteckt hast. Einen besseren Partner an meiner Seite kann ich mir für zukünftige Projekte nicht vorstellen!

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Danke, dass Ihr mich immer unterstützt und den nötigen Rückhalt gegeben habt, um gut zehn Jahre Studium und Promotion durchführen zu können. Ohne Euch wäre ich heute nicht da wo ich jetzt bin!



Kurzzusammenfassung

Die Kultivierung von verschiedenen Organismen in Photobioreaktoren gerät in jüngster Zeit immer stärker in den Fokus der Forschung, da Licht bei vielen Stoffwechselprozessen eine Rolle spielen kann. Darüber hinaus sind viele phototrophe Organismen aufgrund ihrer aufwendigeren Kultivierung noch nicht so gut untersucht worden. Deshalb wurde am Beispiel der Herstellung der pharmazeutisch interessanten Vertreter aus der Gruppe der Triterpene aus *Salvia officinalis* untersucht, welche Auswirkung Licht auf die Synthese der Triterpensäuren Oleanol- und Ursolsäure hat. Für die Untersuchung wurden zwei genetisch optimierte Klone von *Salvia officinalis* verwendet, bei verschiedenen Lichtstärken und in verschiedenen Bioreaktoren charakterisiert und mit einer heterotrophen Kultivierung verglichen. Maximal konnten bei einer mixotrophen Kultivierung und einer Lichtstärke von $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ $2,1 \text{ mg g}^{-1}$ BTM Oleanolsäure und $4,3 \text{ mg g}^{-1}$ BTM Ursolsäure produziert werden. Dies entspricht einer Produktivität von $0,06$ bzw. $0,12 \text{ mg L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und ist deutlich höher als die durch heterotrophe Kultivierung erreichten Produktivitäten. Bislang wurde laut Literatur nur eine Konzentration von $400 \mu\text{g g}^{-1}$ BTM Ursolsäure aus einer mixotrophen Suspensionskultur von *Salvia officinalis* erreicht, was einer Produktivität von $0,04 \text{ mg L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ entspricht (Bolta et al. 2000). Diese konnte demnach um das Dreifache gesteigert werden.

Terrestrische Cyanobakterien spielen bei der Produktion von biotechnologischen Wertstoffen momentan kaum eine Rolle. Dies liegt hauptsächlich daran, dass die Organismen unter submersen Bedingungen wachstumslimitiert sind und eine Kultivierung daher ineffizient ist (Kumar et al. 2010, Malcata 2011). Deshalb wurde ein neuer emerser Photobioreaktor entwickelt, mit dem es möglich ist, terrestrische Organismen unter naturähnlichen Bedingungen zu kultivieren und ihr breites Spektrum an biologisch aktiven Substanzen zu erschließen. Dazu gehören u.a. extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), die von pharmazeutischem Interesse sind und in dieser Arbeit stellvertretend untersucht wurden. Für die Versuche wurden zwei terrestrische Cyanobakterien (*T. sociatus* und *N. muscorum*) aus ariden Habitaten verwendet. Die Wachstumsraten beider Organismen konnten durch die Kultivierung in dem entwickelten emerseren Photobioreaktor von $0,14$ und $0,12 \text{ h}^{-1}$ auf $0,19$ bzw. $0,21 \text{ h}^{-1}$ gesteigert werden. Hinsichtlich der EPS-Produktion wurden maximal $0,499 \text{ g g}^{-1}$ EPS BTM und eine Produktivität von $4,94 \cdot 10^{-4} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei *T. sociatus*, sowie $0,38 \text{ g g}^{-1}$ EPS BTM und eine Produktivität von $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei *N. muscorum* ermittelt. Die höchste submerse Produktivität lag im Vergleich dazu bei $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (*N. muscorum*). Somit ist es gelungen, Produktivitäten in



der Größenordnung von marinen Cyanobakterien zu erreichen und auch terrestrische Cyanobakterien effizient zu nutzen.

Abstract

The cultivation of different organisms in photobioreactors is increasingly often subject of research because light can have a significant effect on many metabolic processes. In addition, many phototrophic organisms have not yet been thoroughly studied, due to their complicated cultivation. Therefore, the effect of light on the synthesis of pharmaceutically interesting triterpenes was examined using the example of suspension cultures from *Salvia officinalis*. Two previously genetically optimized clones of *Salvia officinalis* were characterized at different light intensities with respect to their triterpene production (using different bioreactor-systems) and compared with a heterotrophic cultivation of the cells. The maximal product concentration of 2.1 mg g⁻¹ DW oleanolic acid and 4.3 mg g⁻¹ of DW ursolic acid was produced using a mixotrophic cultivation and a light intensity of 100 μE m⁻² s⁻¹. This corresponds to a productivity of 0.06 and 0.12 mg L⁻¹ h⁻¹ and is significantly higher than the productivities achieved by heterotrophic cultivation. So far a concentration of only 400 μg g⁻¹ of DW ursolic acid and a corresponding productivity of 0.04 mg L⁻¹·h⁻¹ has been reported, also using a mixotrophic suspension culture of *Salvia officinalis* (Bolta et al., 2000). The productivity could therefore have been increased by three times.

Terrestrial cyanobacteria are currently playing a minor role in the production of biotechnological value-added products. This is due to the fact that these organisms are limited in growth when cultivated under submerged conditions, which makes a cultivation inefficient (Kumar et al. 2010, Malcata 2011). Therefore, a new emerged photo-bioreactor was developed, with which it is possible to cultivate terrestrial organisms under natural-like conditions and to use their untapped source of biologically active substances. These include extracellular polymeric substances (EPS), which are of pharmaceutical interest and have been studied in an exemplary manner. For all experiments two terrestrial cyanobacteria (i.e. *T. sociatus* and *N. muscorum*) from arid habitats were used. The growth rates of both organisms could be increased using the novel emerged photobioreactor from 0.14 and 0.12 h⁻¹ up to 0.19 and 0.21 h⁻¹ respectively. With respect to the EPS production a maximum of 0.499 g g⁻¹ EPS DW and a productivity of 4.94 · 10⁻⁴ g L⁻¹ h⁻¹ has been found regarding *T. sociatus* and 0.38 g g⁻¹ EPS DW and a productivity of 3.0 · 10⁻⁴ g L⁻¹ h⁻¹ regarding *N. muscorum*. The highest productivity using submerged cultivation was found to be 1.9 · 10⁻⁴ g L⁻¹ h⁻¹ (*N. muscorum*) in comparison. Thus, it has been possible to achieve productivities in the same order of magnitude as marine cyanobacteria and further more to cultivate terrestrial cyanobacteria efficiently.



Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungen	IX
Formelzeichen	X
1. Einleitung	1
2. Fermentation von <i>Salvia officinalis</i> zur Gewinnung von biotechnologischen Wertstoffen	3
2.1 Einleitung und Zielsetzung	3
2.2 Stand der Technik zur Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i>	4
2.3 Theoretische Grundlagen	5
2.3.1 <i>Salvia officinalis</i>	5
2.3.2 Photosynthese	6
2.3.2.1 Lichtreaktion	6
2.3.2.2 Dunkelreaktion	8
2.3.2.3 Lichtstärke	9
2.3.3 Kultivierung von Pflanzenzellen	9
2.3.3.1 Produktion von Sekundärmetaboliten	10
2.3.3.2 Kultivierungsbedingungen	10
2.3.3.3 Auswahl von Stämmen	11
2.3.3.4 Precursor-Zugabe	11
2.3.3.5 Elicitoren	12
2.3.3.6 Aggregatbildung	13
2.3.3.7 Begasung	13
2.3.3.8 Scherstress	14
2.3.3.9 Verwendete Kultivierungsstrategien	14
2.3.4 Triterpene	16
2.4 Verwendete Stämme von <i>Salvia officinalis</i> (inkl. gen. Modifizierungen)	17
2.5 Mixotrophe Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i> bei verschiedenen Lichtstärken	20
2.5.1 Kultivierung im Schüttelkolben	20
2.5.2 Kultivierung im Wavebag-Reaktor	28
2.5.3 Kultivierung auf Agarplatten	32
2.6 Vergleich mit heterotropher Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i>	34
2.6.1 Vergleich der Wachstumsraten	34
2.6.2 Vergleich der erhaltenen Biomasse	36
2.6.3 Vergleich der erhaltenen Triterpene	37
2.6.4 Vergleich der Produktivität	38
2.7 Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i> in Pektinase-haltigen Kultursuspensionen	42
2.7.1 Vergleich der erhaltenen Biomasse	42

2.7.2	Vergleich der erhaltenen Triterpene	43
2.7.3	Vergleich der Produktivität.....	44
2.8	Zusammenfassung.....	45
3.	Fermentation von Cyanobakterien zur Gewinnung von biotechnologischen Wertstoffen	49
3.1	Einleitung und Zielsetzung	49
3.2	Stand der Technik	50
3.2.1	Photobioreaktoren.....	50
3.2.1.1	Open Ponds	51
3.2.1.2	Raceway Ponds	51
3.2.1.3	Rohrreaktoren.....	52
3.2.1.4	Platten-Photobioreaktoren.....	53
3.2.1.5	Folienreaktor	54
3.2.1.6	Rührkessel aus Glas	55
3.2.1.7	Blasensäulen.....	55
3.2.1.8	Rührkessel	55
3.2.1.9	Zentrifugalreaktor.....	56
3.2.1.10	Fazit.....	56
3.2.2	Kultivierung von Cyanobakterien.....	57
3.3	Theoretische Grundlagen	58
3.3.1	Cyanobakterien	58
3.3.2	Terrestrische Cyanobakterien	60
3.3.3	Wachstumsfaktoren	60
3.3.3.1	Wachstum.....	61
3.3.3.2	Licht	63
3.3.3.3	Kohlenstoffdioxid.....	65
3.3.3.4	pH-Wert.....	67
3.3.3.5	Temperatur	68
3.3.3.6	Mineralsalze	69
3.3.3.7	Wasser	70
3.3.4	Biotechnologische Wertstoffe	70
3.3.4.1	Biomasse	70
3.3.4.2	Photopigmente.....	71
3.3.4.3	Antivirale Wirkstoffe	71
3.3.4.4	Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS).....	71
3.3.4.5	Weitere	74
3.3.5	Kultivierung von terrestrischen Cyanobakterien	74
3.3.5.1	Leistungseintrag und mechanische Belastung.....	74
3.3.5.2	Sauerstofftransferrate OTR	75
3.3.5.3	Verwendete Kultivierungsstrategien	76
3.3.6	Statistische Versuchsplanung	79
3.4	Verwendete Organismen.....	82
3.5	Untersuchung und Optimierung der wesentlichen Wachstumsfaktoren	84
3.5.1	Untersuchung des Leistungseintrages.....	84
3.5.2	Untersuchung des pH-Wertes	88
3.5.3	Untersuchung der Temperatur	91
3.5.4	Untersuchung der Lichtstärke.....	94



3.5.5	Untersuchung des CO ₂ -Gehaltes	96
3.6	Modellierung des Wachstums in Abhängigkeit der oben genannten Parameter.....	99
3.6.1	Mathematische Beschreibung der experimentell bestimmten Daten ohne Berücksichtigung von Interaktionen.....	99
3.6.2	Bestimmung der Wechselwirkungen zwischen den Parametern durch DoE.....	104
3.6.3	Mathematische Beschreibung der experimentell bestimmten Daten mit Berücksichtigung von Interaktionen.....	111
3.7	Untersuchung und Optimierung des emersen Wachstums mit DoE.....	115
3.8	Entwicklung eines emersen Photobioreaktors (ePBR)	119
3.8.1	Konzept und Design des ePBR.....	119
3.8.2	Anschlüsse und Sensorik	122
3.8.3	Charakterisierung der Oberflächen.....	123
3.8.4	Lichtversorgung.....	125
3.8.5	Erzeugung des Aerosols	127
3.8.6	Temperatur und Luftfeuchtigkeit.....	128
3.8.7	CFD-Simulation.....	130
3.8.8	Fließschema	131
3.9	Fermentation mit dem ePBR.....	132
3.9.1	Methodik der Kultivierung mit dem emersen Photobioreaktor	132
3.9.2	Untersuchung der Wachstumsraten	133
3.9.3	Untersuchung der Pigment-Synthese.....	136
3.9.4	Untersuchung der EPS-Produktion.....	138
3.9.5	Direkte EPS-Isolierung von der Kultivierungsoberfläche	141
3.10	Produktion von biotechnologischen Wertstoffen.....	142
3.10.1	Biomasse.....	142
3.10.2	Photopigmente	144
3.10.3	EPS	147
3.10.3.1	Einfluss des pH-Wertes auf die EPS-Produktion.....	147
3.10.3.2	Optimierung der submersen EPS-Produktion mit DoE.....	149
3.10.3.3	Vergleich der submersen und emersen EPS-Produktion	152
3.10.3.4	Vergleich der Zusammensetzung der unter submersen und emersen Bedingungen gebildeten EPS	154
3.11	Zusammenfassung.....	156
4.	Diskussion und Ausblick	159
5.	Literaturverzeichnis	161
	Anhang	183
A	Methodenteil.....	183
A.1	Bestimmung von verfahrenstechnischen Parametern	183
A.1.1	Bestimmung des Leistungseintrages.....	183
A.1.1.1	Rührkessel	183
A.1.1.2	Blasensäule.....	184
A.1.1.3	Schüttelkolben.....	184
A.1.1.4	Wavebag-Reaktor.....	185

A.1.2	Bestimmung des k_{La} -Wertes	186
A.1.3	Sauerstofftransfer rate OTR (Oxygen Transfer Rate)	190
A.1.4	Bestimmung der Beleuchtungsstärke	192
A.1.5	Bestimmung der Oberflächenrauheit	192
A.1.6	Berechnung der CO_2 -Löslichkeit nach Weisenberger	192
A.2	Methodenteil Pflanzenzellkultivierung	195
A.2.1	Stammhaltung	195
A.2.2	Ansetzen der Vorkulturen	195
A.2.3	Animpfen der Hauptkulturen	195
A.2.4	Probennahme	195
A.2.5	Ernte der Biomasse und Quantifizierung	196
A.2.6	Extraktion der Triterpene	196
A.2.7	Kalibriergeraden der Triterpenanalytik	197
A.3	Methodenteil zur Kultivierung terrestrischer Cyanobakterien	201
A.3.1	Stammhaltung	201
A.3.2	Ansetzen der Vorkulturen	201
A.3.3	Animpfen der Hauptkulturen	201
A.3.4	Probennahme	201
A.3.5	Bestimmung der Biomasse	202
A.3.6	Analytik der Photopigmente	203
A.3.7	Extraktion der EPS	204
A.3.8	Analytik der EPS	204
A.3.8.1	Bestimmung des Kohlenhydratgehalts nach Dubois	204
A.3.8.2	Bestimmung des Acetylgruppengehalts nach Hestrin	204
A.3.8.3	Kombinierte Protein- und Huminstoffanalyse nach Frølund	205
A.3.8.4	Rhamnolipidanalyse nach Chandrasekaran und BeMiller	205
A.3.8.5	Uronsäureanalyse nach Blumenkrantz und Asboe-Hanson	206
A.3.9	Bestimmung der EPS-Zusammensetzung	206
A.3.10	Versuchsplan und Ergebnisse nach DoE für das submerse Wachstum	207
A.3.11	Versuchsplan und Ergebnisse nach DoE für das emerse Wachstum	209
A.3.12	Versuchsplan und Ergebnisse nach DoE für EPS-Bildung	211
A.3.13	Fluoreszenz-Analytik	212
A.3.14	Script für Berkley-Madonna	213
B	Verwendete Geräte	217
C	Verwendete Chemikalien	221
D	Verwendete Medien und Lösungen	223
D.1	Medien und Lösungen der Pflanzenzellkultivierung	223
D.1.1	LS-Medium	223
D.1.2	HPLC-Eluent	223
D.1.3	Ursol- und Oleanolsäurestandards	223
D.1.4	Standards der Zuckeranalytik	224
D.2	Medien und Lösungen der Cyanobakterienkultivierung	225
D.2.1	BG 11 Medium	225
D.2.2	Lösungen der EPS-Analytik	225
E	Abbildungsverzeichnis	229



F Tabellenverzeichnis 241

G Angaben zur Person..... 243

G.1 Betreute Arbeiten 243

G.2 Veröffentlichungsliste 245

G.3 Lebenslauf 247

Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	Lag-Phase	Latenzphase
3PG	3-Phosphoglycerat	LHC	Light harvesting complex
Abb.	Abbildung	LS	Linsmaier and Skoog
AGPase	ADP-glucose pyrophosphorylase	MeOH	Methanol
AS	Aminosäure	MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ATP	Adenosintriphosphat	MS	Mureinschicht
BFM	Biofeuchtmasse	NaCl	Kochsalz
BTM	Biotrockenmasse	NaOH	Natronlauge
CaCO ₃	Calciumcarbonat	NADP	Nicotinsäureamid Adenin Dinukleotid Phosphat
cCA	Carboanhydrase	NADPH	Nicotinsäureamid Adenin Dinukleotid Phosphat (reduziert)
CCM	Carbon concentrating mechanism	OD	Optische Dichte
CHNS	Elementaranalyse	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
CFD	Computational Fluid Dynamics	OTR	Oxygen transfer rate
CPS	Capsulare polysaccharide	PC	Phycocyanin
CTR	Carbon transfer rate	PCC	Pasteur Culture Collection
Dest.	Destilliert	PCR	Polymerase Chain Reaction
DIC	Dissolved Inorganic Carbon	PE	Phycoerythrin
DNA	Desoxyribonucleic acid	PM	Plasmamembran
DoE	Design of experiments	PS I	Photosystem I
DW	Dry weight	PS II	Photosystem II
ePBR	Emerser Photobioreaktor	RNA	Ribonucleic acid
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen	RPS	Released polysaccharide
<i>et al.</i>	Et alii, lateinisch für „und andere“	RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/-Oxygenase
EtOH	Ethanol	RuBP	Ribulosebisphosphat
Fd	Ferredoxin	RuMP	Ribulosemonophosphat
FPA	Flachplatten Airlift Reaktor	SK	Schüttelkolben
G3P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat	sp.	Spezies
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Tab.	Tabelle
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie	UV	Ultraviolett
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogensulfat	VE	Vollentsalzt



Formelzeichen

Wachstum

μ	Wachstumsrate
x	Biomasse
x_o	Startbiomasse
x_t	Biomasse zum Zeitpunkt t
t_1	Startzeitpunkt
t_2	Endzeitpunkt
G	Maximale Konzentration
K	Populationskonstante

Sauerstofftransfer

k_L	Stoffübergangskoeffizient
a	Volumenbezogene spez. Grenzfläche
$c_{O_2}^*$	Gleichgewichtskonzentration an der Phasengrenzfläche
c_{O_2}	Gaskonzentration der Lösung

Statistische Versuchsplanung

2^k	vollfaktoriell
2^{k-p} -Pläne	fraktionelle faktorielle Versuchspläne
a_i, a_{ij}, a_{ii}	Regressionskoeffizienten
DF_{Reg}	Anzahl der Freiheitsgrade der Regression
DF_{Total}	Anzahl der Freiheitsgrade
k	Anzahl der Faktoren
m	Anzahl der Stufen
m^k	Faktorstufenkombination
n	Anzahl der Realisierungen
N	Versuchsumfang
p-Value	probability-Value
R^2	Bestimmtheitsmaß
$R^2_{adj.}$	adjustierte Bestimmtheitsmaß
SS_{Reg}	sum of squares“ der Regression

σ	Standardabweichung
ϵ	Versuchsfehler
$\Delta\mu$	Tatsächlich vorhandener Unterschied der Einzelwerte
SS_{Total}	gesamte Anzahl der Quadrate
x_i, x_j, x_{ii}	unabhängige Variable
Y	Ergebnis (experimentel)

Wachstumsmodellierung

μ_{max}	Maximale Wachstumsrate
f_i	Einflussfaktor auf die Wachstumsrate des Parameters i
T_x	Verwendete Temperatur
T_{opt}	Optimale Temperatur
A	Peakbreite
c	Proportionalitätskonstante
H^+_{max}	H^+ -Ionen-Konzentration bei der kein Wachstum möglich ist
H^+	Verwendete H^+ -Ionen-Konzentration
S	Konzentration des limitierenden Substrats
K_S	Sättigungskonstante

Leistungseintrag

P/V	Volumetrischer Leistungseintrag
n	Drehzahl
q	Begasungsrate
f_s	Schlankheitsgrad H/D
D	Durchmesser des Reaktors
g	Erdbeschleunigung
V_G	Gasvolumenstrom
ρ_L	Dichte des Mediums
H_f	Füllhöhe
V_L	Flüssigkeitsvolumen
V	Füllvolumen

k_{La} -Wert Berechnung

k_{La}	spezifischer Stofftransportkoeffizient
P_R	Rührerleistung
$V_{R,L}$	Flüssigreaktionsvolumen
u_G	Gasleerrohrgeschwindigkeit
A	Konstante
a, b	Exponenten
q	Begasungsrate
f_s	Schlankheitsgrad H/D
C	Konstante
H	Höhe der Flüssigkeitssäule im Reaktor
n	Drehzahl (Schüttelfrequenz)
e	Exzentrizität bei Schüttlern

Löslichkeit von CO_2

k_H^T	Henry-Konstante
p_i	Partialdruck
T	Betrachtete Temperatur
T_θ	Temperatur bei Standardbedingungen
k_H^0	Henry-Konstante bei Standardbedingungen
K_{cs}	Sechenov-Konstante
C_{G0}	Gaskonzentration in Deionat
C_G	Gaskonzentration der Salzlösung
h_G	Gasspezifischer Parameter
h_i	Salzspezifischer Parameter
c_i	Ionenkonzentration
h_T	Gasspezifischer Temperaturparameter
h_{G0}	Spezifischer Gasparameter bei Standardbedingungen



1. Einleitung

Phototrophe Organismen, wie z.B. Pflanzen und Cyanobakterien, bilden eine Vielzahl von biotechnologischen Wert- und pharmazeutischen Wirkstoffen. Bei den Pflanzen sind dies u.a. Nahrungsergänzungsmittel (wie z.B. essentielle Öle, Rosmarinsäure), natürliche Farbstoffe, Biopestizide und Phytotherapeutika, zu denen auch Phenolderivate und Terpensäuren aus der Gruppe der Triterpene gehören (Gibbs 1974, Banthorpe et al. 1989, Luis et al. 1992, Ulubelen&Topcu 1992). Aus Gründen der Vereinfachung wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Oberbegriff „Triterpene“ auch für alle davon abgeleiteten Derivate verwendet. Im Jahr 2008 betrug das Handelsvolumen von Wirkstoffen aus Pflanzen etwa 2 Milliarden US-Dollar (Bäcker et al. 2015). An dieser Gesamtsumme haben die Terpene den größten Anteil und verzeichnen darüber hinaus den höchsten jährlichen Zuwachs (Bäcker et al. 2015). Die Herstellung erfolgt dabei meistens durch Isolation der Terpene aus verschiedenen Teilen unterschiedlicher Pflanzen (Janicsák et al. 2003, Janicsák et al. 2006). Dies birgt das Problem eines stark schwankenden saisonalen und artspezifischen Gehaltes der Zielsubstanzen sowie der Sensitivität gegenüber verschiedener Anbaubedingungen (Schädlinge, Krankheiten, klimatische und geografische Einflüsse usw.) (Mulabagal&Tsay 2004). Als Alternative dazu hat sich die *in vitro* Kultivierung von pflanzlichen Zellkulturen entwickelt, welche eine ganzjährige Produktion ohne Abhängigkeit von den oben genannten Faktoren ermöglicht. So lassen sich sowohl gleichbleibende Qualität als auch Quantität der Produkte realisieren.

Auf der Seite der Cyanobakterien zählen zu den Wertstoffen z.B. Lebensmittelfarbstoffe, wie Carotinoide und Chlorophylle, Nahrungsergänzungsmittel und Biokraftstoffe (Benedetti et al. 2010, Malcata 2011, Milledge 2011). Des Weiteren können Cyanobakterien große Mengen an extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) produzieren, die z.T. von wirtschaftlichem Interesse sind und manchmal sogar 50% bis 90% des gesamten Kohlenstoffgehalts der Cyanobakterien ausmachen (Nielsen&Jahn 1999). Den größten Anteil der EPS stellen Polysaccharide dar, wovon insbesondere die sulfatierten Polysaccharide eine pharmakologische Wirksamkeit zeigen und daher für die medizinische Forschung von Bedeutung sind (Namikoshi&Rinehart 1996). Ferner wurden antivirale Substanzen, Immunsuppressiva und Substanzen mit fungizider Wirkung nachgewiesen (Falch 1996, Pulz&Gross 2004, Muller-Feuga et al. 2007). Weitere wertvolle Substanzen, wie Stoffwechselmetabolite mit antioxidativen Wirkungen und Glyco- und Phospholipide, die in der Kosmetikindustrie Verwendung finden, können ebenfalls aus Cyanobakterien gewonnen werden (Muller-Feuga et al. 2007). Die wirtschaftliche Bedeutung von Produkten aus Mikroalgen (zu denen in diesem



Fall auch Cyanobakterien gezählt werden) betrug im Jahr 2004 schon über 5 Milliarden US-Dollar (Pulz&Gross 2004).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es nun, im Rahmen der durch die DFG geförderten Projekte UL 170/8-1 und UL 170/7-1 jeweils die Bildung der Wertsbstanzen zu untersuchen und zu optimieren.

2. Fermentation von *Salvia officinalis* zur Gewinnung von biotechnologischen Wertstoffen

Dieses Kapitel der Dissertation befasst sich mit der Kultivierung von *Salvia officinalis* zur Produktion der pflanzlichen Triterpene Oleanolsäure und Ursolsäure. Beide bieten ein hohes pharmazeutisches Potential und sind daher als biotechnologische Wertstoffe interessant.

2.1 Einleitung und Zielsetzung

Im Rahmen des von der DFG geförderten Projektes „Gewinnung von pharmakologisch relevanten Triterpenen aus pflanzlichen Zellkulturen am Beispiel von Oleanol- und Ursolsäure“ (UL 170/8-1) soll untersucht werden, inwieweit über pflanzliche Zellkulturen die genannten Triterpene, sowohl in ausreichender Quantität als auch Qualität, hergestellt werden können. Darüber hinaus soll eine mögliche Modifikation der Triterpene mittels Biotransformation und isolierter Enzyme genauer betrachtet werden. Ziel des Projektes ist die Etablierung eines Gesamtprozesses, in dem die Schritte der Kultivierung, Produktbildung, Aufarbeitung und Biotransformation in einer Anlage zusammen stattfinden.

Ein Großteil dieser Aufgaben wurde bereits in einer vorherigen Dissertation am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der TU Kaiserslautern untersucht (Ludwig 2014), wobei für die Kultivierung stets eine heterotrophe Prozessstrategie verwendet wurde. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass durch die Verwendung von Licht die Ausbeute an Sekundärmetaboliten ggfs. weiter gesteigert werden kann (Fett-Neto et al. 1995, Wang et al. 2012). Auch Elicitoren wurden bereits erfolgreich für diesen Zweck eingesetzt (Mulabagal&Tsay 2004).

Ziel dieser Arbeit ist es daher, mit zwei bereits genetisch veränderten Stämmen von *Salvia officinalis* zu untersuchen, ob die Synthese der pflanzlichen Triterpene Oleanol- und Ursolsäure durch eine photo-mixotrophe Kultivierung weiter verbessert werden kann. Daher wird die Bildung der Triterpene zunächst in Abhängigkeit von verschiedenen Lichtstärken in unterschiedlichen Kultivierungssystemen untersucht und die jeweilige Produktivität bestimmt. Eine besondere Herausforderung ist hierbei die notwendige Bestimmung der Biomasse, welche aufgrund der Bildung von Zellagglomeraten erschwert ist (Andersen 2005). Die erhaltenen Ergebnisse sollen anschließend in Relation zu den Daten der heterotrophen Kultivierungen aus der Dissertation von (Ludwig 2014) gesetzt werden, um einen direkten Vergleich zu erhalten. Zusätzlich soll getestet werden, welchen Einfluss Pektinase als Elicitor auf die Synthese und die Produktivität der Triterpene hat. Dazu sollen verschiedene Konzentrationen von Pektinase,



jeweils unter gleichen Kultivierungsbedingungen, bei einer Fermentation mit und ohne Licht, untersucht werden.

Insgesamt ist somit das Ziel, durch die Verwendung von Licht und eines Elicitors, die Bildung und Produktivität der Oleanol- und Ursolsäuresynthese bei der Kultivierung von *Salvia officinalis* zu verbessern, um den eingangs dargestellten Gesamtprozess zu optimieren.

2.2 Stand der Technik zur Kultivierung von *Salvia officinalis*

Zu der Gattung *Salvia* gehören mehr als 700 verschiedene Arten, die eine ungewöhnlich große Menge an Sekundärmetaboliten aufweisen. Zu diesen gehören essentielle Öle, Triterpene und Phenol-Derivate (Gibbs 1974, Banthorpe et al. 1989, Luis et al. 1992, Ulubelen&Topcu 1992). Von besonderem Interesse sind dabei die Triterpene und von diesen die Positionsisomere Oleanol- und Ursolsäure. Diese Verbindungen verfügen über eine große biologische Wirksamkeit, wodurch sie in letzter Zeit häufig Gegenstand von Forschung waren. Zu den nachgewiesenen pharmazeutisch nutzbaren Eigenschaften zählen u.a. Entzündungshemmung und antitumorale Wirksamkeit.

Der Gehalt von Triterpenen in Pflanzen ist saisonal- und speziesabhängig, so dass die Konzentration von z.B. Oleanol- und Ursolsäure je nach Standort der Pflanze, Zeitpunkt der Ernte und Abstand der Pflanzen zwischen 0,54 und 4% bezogen auf die Trockenmasse schwankt (Untersuchung des DLR-Rheinpfalz). Diese Faktoren unterstützen die Bestrebungen zur reproduzierbaren Kultivierung von Pflanzenzellkulturen im Labor. Bereits veröffentlichte Arbeiten variieren allerdings deutlich hinsichtlich der Kultivierungsstrategie in Bezug auf die Triterpengewinnung mit *Salvia* sp.. Diese reichen von mixotrophen Zellsuspensionskulturen zur Herstellung von Rosmarinsäure (Hippolyte et al. 1992), über Kalluskulturen (sowohl mixotroph als auch heterotroph) zur Herstellung von Lithospermsäure und Rosmarinsäure (Morimoto et al. 1994, Kintzios et al. 1999), bis zur heterotrophen Kultivierung von sowohl Kallus- als auch Zellsuspensionskulturen (Karam et al. 2003). Die isolierten Gehalte an Triterpenen, vor allem von Rosmarinsäure, reichen dabei von 1,4 - 5,1 % bezogen auf die Trockenmasse. Die Herstellung von Oleanol- und Ursolsäure mit *Salvia* sp. ist bislang deutlich weniger beschrieben. Eine Ausnahme bilden hier die Arbeiten von Bolta und Kollegen, die eine Ursolsäurekonzentration von 400 µg pro g Trockenmasse publizierten (Bolta et al. 2003), sowie die von Haas und Kollegen mit einem Gehalt von maximal 4,08 mg pro g Trockenmasse Oleanolsäure und 2,54 mg pro g Trockenmasse Ursolsäure (Haas et al. 2014). Beide Triterpene werden laut aktuell vorliegender Literatur i.d.R. aus anderen, ganzen Pflanzen oder Suspensionskulturen isoliert (Janicsák et al. 2003, Janicsák et al. 2006). Hierzu gehören

Kalluskulturen von *Ternstroemia gymnanthera* (Ikuta et al. 2003), sowie Suspensionskulturen von *Hyssopus officinalis* und *Calendula officinalis* zur Gewinnung von Oleanol- und Ursolsäure (Skrzypek&Wysokinska 2003, Szakiel et al. 2003). Oleanolsäure alleine kann aus den Wurzeln von *Calendula officinalis*- (Ruszkowski et al. 2006) und Suspensionskulturen von *Olea europaea* gewonnen werden (Saimaru et al. 2007), während Ursolsäure aus Blättern von *Catharanthus roseus* isoliert werden kann (Yu et al. 2013).

2.3 Theoretische Grundlagen

In diesem Abschnitt werden die wichtigsten theoretischen Grundlagen zum Verständnis der durchgeführten Arbeiten im Rahmen der Fermentation von *Salvia officinalis* zur Gewinnung von biotechnologischen Wertstoffen beschrieben. Dabei wird zunächst auf die zur Produktion verwendete Pflanzengattung eingegangen und anschließend auf die Grundlagen des phototropen Stoffwechsels, sowie den Einfluss der Lichtstärke. Danach werden die wichtigsten Grundlagen zur Kultivierung von Pflanzenzellen dargestellt, sowie die konkret in dieser Arbeit verwendeten Kultivierungsstrategien. Abgeschlossen werden die theoretischen Grundlagen mit der Vorstellung der produzierten Triterpene.

2.3.1 *Salvia officinalis*

Salvia officinalis (deutsch: „Echter Salbei“) ist eine wärmeliebende Pflanze, die zu den Halbsträuchern zählt. Ursprünglich stammt Salbei aus mediterranen Regionen und ist vorwiegend in Mitteleuropa beheimatet. Seit der Antike findet Salbei Anwendung in der Lebensmittel- und Kosmetik- sowie der Arzneimittelindustrie. Erstmals wird *Salvia officinalis* von Plinius im 1. Jahrhundert n.Chr. als Heilpflanze beschrieben (Secundus&Denso 1765). Aufgrund der enthaltenen ätherischen Öle wird Salbei vielfach als Gewürz- oder Heilpflanze verwendet. Von besonderer Bedeutung ist die medizinische Verwendung im Bereich der Entzündungsbehandlung. In diesem Zusammenhang sind traditionell vor allem ätherische Öle sowie Gerb- und Bitterstoffe wie Thujon, 1,8-Cineol und Linalool von Interesse, die aber je nach Herkunft der Pflanze in ihrem Gehalt variieren. Ebenfalls relevant in vielfältigen medizinischen Anwendungsbereichen sind Ursol- sowie Oleanolsäure, die u.a. antibakterielle (Tsai&Yin 2008) und antikanzerogene (Bishayee et al. 2011) Eigenschaften besitzen. Sie zählen wie die zuvor genannten Stoffe zu den Sekundärmetaboliten von *Salvia officinalis*. Um pharmazeutische Richtlinien zu erfüllen, muss die Produktion der Triterpene reproduzierbar sein. Bei der Isolation aus ganzen Pflanzen (*in vivo*) kommt es jedoch zu Schwankungen in der Qualität und Quantität der Produkte (Muffler et al. 2011). Weiterhin nachteilig sind geno- und phänotypische Variabilität, sowie eine Kontamination durch toxische Inhaltsstoffe (Canter et



al. 2005). Bei einer monoseptischen Kultivierung in einem Bioreaktor (*in vitro*) wachsen die Zellen unabhängig von Umwelteinflüssen wie Krankheiten, Schädlingen, Klimaveränderungen und Bodenbeschaffenheit des jeweiligen Anbaugebietes (Heß 1992, Rao&Ravishankar 2002, Vanisree et al. 2004). Somit können die bereits beschriebenen Nachteile weitgehend ausgeschlossen werden. Die Ausbeute der gewünschten Metaboliten in *in vitro* Kulturen fällt jedoch meistens geringer aus als in *in vivo* Kulturen (Collin 2001). Durch genetische Optimierung wird versucht, diesen Nachteil auszugleichen (Muffler et al. 2011). Der Anbau genetisch modifizierter Pflanzen benötigt lange und teure Genehmigungsverfahren, bevor sie angebaut werden dürfen. Die Kultivierung im Reaktor hingegen bringt weniger bürokratischen und finanziellen Aufwand mit sich. Somit bietet die Kultivierung von Pflanzenzellen in Bioreaktoren eine interessante Möglichkeit zur Produktion von biologisch aktiven Metaboliten.

2.3.2 Photosynthese

Phototrophe Organismen wie z.B. Pflanzen, Algen und Cyanobakterien sind in der Lage, Licht als Energiequelle zu nutzen. Die Photosynthese beschreibt den Stoffwechselprozess, bei dem Licht absorbiert und die daraus gewonnene Energie zur Produktion von ATP und Glucose verwendet wird. Der Gesamtprozess der Photosynthese kann vereinfacht in der unten aufgeführten Reaktionsgleichung zusammengefasst werden (Purves et al. 2011).



Photosynthetisch aktive Organismen nehmen zur Bildung von Kohlenhydraten Kohlendioxid, Wasser und Lichtenergie auf. Als Nebenprodukte fallen Sauerstoff und Wasser an. Der genaue Ablauf der photosynthetischen Reaktionen sowie die daran beteiligten Proteine variieren z.T. stark zwischen den einzelnen Organismen. Grundsätzlich lässt sich der Vorgang der Photosynthese aber in zwei Teilreaktionen untergliedern, die Licht- und die Dunkelreaktion, die bei allen Arten gleich sind. In der Lichtreaktion werden Adenosintriphosphat (ATP) und reduzierte Elektronencarrier (NADPH-H⁺) gebildet. In der Dunkelreaktion werden über den Calvin-Zyklus unter Verbrauch von ATP, NADPH-H⁺ und CO₂ Zucker gebildet (Purves et al. 2011).

2.3.2.1 Lichtreaktion

In Algen, höheren Pflanzen und Cyanobakterien ist der Photosyntheseapparat in der Thylakoidmembran lokalisiert. Dieser besteht aus dem Photosystem I (PS I) und dem Photosystem II (PS II) (Abbildung 1). Photosysteme besitzen einen Antennenkomplex (light harvesting complex, LHC), bestehend aus verschiedenen photosynthetisch aktiven Molekülen,

die unterschiedliche Wellenlängen absorbieren und die Energie an das Reaktionszentrum weiterleiten, und ein Reaktionszentrum.

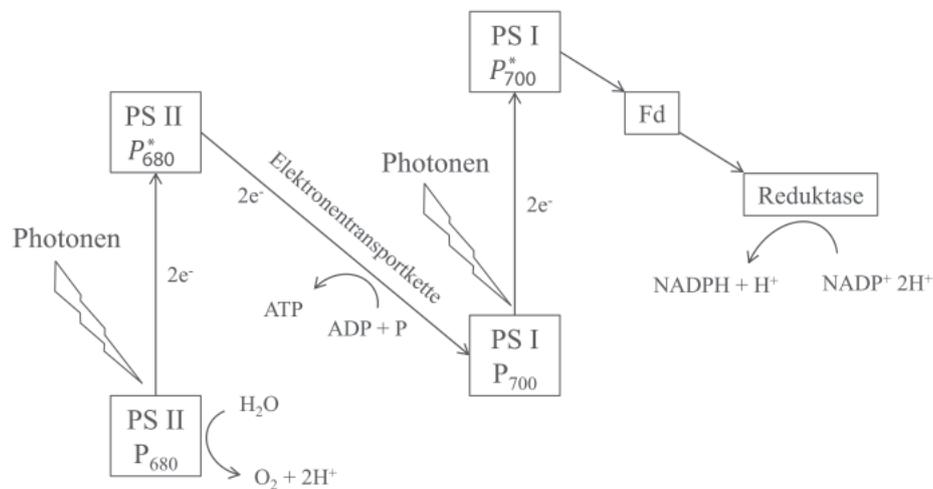


Abbildung 1: Die Lichtreaktion. Dargestellt ist der nichtzyklische Elektronentransport modifiziert nach (Purves et al. 2011).

Die Photosysteme sind funktionell hintereinander geschaltet. PS I besitzt ein Chlorophyll-a-Paar (P_{700}) und absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 700 nm. Das PS II benötigt energiereichere Photonen zur Anregung des Chlorophyll-a-Paares (P_{680}), da es bei einer Wellenlänge von 680 nm angeregt wird. Die Lichtenergie wird hier zur Oxidation von Wassermolekülen genutzt, wodurch Elektronen freigesetzt werden, die anschließend eine Elektronentransportkette durchlaufen. Über diese wird ein Protonengradient aufgebaut und ATP durch das Enzym ATP-Synthase synthetisiert.

Bei der Lichtreaktion der Photosynthese werden die Photonen von den Pigmenten des LHC absorbiert und die Energie auf das Reaktionszentrum des Photosystems II übertragen. Die angeregten Elektronen werden auf ein höheres Energieniveau gebracht und von einem primären Elektronenakzeptor abgefangen. Mittels eines wasserspaltenden Enzymkomplexes, welcher 2 Wassermolekülen 4 Elektronen entzieht, werden die Elektronen des zuvor oxidierten Chlorophyllmoleküls nacheinander wieder ersetzt. Die Elektronen werden vom PS II über die Elektronentransportkette, bestehend aus Plastoquinonen, dem Cytochrom f/b6- Komplex und Plastocyanin, auf das PS I übertragen. Der primäre Elektronenakzeptor des PS I gibt die angeregten Elektronen an das Ferredoxin (Fd) weiter, bis sie schließlich von einer Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase auf NADP⁺ übertragen werden, wodurch NADP⁺ zu NADPH+H⁺ reduziert wird (Huner et al. 1998, Lawlor 2001, Campbell et al. 2006). Das angeregte P_{700}^* kehrt durch die Aufnahme von Elektronen aus der Elektronentransportkette in den Grundzustand zurück und kann erneut angeregt werden (Abbildung 1)(Richter 1998, Purves et al. 2011).



Zum Schutz einer überschüssigen Anregung des PS II und der optimalen Ausnutzung des aktinischen Lichtes haben sich verschiedene Mechanismen, wie die situationsabhängige Energieübertragung auf vornehmlich PS II oder PS I (State transition) und die Dissipation überschüssig absorbiertes Energie in Form von Hitze und Fluoreszenz entwickelt (Huner et al. 1998). State transitions sind schnelle physiologische Adaptationsmechanismen, die die Verteilung der absorbierten Lichtenergie zwischen PS I und PS II regulieren. Lichtbedingungen, die zu einer überschüssigen Anregung des PS II führen, induzieren einen Übergang zu State 2, in welchem mehr absorbierte Energie auf das PS I übertragen wird. Ist das PS I überangeregt, findet ein Übergang zu State I statt (Mullineaux & Emlyn-Jones 2005). Zusätzlich bieten Antennenkomplexe Schutz vor zu hohen Lichtintensitäten, indem sie durch Umwandlung der Lichtenergie in Wärme die überschüssige Energie an die Umgebung abgeben und die Photoinhibition (licht-induzierter Stress) verhindern.

2.3.2.2 Dunkelreaktion

Der Calvin-Zyklus besteht aus zwei Teilschritten. Im ersten Schritt wird die Fixierung von CO_2 durch das Enzym Ribulosebiphosphatcarboxylase/oxygenase (RuBisCO) katalysiert.

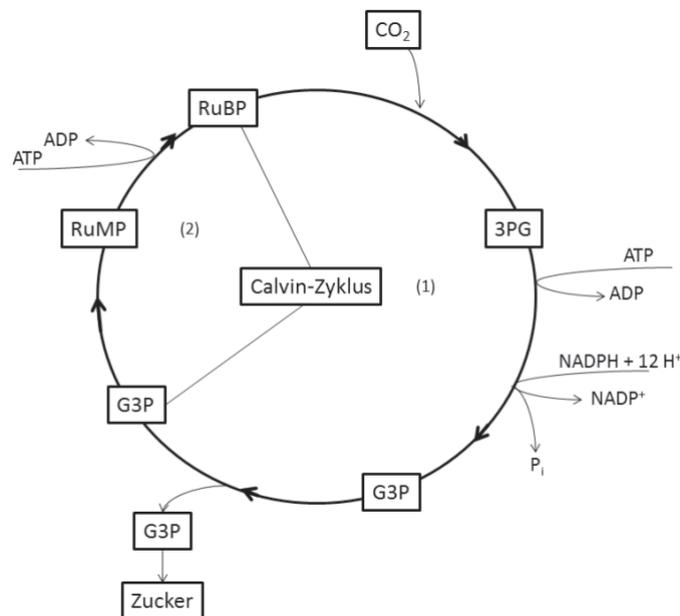


Abbildung 2: Der Calvin-Zyklus. Dargestellt ist der vereinfachte Ablauf der Dunkelreaktion. 1 = Kohlenstofffixierung durch RuBP, Reduktion und Zuckersynthese; 2 = Regenerierung von RuBP modifiziert nach (Purves et al. 2011).

Als Reaktionsprodukt entsteht 3-Phosphoglycerat (3PG). 3PG wird weiter zu einem Kohlenhydrat reduziert (Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P)). In der zweiten Phase wird ein Großteil des G3P's regeneriert, also in RuMP (Ribulosemonophosphat) und anschließend unter

Verbrauch von ATP zu RuBP umgewandelt (Abbildung 2). Dementsprechend wird gleichzeitig ein Kohlenstoffatom fixiert und der CO₂-Akzeptor regeneriert (Richter 1998).

2.3.2.3 Lichtstärke

Der Einfluss der Lichtstärke, während einer Kultivierung, auf die Photosyntheserate von phototrophen Organismen ist in Abbildung 3 dargestellt. Mit zunehmender Lichtstärke steigt die Photosyntheserate von phototrophen Organismen zunächst linear an und erreicht anschließend eine Sättigung. Die Lichtstärke, die zur Sättigung führt, ist organismusspezifisch, genauso wie der Lichtkompensationspunkt. Dieser beschreibt den Zeitpunkt, bei dem die Respiration und die Photosynthese im Gleichgewicht stehen (Richter 1998).

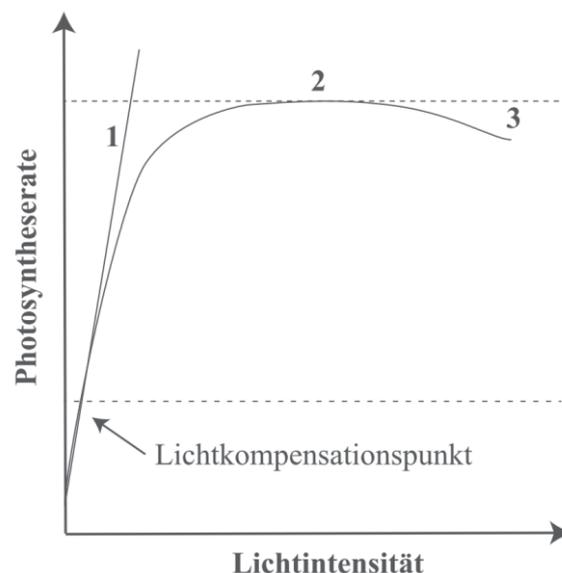


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der Photosynthese- bzw. Sauerstoffbildungsrate in Abhängigkeit der Bestrahlung. 1 = Lichtlimitierung (max. Quantenausbeute); 2 = Lichtsättigung (max. Photosyntheserate); 3 = Photoinhibierung modifiziert nach (Walter 1999).

Da die Lichtabsorption linear mit der Lichtstärke steigt, entsteht im Sättigungsbereich ein Überschuss an Lichtenergie. Somit kommt es bei zu hoher Lichteinstrahlung zu einer Abnahme der Photosyntheseleistung bzw. zu einer Verschlechterung der Quantenausbeute (Schopfer&Brennicke 2010). Steigt die Lichtstärke weiter an, kommt es darüber hinaus zu einer Schädigung der Zelle, so dass es zu einer Abnahme der Wachstumsrate und schließlich zu einem Absterben der Kultur kommt.

2.3.3 Kultivierung von Pflanzenzellen

Höhere Pflanzen sind wichtige Quellen für eine große Menge bioaktiver Stoffe, wie pharmazeutische Wirkstoffe, Pestizide, Geschmacks- und Duftstoffe. Traditionell wurden diese Substanzen aus ganzen Pflanzen extrahiert, was den Anbau dieser Pflanzen in einem Großmaßstab voraussetzt (z.B. die Produktion von Alkaloiden aus *Catharanthus roseus*).



Darüber hinaus können viele Produkte aus Pflanzen auch chemisch synthetisiert werden, was u.U. eine zuverlässigere und kosteneffektivere Alternative darstellt. Die Nutzung einer Pflanzenzellkultur ist daher z.B. dann attraktiv, wenn die ursprüngliche Pflanze schwer zu kultivieren ist, lange Kultivierungsperioden und, eine geringe Produktausbeute hat, oder die chemische Synthese noch nicht durchführbar bzw. technisch problematisch ist. Es ist daher wichtig, geeignete Methoden zu entwickeln, die konstant hohe Ausbeuten des gewünschten Produktes liefern (Berlin&Sasse 1985).

2.3.3.1 Produktion von Sekundärmetaboliten

Pflanzenzellsuspensionskulturen bieten die Möglichkeit, ggfs. auch seltene Pflanzen pharmazeutisch zu nutzen. Darüber hinaus wurde bereits untersucht, Pflanzenzellkulturen als Alternative zu traditioneller Landwirtschaft und für die industrielle Produktion von sekundären Stoffwechselprodukten zu nutzen (DiCosmo&Misawa 1995). Zu diesem Zweck wurde die Technologie der Pflanzenzellkultur bereits seit Ende der 60er Jahre kontinuierlich weiter erforscht. Seitdem wurden verschiedene Kultivierungsstrategien untersucht, mit dem Ziel, die Produktion der sekundären Stoffwechselprodukte zu optimieren. Der Vorteil der Pflanzenzellsuspensionskultur liegt darin, dass bioaktive Stoffe in einer kontrollierten Umgebung, unabhängig von klimatischen Einflüssen und verschiedenen Bodenbedingungen produziert werden können. Darüber hinaus gibt es keine negativen Einflüsse von Mikroorganismen; einzelne besonders produktive Stämme können gezielt selektiert werden, und es kann durch Automatisierung des Prozesses Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung genommen werden. Somit lassen sich die Kosten zur Herstellung reduzieren und die Produktion gleichzeitig optimieren. Ziel ist es, dabei einen Prozess zu entwickeln, der die Herstellung von sekundären Stoffwechselmetaboliten mit einer Pflanzenzellkultur günstiger macht als die Extraktion der entsprechenden Stoffe direkt aus ganzen Pflanzen bzw. als die chemische Synthese der Stoffe.

2.3.3.2 Kultivierungsbedingungen

Bei den Kultivierungsbedingungen spielen eine Vielzahl von chemischen und physikalischen Faktoren eine Rolle für die Optimierung. Dazu gehört die Zusammensetzung des Nährmediums, Phytohormone, der pH-Wert, die Temperatur, die Begasung, der Leistungseintrag und die Beleuchtung (Fett-Neto et al. 1995, Goleniowski&Trippi 1999, Wang et al. 1999, Lee&Shuler 2000). Einige Produkte werden in größeren Konzentrationen in Zellkulturen gebildet als in ganzen Pflanzen, was hauptsächlich an der Optimierung der Kultivierungsbedingungen liegt. Eine Veränderung der physikalischen Parameter sowie der

Nährstoffgehalt in dem verwendeten Kulturmedium haben dabei den größten Einfluss. Dies wurde bereits anhand von vielen Beispielen bestätigt, wie bei der Produktion von Ginsenosiden (Furuya et al. 1984, Furuya 1988, Choi et al. 1994, Franklin&Dixon 1994), Rosmarinsäure (Ulbrich et al. 1985), Shikonin (Takahashi&Fujita 1991), Ubichinon 10 (Fontanel&Tabata 1987) und Berberin (Matsubara et al. 1989). Auf diese Faktoren wird hier nicht weiter eingegangen, da ihre Untersuchung in Bezug auf Pflanzenzellen nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war. Ihr Einfluss auf das Wachstum ist allerdings in Kapitel 3.3.3 detailliert in Bezug auf Cyanobakterien dargestellt, wovon viele Punkte auch für Pflanzenzellen gültig sind.

2.3.3.3 Auswahl von Stämmen

Pflanzenzellkulturen repräsentieren heterogene Populationen, bei denen physiologische Charakteristika z.T. sehr unterschiedlich sind. Die Optimierung einer Produktion durch Screening und Selektion spezieller Kulturen wurde bereits von Berlin und Kollegen beschrieben (Berlin&Sasse 1985). So konnte zum Beispiel die Ausbeute von Anthocyan aus *Euphorbia milli* um das 7fache nach 24 Selektionsschritten im Vergleich zu dem Ausgangsstamm erhöht werden (Yamamoto et al. 1982). Ähnliches wurde für die Synthese von Berberin aus *Coptis japonica* berichtet, wo nach 27 Generationen die 6fache Wachstumsgeschwindigkeit und eine stabile Produktion auf hohem Level erreicht wurde (Yamada&Sato 1981).

2.3.3.4 Precursor-Zugabe

Durch die gezielte Zugabe eines Precursors in das Kulturmedium kann die Ausbeute eines bestimmten Produktes u.U. gesteigert werden. Diese Möglichkeit ist vor allem dann in Betracht zu ziehen, wenn der benötigte Precursor günstig verfügbar ist. Die zugrundeliegende Idee ist, dass jede Komponente, die selbst ein Stoffwechselintermediat ist, oder am Anfang eines bestimmten Stoffwechselweges steht, die Produktbildung fördern kann. Eine entsprechende Steigerung der Synthese von sekundären Stoffwechselmetaboliten wurde bereits erfolgreich an vielen Beispielen demonstriert (Moreno et al. 1993, Whitmer et al. 1998, Silvestrini et al. 2002). Durch die Zugabe von Aminosäuren wurde z.B. die Produktion von Tropan- und Indolalkaloiden, sowie die von Rosmarinsäure aus *Salvia officinalis* durch Zugabe von Phenylalanin (Ellis&Towers 1970) gesteigert. Weitere Beispiele sind die gesteigerte Bildung von Taxol aus *Taxus chinensis* ebenfalls durch Phenylalanin (Fett-Neto et al. 1993, Fett-Neto et al. 1994), eine Erhöhung der Vanillinkonzentration in *Vanilla planifolia* durch Ferulasäurezugabe (Romagnoli&Knorr 1988), sowie eine Steigerung der flüchtigen



Monoterpene durch Zugabe von Leucin bei der Pflanzenzellkultur von *Perilla fruticosa* (Mulder-Krieger et al. 1988).

2.3.3.5 Elicitoren

Viele Pflanzen bilden sekundäre Stoffwechselprodukte als natürliche Defensivreaktion gegen Pathogene. Elicitoren sind spezifische Stoffe, die die Bildung dieser Stoffwechselprodukte auslösen. Dadurch ist der Einsatz von Elicitoren des pflanzlichen Abwehrmechanismus (Elicitation) eine der effektivsten Strategien, um die Bildung von sekundären Stoffwechselprodukten gezielt zu steigern (Roberts&Shuler 1997). Biotische und abiotische Elicitoren (physikalisch oder chemisch) werden nach ihrem jeweiligen Ursprung (exogen oder endogen) klassifiziert (Radman et al. 2003) und führen in der Regel zu einer Reduktion der Prozesszeit, die gebraucht wird, um das Zielprodukt in einer hohen Konzentration zu bilden (DiCosmo&Tallevi 1985, Eilert 1987, Barz et al. 1988). Eine Übersicht der Elicitoren-Klassifikation ist in Abbildung 4 dargestellt.

Elicitoren					
Physikalisch	Verletzung				
	Abiotisch		Metallische Ionen (Europium, Calcium, Silber, Cadmium)		
Chemisch	Biotisch	Komplexe Zusammensetzung	Hefezellwand, Mycelienzellwand, Pilzsporen		
		Definierte Zusammensetzung	Kohlenhydrate	Poly-saccharide	Alginat
					LBG
					Pectin
					Chitosan
					Guargummi
			Oligo-saccharide	Mannuronsäure	
				Guluronsäure	
					Mannane
				Galacturonsäure	
Peptide		Glutathion			
Proteine		Cellulase, Elicitin, Oligandrin			
Lipide		Lipopolysaccharide			
Glykoproteine					
Flüchtige Stoffe		C ₆ -C ₁₀			

Abbildung 4: Klassifizierung von Elicitoren nach (IJDDHR 2011).

2.3.3.6 Aggregatbildung

Pflanzenzellen sind signifikant größer und langsamer wachsend als die meisten mikrobiellen Systeme. Einzelne Pflanzenzellen haben typischerweise eine Länge von 10-100 μm und eine sphärische bis zylindrische Form. Eine Aggregatbildung ist häufig zu finden, meistens bedingt durch eine fehlende Spaltung am Ende der Zellteilung und z.T. auch durch Sekretion von extrazellulären Polysacchariden (EPS) während späterer Phasen der Batch-Kultivierung (Taticek et al. 1991). Die Aggregatbildung wurde bereits mehrfach gezielt für eine Selbst-Immobilisierung der Zellen genutzt (Prenosil et al. 1987, Hegglin et al. 1990). Zellaggregate, die aus bis zu 100 Zellen bestehen, können mehrere Millimeter dick sein und neigen zur Sedimentation (Tanaka 1982). Die Ausprägung und Umstände der Zellaggregation variieren stark in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie, dem Alter der Kultur sowie den Kultivierungsparametern (Mavituna&Park 1987, Kieran et al. 1995).

2.3.3.7 Begasung

Die benötigte Begasung zur Deckung des Sauerstoffbedarfes von Pflanzenzellen ist im Vergleich zu anderen Zellkulturen gering. So liegt die spezifische Sauerstoffaufnahme, bezogen auf die Trockenmasse, in der Größenordnung von $10^{-6} \text{ g g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Bond et al. 1988, Dubuis et al. 1995, Ho et al. 1995). Durch hohe Zelldichten und eine hohe Viskosität des Kulturmediums kann die Effizienz des Sauerstofftransfers verringert werden. Trotzdem liegt die kritische Konzentration an gelöstem Sauerstoff bei ca. 15-20 % (Payne et al. 1992) für die Produktion von Stoffwechselprodukten, während die benötigte Konzentration für reines Zellwachstum noch signifikant darunter liegt (Schlatmann et al. 1995). Die meisten Veröffentlichungen, die sich mit der Auswirkung der Begasung auf die Pflanzensuspensionskulturen befassen, fokussieren auf den Parameter k_{LA} , in dem die Effekte von Begasung und Durchmischung vereint sind (Kato et al. 1975, Smart&Fowler 1981, Tanaka 1981, Leckie et al. 1991). Obwohl die Ergebnisse spezifisch für die verwendeten Systeme sind, existiert ein unterer limitierender k_{LA} -Wert, unter dem die Zellkultur inhibiert wird. Eine reduzierte Produktivität bei hohen Begasungsraten ist dagegen auf das Strippen von CO_2 und anderen essentiellen, flüchtigen Stoffen zurückzuführen (Kato et al. 1975, Schlatmann et al. 1994), bzw. auf den damit verbundenen höheren Scherstress (Ballica&Ryu 1993). Darüber hinaus kann die Begasung von Pflanzenzellsuspensionen zur Schaumbildung führen (Zhong et al. 1992), welche vor allem von der Stärke der Begasung und der Konzentration der vorhandenen extrazellulären Proteine abhängt (Wongsamuth&Doran 1994). Der Einsatz von verschiedenen Antischaummitteln kann dagegen in einigen Fällen zu einer reduzierten Produktivität der Kultur führen (Smart&Fowler 1981, Wongsamuth&Doran 1994).



2.3.3.8 Scherstress

Die Empfindlichkeit von biologischen Systemen (pro- und eukaryotisch) gegenüber hydrodynamischem Scherstress wurde bereits mehrfach untersucht (Thomas 1990, Märkl et al. 1991, Merchuk 1991, Hua et al. 1993, Joshi et al. 1996). Gerade bei Kulturen mit hoher Zelldichte oder einem Scale-up steigen die Anforderungen an den erforderlichen Massentransfer und damit gleichzeitig auch an das Prozessequipment und die Stärke der Begasung sowie des Leistungseintrages. Die Auswirkungen hängen jeweils von der Dauer und der Intensität ab, die das jeweilige biologische System den individuellen Bedingungen ausgesetzt ist. Diese können zwar positiv sein (größere Ausbeute an Biomasse, erhöhte Produktion von Sekundärmetaboliten), meistens wird aber auf die negativen Seiten fokussiert (Hooker et al. 1989, Zhong et al. 1995). So ist seit längerem bekannt (Vogelmann et al. 1978, Rosenberg 1987, Dunlop&Namdev 1993, Kieran et al. 1995), dass Pflanzenzellen unter „normalen“ Bedingungen in einem Rührkessel robuster sind als gedacht (in Bezug auf irreparable Zellschäden); allerdings Effekte, wie die Verringerung der Produkt- (Hooker et al. 1990) und Biomasseausbeute (Ho et al. 1995), durchaus auftreten können. Welcher Effekt zu erwarten ist, hängt zum einem vom dem Alter der Zellkultur und zum anderen von der konkret verwendeten Zelllinie selbst ab.

2.3.3.9 Verwendete Kultivierungsstrategien

Nachfolgend dargestellt sind die verwendeten submersen und emersen Kultivierungsstrategien zur Fermentation von *Salvia officinalis*. Genaue Angaben zu den Methoden sind dem Anhang A.1 sowie A.2 zu entnehmen.

2.3.3.9.1 Schüttelkolben

Schüttelkolben sind einfache und preiswerte Laborreaktoren. Ein handelsüblicher Schüttelkolben besitzt weder ein spezielles System zur Gasversorgung, noch mess- oder regeltechnische Einrichtungen (Abbildung 43 A). Aus diesem Grund werden experimentelle Versuche meistens in einem temperierbaren Schüttelinkubationsschrank durchgeführt. Variationen bestehen aus der Anzahl von Stromstörern und der Art des Verschlusses (z.B. Wattestopfen, Metallhaube, Schaumstoffstopfen). Schüttelkolben werden vor allem für die Stammentwicklung und für die Mediumoptimierung eingesetzt, da viele Versuche parallel und kostengünstig durchgeführt werden können. Der Leistungseintrag ist abhängig von der Anzahl der Stromstörer, der Füllhöhe, dem Volumen des Kolbens sowie der Schüttelfrequenz und der Schüttelexzentrizität des verwendeten Schüttelinkubators. Um bei einem Scale-up die gleichen Strömungseigenschaften zu erreichen, müsste das Verhältnis der Exzentrizität des Schüttlers

zum Schüttelkolbenradius konstant gehalten werden. Da eine Variation der Exzentrizität bei den meisten Schüttelinkubatoren nicht möglich ist, ist ein geometrisches Scale-up von kleinen auf große Schüttelkolben schwer umsetzbar. Eine Untersuchung von nicht geometrischen Scale-up-Prozessen kann durch die Anpassung des volumetrischen Leistungseintrages in einem gewissen Rahmen realisiert werden (Chmiel 2006, Storhas 2012).

2.3.3.9.2 Wavebag-Reaktoren

Der Wavebag-Bioreaktor gehört zu den sogenannten „disposable“ oder Einweg-Reaktorsystemen. Er setzt sich somit aus zwei verschiedenen Hauptkomponenten zusammen. Zum einen dem sterilen Kultivierungsbeutel (verschieden große Volumina) und zum anderen der Basisstation, die über eine Kippbewegung die Leistung in die Kultursuspension einbringt (Abbildung 5). An dieser Station können darüber hinaus wichtige verfahrenstechnische Parameter wie Begasungsrate, Temperatur sowie Winkel und Frequenz der Kippbewegung eingestellt und geregelt werden. Durch Bewegung des Tablars der Reaktorstation entstehen Wellen, durch die die Fermentationsbrühe durchmischt und deren Oberfläche kontinuierlich erneuert wird. So kann eine blasenfreie Oberflächenbegasung erreicht werden. Der Leistungseintrag wird größer je kleiner das Füllvolumen ist, je größer der eingestellte Kippwinkel und je schneller die Frequenz ist. Erreichbare Leistungseinträge liegen jedoch deutlich unter denen der zuvor beschriebenen Reaktoren. Die Sauerstofftransferate ist auf der anderen Seite vergleichbar oder liegt höher als die von Schüttelkolben und den meisten anderen Reaktoren, die mit Oberflächenbegasung oder blasenfreier Membranbegasung arbeiten (Eibl et al. 2009). Wavebag-Einwegreaktoren sind gut zur Fermentation von scherstressempfindlichen Organismen geeignet, da kaum Scherkräfte auftreten. Durch die blasenfreie Begasung kann üblicherweise auf Antischaummittel verzichtet werden. Vorteile dieses Reaktorsystems liegen bei dem Entfall von Sterilisation und Reinigung sowie der Flexibilität hinsichtlich der Einsatzgebiete (Eibl et al. 2009). Dem gegenüber stehen hohe Anschaffungskosten der benötigten sterilen Fermentationsbeutel (bags).

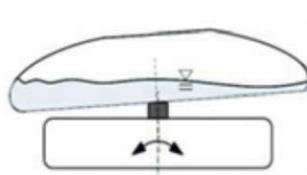


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Wavebagreaktor-Systems



2.3.3.9.3 Agarplatten

Agarplatten sind die einfachste Form der emersen (luftexponierten) Kultivierung. Je nach Größe der Petrischale variiert auch das Volumen des Kulturmediums. Agarplatten sind einfach herzustellen, kostengünstig und benötigen zur Kultivierung lediglich einen Thermoinkubationsschrank. Mess- und Regeltechnik in jeglicher Hinsicht sind nicht vorhanden. Üblicherweise werden Agarplatten zur Anzucht von Vorkulturen, zur Stammhaltung oder für spezielle mikrobiologische Tests verwendet. Letztere basieren auf dem Wachstum von betrachteten Organismen in Abhängigkeit von dem Inhalt, bzw. dem Verzicht von Nährstoffen oder Antibiotika im Medium. In dieser Arbeit werden Agarplatten zum Screening von verschiedenen Parametern wie Licht, pH und Temperatur unter emersen Bedingungen genutzt.

2.3.4 Triterpene

Ursol- und Oleanolsäure (Abbildung 6) gehören zu der Stoffklasse der Triterpene. Sie sind in einer Vielzahl von Medizinalpflanzen wie Ginseng, Ringelblume oder Rosmarin enthalten, darunter auch in Salbei (*Salvia officinalis*). Ihr Gehalt variiert dabei je nach Standort der Pflanze, Zeitpunkt der Ernte und dem Abstand der Pflanzen voneinander zwischen 0,54 - 2,9% (bezogen auf die Trockenmasse). Bei anderen Salbeisorten schwankt der Gehalt von 0,54 - 4,0%. In Deutschland wird auf *Salvia officinalis* zurückgegriffen, obwohl andere Salbeisorten, wie z.B. *Salvia triloba*, laut Untersuchungen des DLR-Rheinpfalz höhere Gehalte von Ursol- und Oleanolsäure aufweisen, diese jedoch nur in mediterranem Klima wachsen. Kowalski (Kowalski 2007) beschreibt in der jüngsten Literatur, dass *Silphium*, *Calendula* und *Panax* sp. weitere interessante Quellen für Oleanol- und Ursolsäure sind.

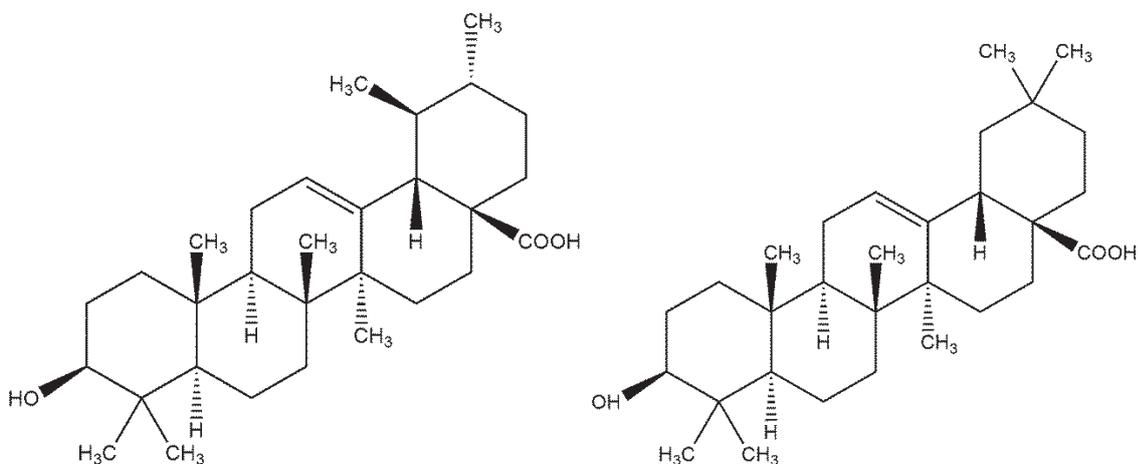


Abbildung 6: Strukturformeln von Ursolsäure (links) und Oleanolsäure (rechts)

Beide Verbindungen verfügen über eine große Zahl beschriebener pharmakologischer Wirkungen und sind daher in der letzten Dekade eingehend untersucht worden (Liu 2005). So wird beschrieben, dass Oleanol- und Ursolsäure positive Effekte im Bereich der Hepatoprotektion, der Entzündungshemmung, der Antihyperlipidemie und der Tumorbekämpfung zeigen. Vor allem letztere ist Gegenstand aktueller Forschungsvorhaben (Jedinak et al. 2006). So zeigten jüngste Untersuchungen, dass Ursolsäure erfolgreich die Proliferation und Migration von Lungenkrebszelllinien hemmt (Huang et al. 2011) und beide Triterpene Apoptose in Leberkrebszelllinien verursachen (Yan et al. 2010). Ursolsäure wirkt sowohl als Cyclooxygenasehemmer (Tsai&Yin 2008) als auch zytotoxisch (Chen et al. 2009). Bei Versuchen mit Farbmäusen konnte eine Verbesserung bei Muskelschwund beobachtet werden. Auch Cholesterin-, Glucose- und Triglyceridspiegelwerte im Blut können durch Ursolsäure verringert werden (Kunkel et al. 2011). Ursolsäure wird darüber hinaus bei der Kosmetikherstellung und in der Lebensmittelindustrie verwendet (2006). Zu den nachgewiesenen Eigenschaften gehört, die hauteigene Kollagenproduktion zu stimulieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Oleanol- und Ursolsäure gefährliche Begleiterscheinungen von Diabetes- Erkrankungen mindern (Wang et al. 2010, Ullevig et al. 2011). Außerdem zeigt Oleanolsäure regulierende Eigenschaften bei verschiedenen Enzymen (Ali et al. 2002). Ebenso sind in der Literatur antibakterielle (Kowalewski et al. 1976) und antifungale (Tang et al. 2000) Wirkungen beschrieben worden. Oleanolsäure wirkt nur schwach zytotoxisch und antioxidativ. Es können jedoch Verbindungen aus Oleanolsäure gewonnen werden, die eine erhöhte Wirksamkeit aufweisen (Bishayee et al. 2011). In China und Japan wird Oleanolsäure bei Lebererkrankungen, Hyperlipidämie und nichtlymphatischer Leukämie eingesetzt. In Japan ist Creme mit Oleanolsäure zur Hautkrebsvorsorge erhältlich (Schmadke 2009).

2.4 Verwendete Stämme von *Salvia officinalis* (inkl. gen. Modifizierungen)

Der in Kapitel 2.3.1 beschriebene Wildtyp von *Salvia officinalis* wurde am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der TU Kaiserslautern durch genetische Modifikation der Stoffwechselaktivität verändert. Die nachfolgenden Informationen basieren auf direkten Informationen des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie der TU Kaiserslautern, wo die genetischen Arbeiten durchgeführt wurden. Ziel dabei war eine Optimierung der Substrataufnahme und damit eine Erhöhung der Ursol- und Oleanolsäureausbeuten.



Für die Optimierung der Triterpensynthese sollte zum einen die Aufnahme von Kohlenhydraten erhöht und zum anderen die Synthese von Stärke daraus verringert werden (Abbildung 7).

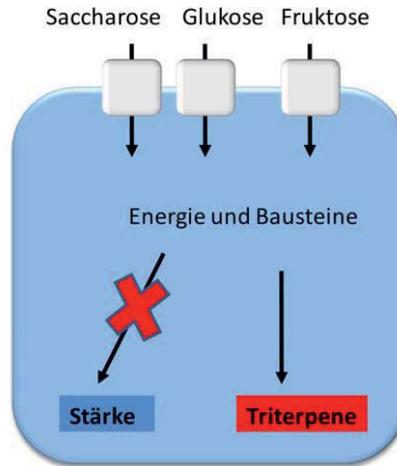


Abbildung 7: Schematische Darstellung der durchgeführten genetischen Modifizierung

Zu einer optimierten Versorgung mit Mono- und Disacchariden wurden genetische Konstrukte erzeugt, die die Expression von Saccharose-, Glucose- und Fructosetransportern ermöglichen. Konkret wurden dazu ein Glukosetransporter aus Arabidopsis (*AtSTP1*, AGI: At1g11260, ⁴⁷), ein Saccharosetransporter aus Arabidopsis (*AtSuc1*, AGI: At1g71880, ⁴⁸) sowie ein Fructosetransporter aus *Botrytis* (*BCFrt1*, Acc. No.: AY738713, ⁴⁹) verwendet. Die Funktion aller genannten Gene wurde zuvor experimentell untersucht. Die Stärkesynthese sollte durch gezielte Reduzierung der enzymatischen Aktivität des erforderlichen Schlüsselenzyms (ADP-Glukose-Pyrophosphorylase, *AGPase*) verringert werden. Dazu wurde zunächst die entsprechende Sequenz in Salbei durch eine PCR mit degeneriertem Primer identifiziert (Abbildung 8).

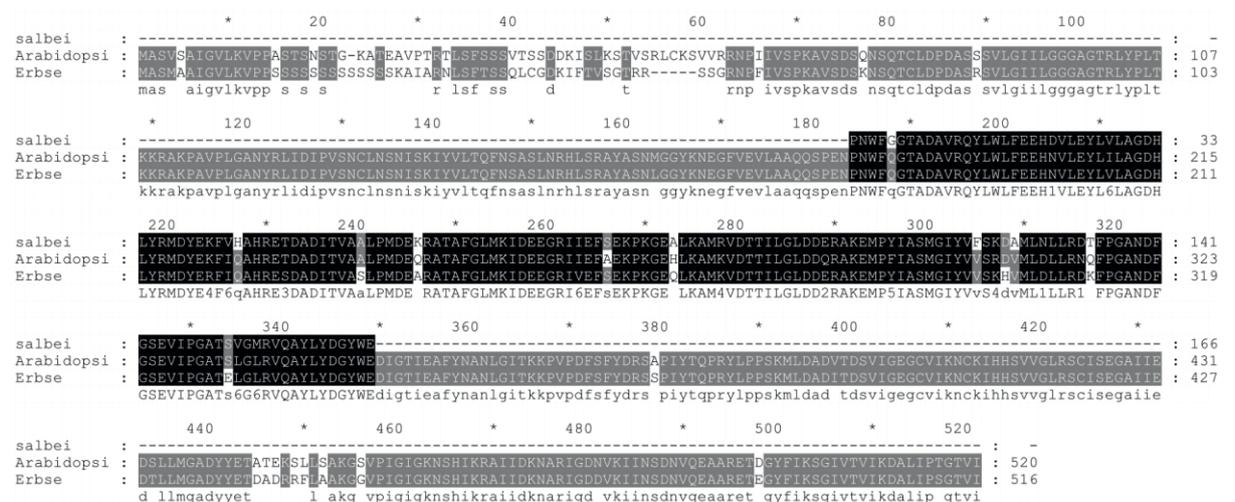


Abbildung 8: In Salbei identifizierte Basensequenz zur Expression des Enzyms *AGPase*.

Das Fragment mit einer Länge von 504 Basenpaaren und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz (168 AS) weist eine sehr hohe Homologie zu bekannten AGPase-Sequenzen aus z.B. Erbse und Arabidopsis auf. Alle benötigten Gene wurden dann in einer Zwei-Schritt-Klonierung in den Vektor pART eingebracht und unter die Kontrolle des konstitutiven Promotors 35S-CamV gestellt. Das fertige Konstrukt wurde durch eine Sequenzierung kontrolliert und anschließend in die Agrobakterienstämme GV3101 und LB2260 eingebracht. Die Agroinfiltration fand auf oberflächensterilisierten Salbeiblättern statt. Die nach der Transformation erhaltenen Kalli wurden ständig auf frische Platten umgesetzt und der Transkriptgehalt bestimmt. Zur exemplarischen Überprüfung des Transformationserfolgs wurden mehrere Kalli vereinigt und eine Suspensionskultur erzeugt. Diese konnte mit Hilfe einer PCR erfolgreich auf den Gehalt der Ziel-DNA getestet werden. Die erzeugten Salbeizellen hatten bei einer Testkultivierung eine um 35 % gesteigerte Aufnahme von Saccharose (Abbildung 9).

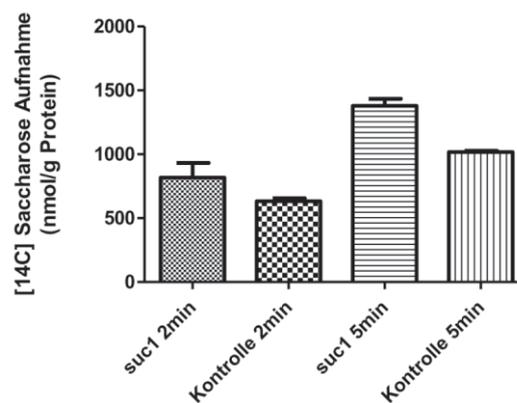


Abbildung 9: Experimentell bestimmte Aufnahme von C^{14} markierter Saccharose in genetisch modifizierten *Salvia officinalis* Stamm.

Ziel war es, insgesamt die Aufnahme von Kohlenhydraten in die Zelle zu steigern und diese gezielt in Richtung Sekundärstoffwechsel (Triterpensynthese) zu verschieben. Dazu wurden insgesamt 2 Stämme erzeugt (Suc 1 und Suc 4), die sich in der Expression der eingebrachten DNA und damit in der Aufnahme von Kohlenhydraten unterscheiden, und in dieser Arbeit untersucht.



2.5 Mixotrophe Kultivierung von *Salvia officinalis* bei verschiedenen Lichtstärken

Die Auswirkung einer photo-mixotrophen Kultivierung von *Salvia officinalis* auf die Bildung von Triterpenen wird in drei verschiedenen Bioreaktorsystemen untersucht. Dazu gehören Schüttelkolben, ein Wavebag-Bioreaktor und Agarplatten. Auf die Kultivierung in einem Rührkessel wurde aufgrund der dort auftretenden hohen Scherkräfte sowie der hohen erforderlichen Startbiomasse zunächst verzichtet. Die Ergebnisse sowie eine Einordnung dieser in bereits publizierte Arbeiten werden nachfolgend dargestellt.

Für die Experimente werden zwei genetisch veränderte Klone des Stammes *Salvia officinalis* verwendet. Für alle Versuche werden beide Klone, nach gleicher Vorkultivierung, in unterschiedlichen Bioreaktionssystemen hinsichtlich der Wachstumsrate, der Biomasse-Zunahme, der Bildung von Triterpenen und ihrer Produktivität untersucht. Zusätzlich wurde, soweit dies möglich war, eine Zuckanalytik durchgeführt, um den Verlauf der Konzentration von Saccharose, Glucose und Fructose während der Fermentation zu bestimmen. Die Wachstumsraten konnten anhand des Verlaufes der Biomasse, die gebildete Biomasse aus der Differenz aus dem Inokulum und der Biomasse am Ende der Kultivierung bestimmt werden. Die Triterpenkonzentrationen wurden nach Extraktion aus der Biomasse bestimmt und die entsprechenden Produktivitäten aus der Menge der gebildeten Triterpene pro Fermentationsvolumen und Zeit berechnet. Weitere Angaben zu den verwendeten Methoden sind ausführlich im Anhang Teil A.2 dargestellt.

2.5.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Die Parameter der Versuche im Schüttelkolben sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Ergebnisse wurden durch Schlachtkolbenexperimente ermittelt, da eine Probennahme während der Kultivierung aus einem Kolben aufgrund des Wachstumsverhaltens der Salbei-Kalluskultur zu großen Schwankungen und Ungenauigkeiten führt. Alle Versuche wurden bei konstanter Temperatur in einem beleuchteten Thermokonstant-Schüttelinkubator (Multitron 2, Infors GmbH) durchgeführt. Um Schwankungen der Ergebnisse weiter zu verringern, wurden die Experimente als dreifacher Ansatz durchgeführt und nach 3, 7, 10, 14, 17 und 21 Tagen eine Probe (3 Kolben) ausgewertet. Für die gesamte Kulturdauer wurden pro Stamm und untersuchtem Parameter 18 Schüttelkolben benutzt.

Tabelle 1: Parameter der Kultivierung von *Salvia officinalis* im Schüttelkolben

Zeit	Temperatur	Kolben	Füllmenge	P/V	k _{La}	Licht	Drehzahl
[d]	[°C]	[mL]	[mL]	[W m ⁻³]	[s ⁻¹]	[μE m ⁻² s ⁻¹]	[rpm]
21	28	300	45	100	n.b.	50-100	120

Die ermittelten Wachstumsraten sind in Abbildung 10 dargestellt. Die maximal erreichte Wachstumsrate von Suc 1 liegt bei 0,138 d⁻¹ und einer Beleuchtung von 100 μE m⁻² s⁻¹, die minimale bei 0,038 d⁻¹ und einer Beleuchtung von 50 μE m⁻² s⁻¹. Bei Suc 4 liegt das Maximum bei 0,219 d⁻¹ und 100 μE m⁻² s⁻¹, das Minimum bei 0,157 d⁻¹ und 50 μE m⁻² s⁻¹. Darüber hinaus kann bei beiden Klonen eine klare Steigerung der Wachstumsrate mit einer Steigerung der Beleuchtungsstärke erkannt werden. Dieser Effekt ist bei Suc 4 besonders deutlich zu erkennen.

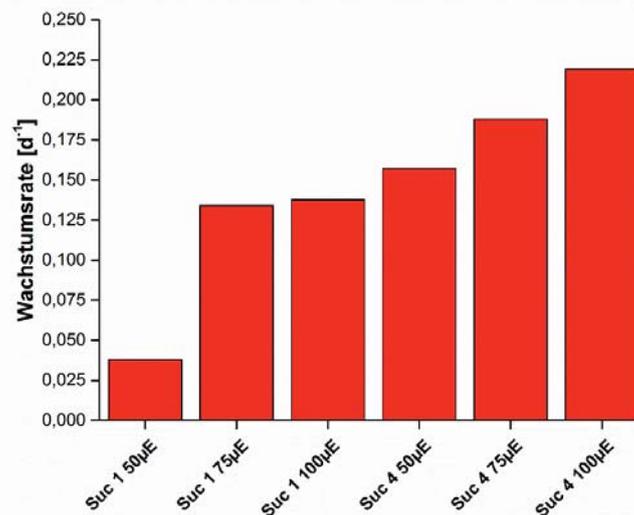


Abbildung 10: Vergleich der Wachstumsraten von *Salvia officinalis* Suc 1 und Suc 4 bei verschiedenen Lichtstärken. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.

Eine Übersicht der gebildeten Biomassen ist in Abbildung 11 dargestellt, welche mit den Wachstumsraten in Abbildung 10 korrelieren. Maximal wurden bei Suc 1 3,31 g L⁻¹ Biotrockenmasse während der Fermentation bei 100 μE m⁻² s⁻¹ und minimal 1,61 g L⁻¹ bei 50 μE m⁻² s⁻¹ gebildet. Auch bei Suc 4 ist bei der Biomasse eine stetige Zunahme von minimal 6,35 g L⁻¹ bei 50 μE m⁻² s⁻¹, über 8,92 g L⁻¹ bei 75 μE m⁻² s⁻¹ bis zu maximal 13,34 g L⁻¹ bei 100 μE m⁻² s⁻¹ zu erkennen. Mit steigender Beleuchtungsintensität steigt also bei beiden Klonen die gebildete Biomasse an.

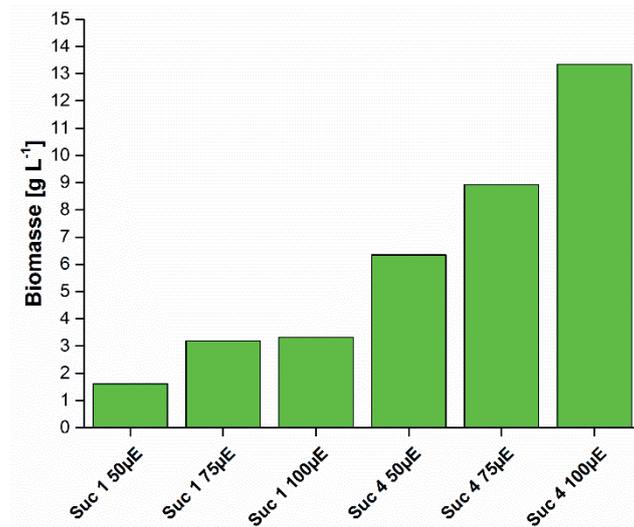


Abbildung 11: Vergleich der produzierten Biomasse von *Salvia officinalis* Suc 1 und Suc 4 bei verschiedenen Lichtstärken. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.

Die gebildeten Konzentrationen der Triterpene Oleanol- und Ursolsäure sind in Abbildung 12 dargestellt. Wie bei der Wachstumsrate und der gebildeten Biomasse korreliert auch hier bei beiden Klonen die Konzentration der Triterpene mit der Lichtstärke während der Kultivierung. Bei Suc 1 steigt die Triterpenkonzentration von 0,516 auf 1,839 mg g⁻¹ BTM für Oleanolsäure und von 0,407 auf 1,606 mg g⁻¹ BTM für Ursolsäure bei einer Erhöhung der Lichtstärke von 75 auf 100 µE m⁻² s⁻¹. Bei Suc 4 steigt die Konzentration von 1,271 auf 2,115 g g⁻¹ BTM bei der gleichen Erhöhung der Lichtstärke für Oleanolsäure und von 1,622 auf 4,358 mg g⁻¹ BTM bei Ursolsäure. Auffällig ist, dass die Konzentration der beiden Triterpene meistens ungefähr gleich groß ist, nur bei Suc 4 und 100 µE m⁻² s⁻¹ ist die Konzentration von Ursolsäure im Vergleich zu Oleanolsäure mehr als doppelt so hoch. Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, konnte für Suc 1, aufgrund der aufgetretenen Messfehler, bei 50 µE m⁻² s⁻¹ keine eindeutige Konzentration der Triterpene bestimmt werden. Die entsprechenden Angaben fehlen daher in Abbildung 12.

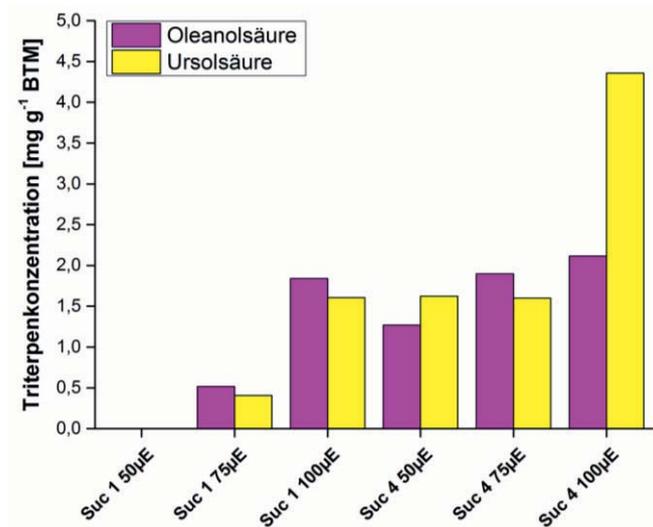


Abbildung 12: Vergleich der produzierten Triterpenkonzentration von *Salvia officinalis* Suc 1 und Suc 4 bei verschiedenen Lichtstärken. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.

Die berechneten Produktivitäten in Bezug auf die Produktion der Triterpene Oleanol- und Ursolsäure sind in Abbildung 13 dargestellt. Es wird deutlich, dass sich die Produktivität von Suc 1 für Oleanol- und Ursolsäure durch einer Erhöhung der Lichtstärke von 75 auf 100 µE m⁻² s⁻¹ deutlich unterscheidet. Der Unterschied beträgt bei Oleanolsäure 0,003 zu 0,012 mg L⁻¹·h⁻¹ und bei Ursolsäure 0,003 zu 0,011 mg L⁻¹·h⁻¹. Bei Suc 4 korreliert auch dieser Parameter mit der Lichtstärke. Je höher diese bei der Fermentation ist, desto höher ist auch die Produktivität. Bei 50 µE m⁻² s⁻¹ liegt sie für Oleanolsäure bei 0,016 mg L⁻¹·h⁻¹, für Ursolsäure bei 0,02 mg L⁻¹·h⁻¹ und bei 100 µE m⁻² s⁻¹ bei 0,06 mg L⁻¹·h⁻¹ bzw. 0,124 mg L⁻¹·h⁻¹.

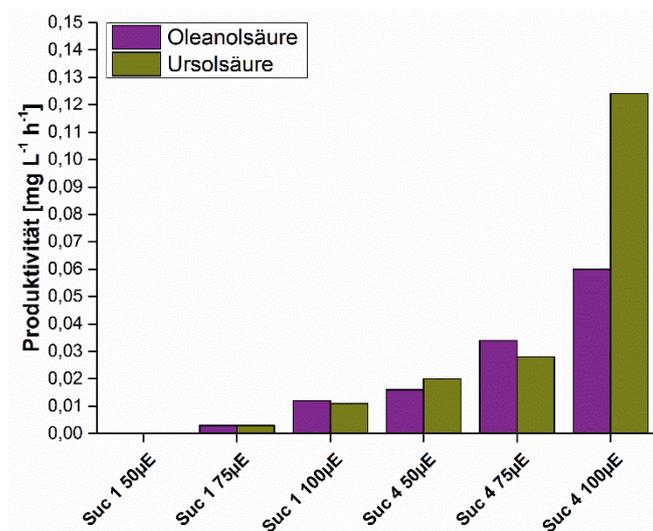


Abbildung 13: Vergleich der Produktivitäten von *Salvia officinalis* Suc 1 und Suc 4 bei verschiedenen Lichtstärken. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.



Durch eine Bestimmung der Konzentration von Saccharose, Glucose und Fructose während der Fermentation können weitere Informationen über das Wachstum gewonnen werden. Das Medium enthält nur Saccharose, die von den Pflanzenzellen durch das Enzym Invertase in Glucose und Fructose gespalten wird. Diese beiden Zucker können dann von der Zelle für den Stoffwechsel direkt genutzt werden. Den Verlauf der drei Zucker während der Kultivierung ist für alle Versuche in Abbildung 14 dargestellt.

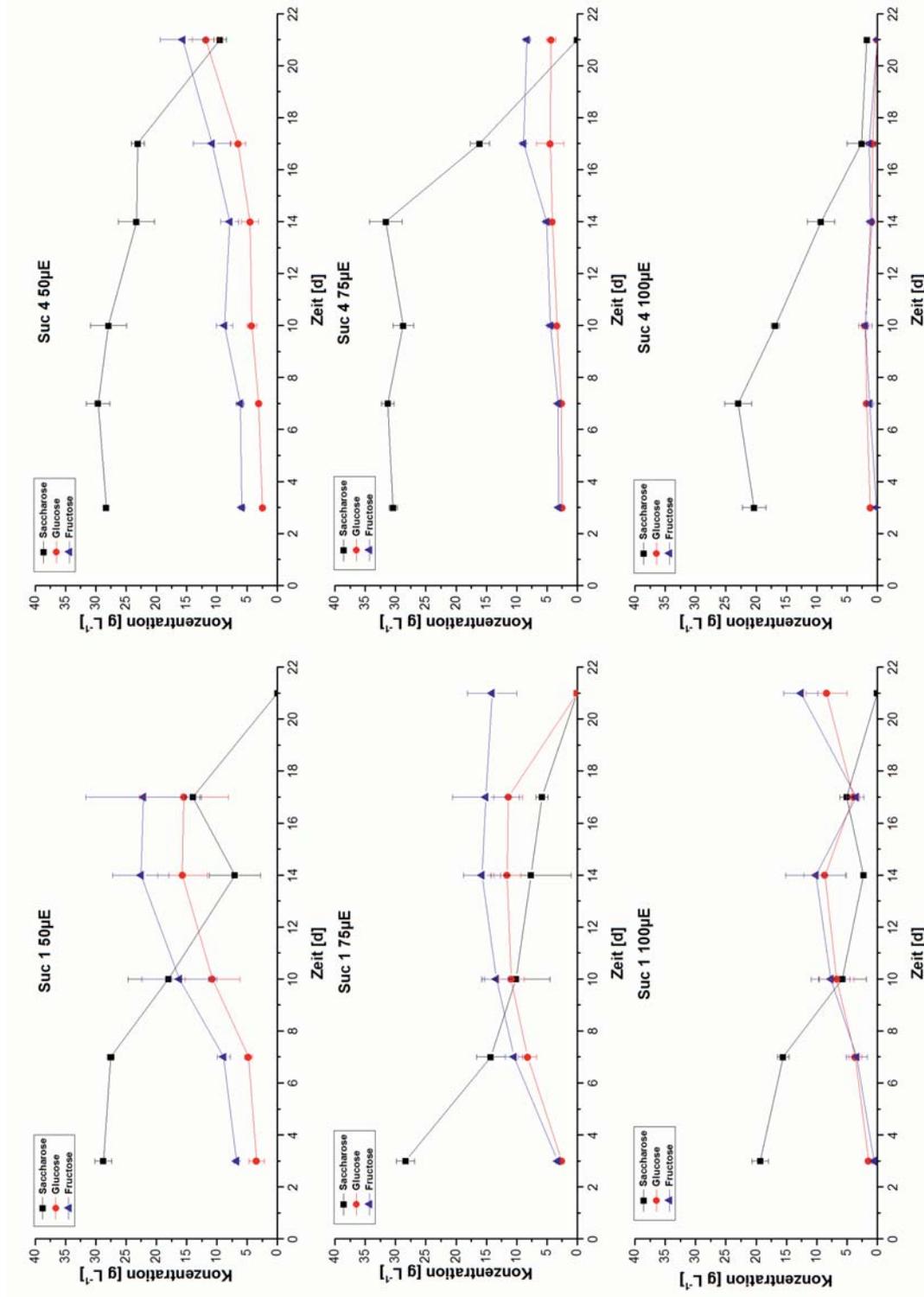


Abbildung 14: Zuckermanalytik der photo-mixotrophen Kultivierung von *Salvia officinalis*. Dargestellt ist der Verlauf der Konzentration von Saccharose, Glucose und Fructose während der Kultivierung von Suc 1 und Suc 4 bei Lichtstärken von 50 bis 100 µE m⁻² s⁻¹. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.



Generell nimmt die Konzentration der primären C-Quelle Saccharose im Laufe der Fermentation ab. Dabei steigt durch die Spaltung von Saccharose die Konzentration von Glucose und Fructose zunächst an (Sturm 1999) und nimmt dann durch Aufnahme in die Zelle wieder ab. Dabei erfolgt zuerst eine Aufnahme von Glucose aufgrund einer 8fach höheren Affinität im Vergleich zu Fructose (Krook et al. 2000). Je größer das Wachstum der Kultur ist, desto schneller nimmt die Konzentration der C-Quelle ab und desto schneller werden Glucose und Fructose in die Zelle aufgenommen und umgesetzt. Bei Suc 1 konnte in allen Versuchen nach 21 Tagen Fermentation keine Saccharose mehr gemessen werden. In dem gleichen Zeitraum erreichte jeweils die Konzentration von Glucose und Fructose ihr Maximum am Ende der Kultivierungszeit. Diese lag für Glucose bei 21 g L^{-1} ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), 0 g L^{-1} ($75 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) und 8 g L^{-1} ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Der Wert bei $75 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ muss in dem Zusammenhang als Ausreißer betrachtet werden, da er nicht zu den anderen Werten passt. Für Fructose lagen die Maxima bei 35 g L^{-1} ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), 14 g L^{-1} ($75 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) und $12,6 \text{ g L}^{-1}$ ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Besonders kritisch sind hier die Ergebnisse bei $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ zu bewerten, da nicht mehr Zucker (Glucose und Fructose) entstehen können, als initial in Form vom Saccharose vorhanden war. Die beobachteten Messfehler (die sich auch in den dargestellten Fehlerbalken widerspiegeln) machen eine klare Aussage unmöglich. Dementsprechend wurden die Ergebnisse auch nicht für Abbildung 12 und Abbildung 13 verwendet, bzw. nach 21 Tagen in Abbildung 14 dargestellt. Bei Suc 4 konnte am Ende der Kultivierung bei $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ noch ein Wert von 9 g L^{-1} Saccharose gemessen werden. Bei beiden anderen untersuchten Lichtstärken war zu diesem Zeitpunkt keine Konzentration mehr messbar. Wie bei Suc 1 konnte hinsichtlich der Monosaccharide Glucose und Fructose die jeweils höchste Konzentration am Ende der Kultivierung gemessen werden, mit Ausnahme des Versuches bei $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. In diesem Versuch konnten beide Zucker am Ende der Fermentation nicht mehr nachgewiesen werden. In den beiden anderen Versuchen lag das Maximum von Glucose bei 11 g L^{-1} ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) und 4 g L^{-1} ($75 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) und das von Fructose bei 15 g L^{-1} ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) und 8 g L^{-1} ($75 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Bei allen Versuchen ist der Trend zu erkennen, dass die Endkonzentration der Zucker mit steigender Lichtstärke niedriger wird bzw. gar nicht mehr nachweisbar ist. Weitere Unterschiede lassen sich in der Geschwindigkeit des Saccharoseabbaus erkennen. Auch dieser nimmt mit steigender Lichtstärke zu.

Es wurde erwartet, dass sowohl die Wachstumsraten als auch die gebildete Biomasse mit steigender Lichtstärke bis zu einem Optimum zunehmen (Schopfer&Brennicke 2010). Dies wurde bereits von Alkhamis et al. am Beispiel der Mikroalge *Isochrysis galbana* demonstriert, die ebenfalls mixotroph als Suspensionskultur (Schüttelkolben) bei Lichtstärken zwischen 25

und $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kultiviert wurde (Alkhamis&Qin 2013). Die Triterpene Oleanol- und Ursolsäure werden aus Stoffwechselintermediaten intrazellulär gebildet (Acetyl-CoA, GAP)(Flores-Sanchez et al. 2002), weswegen erwartet wurde, dass auch sie mit einer erhöhten Verfügbarkeit dieser Intermediate verstärkt gebildet werden. Treat und Kollegen veröffentlichten bereits 1989 eine Studie, die darauf hinweist, dass die Produktion von Sekundärmetaboliten durch eine mixotrophe Kultivierung gesteigert werden kann (Treat et al. 1989). Da sich die Produktivität der Triterpenproduktion aus der gebildeten Konzentration der Triterpene pro Zeit zusammensetzt, muss demnach auch sie mit einer Erhöhung der Lichtstärke steigen, wenn die bereits genannten Annahmen zutreffen. Veröffentlichte Arbeiten zur Untersuchung der Triterpenbildung in Abhängigkeit von der Lichtstärke während einer mixotrophen Kultivierung sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt.

Die Erwartungen konnten anhand beider Klone erfüllt werden, wobei der Effekt bei Suc 4 am deutlichsten zu erkennen war. Mit steigender Lichtstärke nehmen alle betrachteten Parameter zu. Unterstützt werden diese Daten auch durch die Ergebnisse der Zuckernalytik. Im Medium ist zu Beginn der Fermentation nur Saccharose vorhanden, die dann zu Glucose und Fructose gespalten und für Stoffwechselreaktionen in die Zelle aufgenommen wird. Je schneller also die Konzentration von Saccharose im Medium abnimmt, bzw. je kleiner die Konzentrationen von Glucose und Fructose während der Kultivierung sind, desto stoffwechselaktiver ist die Kultur. Um die eingangs genannten Erwartungen zu erfüllen, müsste also mit steigender Lichtstärke die Abnahme der Zuckerkonzentrationen steigen und ihre Endkonzentrationen fallen. Dieser Effekt lässt sich bei beiden Klonen von *Salvia officinalis* beobachten und belegt damit die dargestellten Daten der Wachstumsraten, der gebildeten Biomassen, der Triterpenkonzentration sowie der Produktivität. So ist z.B. bei dem Versuch mit Suc 1 und $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durch die Zuckernalytik zu erkennen, dass Saccharose in etwa gleich schnell zu Glucose und Fructose umgesetzt wird wie in dem Versuch mit $75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, und auch die Endkonzentrationen von Glucose und Fructose sind vergleichbar groß. Dies ist auch anhand der annähernd gleich großen Wachstumsrate sowie der gebildeten Biomasse erkennbar. Gleiches gilt für Suc 4, wo mit steigender Lichtstärke während der Kultivierung der Abbau von Saccharose- und der Aufbau von Glucose und Fructose schneller erfolgt. Dementsprechend nahm sowohl die Wachstumsrate als auch die gebildete Biomasse mit steigender Lichtstärke zu. Die Zuckernalytik spiegelt somit sehr gut die dargestellten Kultivierungsergebnisse wider, mit Ausnahme der aufgetretenen Messfehler bei Suc 1 und einer Lichtstärke von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Auch bei der Konzentration der Triterpene und der Produktivität werden die Erwartungen für beide Klone erfüllt. Mit steigender Lichtstärke nimmt sowohl die Konzentration der Triterpene



Oleanol- und Ursolsäure zu, also auch die Produktivität. Dieser Effekt wird besonders am Beispiel von Suc 1 deutlich. Hier steigt die Konzentration der Triterpene um 256 % bei Oleanolsäure und um 294 % bei Ursolsäure. Bei Suc 4 ist eine Steigerung von 66 % bei Oleanolsäure und 168 % bei Ursolsäure bestimmt worden. Daraus ergibt sich auch eine Steigerung der Produktivität, die mit der Lichtstärke korreliert. Sie liegt für Suc 1 bei 300 % für Oleanolsäure und 266 % bei Ursolsäure. Bei Suc 4 fällt der Effekt bei der Produktivität noch höher aus und konnte bei Oleanolsäure um 275 % und bei Ursolsäure sogar um 520 % gesteigert werden. Insgesamt lässt sich somit ein deutlich positiver Effekt durch eine Steigerung der Lichtstärke auf die Produktion von Triterpenen feststellen. Die Unterschiede zwischen Suc 1 und Suc 4 kommen vermutlich durch die verschieden starke Expression der eingebrachten DNA zustande, wodurch es zu Unterschieden in der Aufnahme von Kohlenhydraten aus dem Medium kommt (siehe Kapitel 2.4 und Abbildung 14). Ohne weitere Informationen zu den einzelnen Klonen durch den Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie können die beobachteten Unterschiede zum jetzigen Zeitpunkt nicht genauer erklärt werden. Ein Vergleich zu der heterotrophen Kultivierung ist Kapitel 2.6 und eine Einordnung in bereits veröffentlichte Untersuchungen mit dem Wildtyp von *Salvia officinalis* Kapitel 2.8 zu entnehmen.

2.5.2 Kultivierung im Wavebag-Reaktor

Als Vergleich zu den zuvor beschriebenen Versuchen in Schüttelkolben, wurde als weiteres submerses Bioreaktorsystem der Wavebag-Reaktor verwendet. Um die beiden Systeme vergleichen zu können, wurden die Kultivierungsparameter so ähnlich wie möglich gehalten. Eine Übersicht der verwendeten Parameter ist in Tabelle 2 dargestellt. Anders als bei den Schüttelkolben wurden die Proben direkt aus der Kultursuspension entnommen, wodurch insgesamt weniger Biomasse pro Probe für eine Analyse zur Verfügung stand. Eine Untersuchung von verschiedenen Lichtstärken war aufgrund der technischen Gegebenheiten nicht möglich.

Tabelle 2: Parameter der Kultivierung von *Salvia officinalis* im Wavebagreaktor

Zeit	Temp.	Wavebag	Füllmenge	P/V	k _{La}	Licht	Frequenz	Winkel
[d]	[°C]	[mL]	[mL]	[W m ⁻³]	[s ⁻¹]	[μE m ⁻² s ⁻¹]	[min ⁻¹]	[°]
18	28	2000	1000	70	n.b.	50	20	7

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Versuche mit Suc 1 und Suc 4 im Wavebagreaktor bei einer konstanten Lichtstärke von 50 μE m⁻² s⁻¹ dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die Wachstumsraten als auch die gebildete Biomasse beider Klone ähnliche Werte

erreichen. Für Suc 1 konnte eine Wachstumsrate von $0,342 \text{ d}^{-1}$ und eine gebildete Biomasse von $3,98 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt werden, bei Suc 4 eine Wachstumsrate von $0,322 \text{ d}^{-1}$ und eine Biomasse von $4,49 \text{ g L}^{-1}$. Große Unterschiede sind hingegen bei den gebildeten Triterpenen und deren Produktivität zu erkennen. Suc 1 produzierte insgesamt $0,098 \text{ mg g}^{-1}$ BTM Oleanolsäure und $0,096 \text{ mg g}^{-1}$ BTM Ursolsäure. Die Produktivität liegt somit bei $1 \mu\text{g L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ für Oleanolsäure und Ursolsäure.

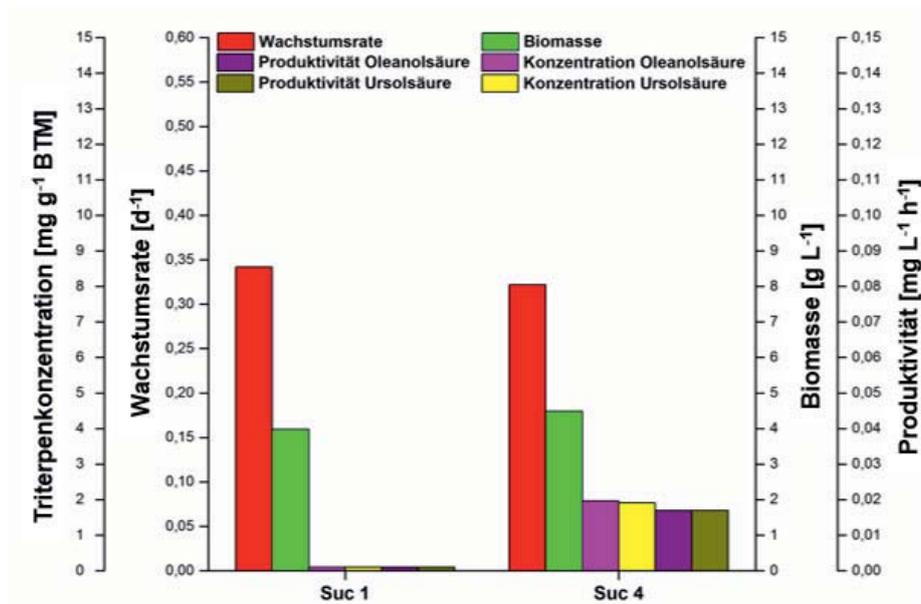


Abbildung 15: Übersicht der Kultivierung von *Salvia officinalis* im Wavebagreaktor. Bestimmt wurde in einer Kulturzeit von 21 Tagen die Wachstumsrate (rot), die gebildete Biomasse (grün), die Konzentration der gebildeten Triterpene Oleanolsäure (magenta) und Ursolsäure (gelb), sowie deren Produktivitäten (Oleanolsäure lila, Ursolsäure oliv). Die Experimente wurden bei $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, einer Kippfrequenz von 20 min^{-1} , einem Winkel von 7° , einer Lichtstärke von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 18 Tagen, in 2 L Wavebags mit einem Füllvolumen von 1 L durchgeführt.

Bei Suc 4 wurden $1,96 \text{ mg g}^{-1}$ BTM Oleanolsäure und $1,91 \text{ mg g}^{-1}$ BTM Ursolsäure gemessen und daraus Produktivitäten von $0,017 \text{ mg L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ für beide Triterpene berechnet. Beide Kenngrößen sind demnach bei Suc 4 im Vergleich zu Suc 1 etwa 20mal so hoch. Der Verlauf der Konzentration von Saccharose, Glucose und Fructose während der Fermentation ist in Abbildung 16 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Konzentration von Saccharose bei beiden Versuchen vergleichbar schnell auf eine Endkonzentration von 5 g L^{-1} bei Suc 1 und $3,9 \text{ g L}^{-1}$ bei Suc 4 abnimmt. Die Endkonzentrationen von Glucose und Fructose liegen im Versuch mit Suc 1 bei $1,6$ bzw. $1,5 \text{ g L}^{-1}$ und im Vergleich für Suc 4 bei $8,3$ bzw. $8,7 \text{ g L}^{-1}$. Am Ende der Fermentation ist hier also die Konzentration der beiden Monosaccharide mehr als 5mal so hoch.

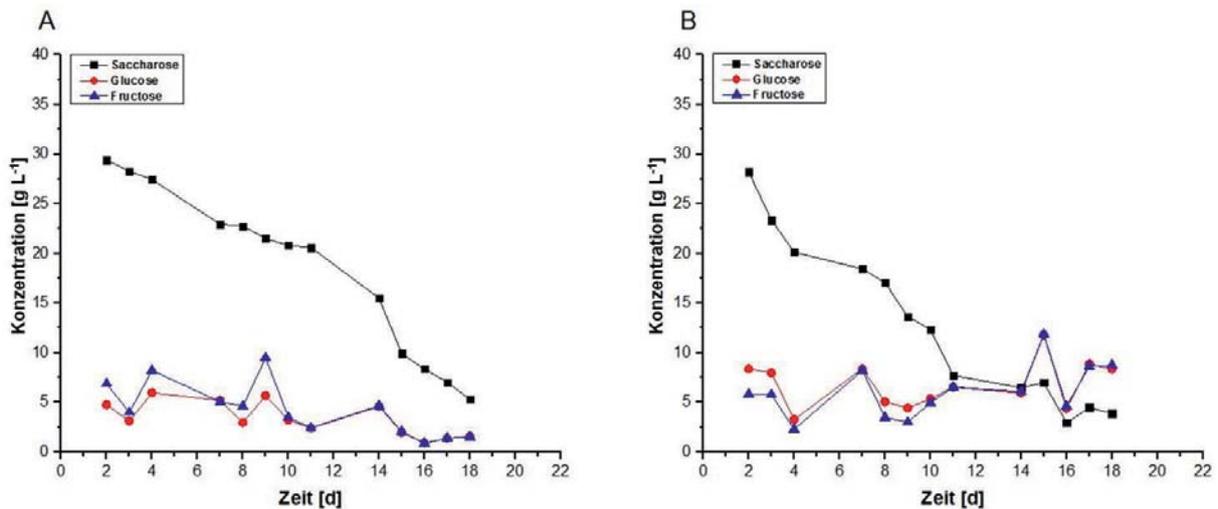


Abbildung 16: Zuckermanalytik der Versuche im Wavebagreaktor. A = Verlauf der Zuckerkonzentrationen von Saccharose, Glucose und Fructose bei Suc 1. B = Verlauf der Zuckerkonzentrationen von Saccharose, Glucose und Fructose bei Suc 4. Die Experimente wurden bei 28 °C, einer Kippfrequenz von 20 min⁻¹, einem Winkel von 7°, einer Lichtstärke von 50 μE m⁻² s⁻¹ unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 18 Tagen, in 2 L Wavebags mit einem Füllvolumen von 1 L durchgeführt.

Grundsätzlich gelten für den Wavebagreaktor die gleichen Annahmen wie bei den Versuchen im Schüttelkolben. Es sollte geprüft werden, ob durch die Art der Kultivierung in dem Wavebagreaktor eine Verbesserung der Wachstumsraten, der Biomassebildung und der Produktion der Triterpene zu erreichen ist. Da der Leistungseintrag vergleichbar zu den Versuchen im Schüttelkolben war, unterscheiden sich die Versuche nur durch die Funktionsweise und Geometrie der Bioreaktoren. Ein Wavebagreaktor erzeugt durch seine Kippbewegung und die wellenförmige Durchmischung der Kultursuspension weniger Scherkräfte als der Schüttelkolben und hat darüber hinaus eine deutlich größere Oberfläche für den Gasaustausch. Zudem erfolgt eine kontinuierliche Begasung der Kultur. Es wurde daher erwartet, dass sich die oben genannten Kenngrößen durch eine Kultivierung im Wavebagreaktor verbessern lassen, da Pflanzenzellen zu den scherempfindlichen Kulturen zählen (Evans et al. 2003).

Anders als bei den Versuchen im Schüttelkolben sind im Wavebagreaktor die Wachstumsraten und die gebildete Biomasse der beiden Klone Suc 1 und 4 unter gleichen Bedingungen sehr ähnlich. Deutliche Unterschiede treten erst bei den Konzentrationen der Triterpene und daraus resultierend bei der Produktivität auf. In dieser Beziehung bildet Klon Suc 4 im Wavebagreaktor 19mal so viele Triterpene und ist 17mal so produktiv wie Suc 1. Derart deutliche Unterschiede wurden im Schüttelkolben nicht beobachtet. Die Zuckermanalytik spiegelt auch hier sehr gut das Ergebnis der Wachstumsraten und der gebildeten Biomasse wider. Wie man erkennen kann, nimmt die Konzentration der Saccharose während der

Kultivierung bei beiden Klonen in etwa gleich schnell ab, und die Konzentrationen von Glucose und Fructose sind auch im Verlauf in etwa gleich hoch. Lediglich die Konzentration von Glucose und Fructose am Ende der Kultivierung ist bei Suc 4 erkennbar größer als bei Suc 1. Da die Wachstumsraten und die gebildete Biomasse aber in etwa gleich hoch sind, ist dies durch Schwankungen bei der Probennahme zu erklären.

Die Erwartungen wurden im Fall der Wachstumsraten bei beiden Klonen klar erfüllt. Diese sind ca. doppelt so hoch wie die Wachstumsraten im Schüttelkolben bei gleicher Lichtstärke im Fall von Suc 4 und sogar 9mal so hoch bei Suc 1. Die gebildete Biomasse ist bei Suc 4 niedriger, als im Schüttelkolben wo insgesamt etwa 2 g L^{-1} mehr Biomasse gebildet wurde, während sie bei Suc 1 mehr als doppelt so hoch ist. Auch die Konzentration der Triterpene ist im Schüttelkolben für Suc 4 niedriger. So können durch die Kultivierung im Wavebagreaktor 54 % mehr Oleanolsäure- und 18 % mehr Ursolsäure gebildet werden. Bei der Betrachtung der Produktivität gleicht sich die kürzere Kultivierungsdauer der Wavebag-Fermentation wieder aus. Die Produktivität ist mit $0,017 \text{ mg L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ für beide Triterpene im Wavebagreaktor fast identisch zu der im Schüttelkolben, die bei $0,016 \text{ mg L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ für Oleanolsäure und $0,02 \text{ mg L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ für Ursolsäure liegt. Obwohl durch die Kultivierung im Wavebagreaktor die Wachstumsraten wie erwartet gesteigert werden konnten, führte dies nur bei Suc 1 zu der erwarteten höheren Bildung von Biomasse. Dadurch konnte die Produktivität der Fermentation im Vergleich zum Schüttelkolben nicht gesteigert werden. Allerdings fehlen entsprechende Vergleichsdaten für Suc 1, der auf die Kultivierungsbedingungen im Wavebagreaktor im Vergleich deutlich besser angesprochen hat. Dies legt den Schluss nahe, dass Suc 1 im Vergleich zu Suc 4 scherempfindlicher ist oder eine größere Fläche für den Gasaustausch benötigt, weshalb mehr Biomasse im Wavebagreaktor gebildet wird. Suc 4 ist hingegen weniger scherempfindlich, so dass durch die mit einem höheren Leistungseintrag verbundenen positiven Effekte im Schüttelkolben auch mehr Biomasse gebildet wird. Die möglichen organismusspezifischen Effekte von Scherstress auf Biomasse- und Produktbildung wurden bereits in Kapitel 2.3.3.8 dargestellt und hier experimentell bestätigt. Ob dieser Effekt als allgemein gültig angesehen werden kann oder ob es sich um eine Momentaufnahme handelt, müssen zukünftige Versuche zeigen. Diese sollten z. B. gezielt den optimalen Zeitpunkt der Zellernte untersuchen, um einen Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Produktivität zu vermeiden. Erste Ansätze hierzu liefern z. B. Haas et al. durch Versuche mit einer online-Analytik von *Salvia officinalis* (Haas et al. 2014).



2.5.3 Kultivierung auf Agarplatten

Um zu prüfen, ob die emerse Kultivierung von *Salvia officinalis* zukünftig eine Alternative zur submersen Suspensionskultur sein kann, wurden Testkultivierungen durchgeführt und zunächst nur die Wachstumsrate und die gebildete Biomasse ermittelt. Wie bei den Versuchen im Schüttelkolben wurden drei verschiedene Lichtstärken während der Kultivierung verwendet. Die Ergebnisse der Wachstumsraten von Suc 1 und Suc 4 sind in Abbildung 17 dargestellt.

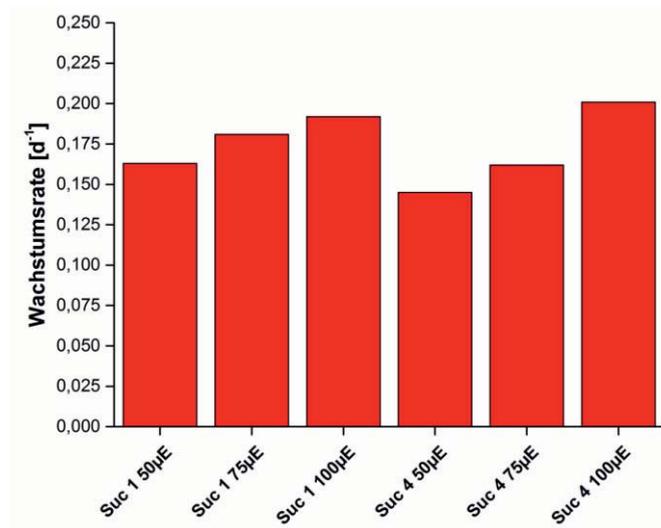


Abbildung 17: Übersicht der Wachstumsraten von *Salvia officinalis* auf Agarplatten bei drei verschiedenen Lichtstärken. Die Experimente wurden bei 28 °C, unter Verwendung von LS-Medium mit Agar über einen Zeitraum von 21 Tagen, in Petrischalen mit einem Füllvolumen von 10 mL durchgeführt.

Die minimalen und maximalen Wachstumsraten beider Klone sind jeweils bei 50 und 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sehr ähnlich. Sie liegen für Suc 1 bei 0,163 d^{-1} (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 0,192 d^{-1} (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und für Suc 4 bei 0,145 d^{-1} bzw. 0,201 d^{-1} . Bei 75 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurde für Suc 1 eine Wachstumsrate von 0,0,181 d^{-1} ermittelt und für Suc 4 0,162 d^{-1} . Insgesamt lag die höchste Zuwachsrate beider Klone somit bei einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die gebildeten Biomassen der einzelnen Versuche sind in Abbildung 18 dargestellt. Bei allen drei Lichtstärken liegt die gebildete Biomasse für Suc 1 bei ca. 1 g L^{-1} und nimmt mit steigender Lichtstärke leicht zu (0,8-1,1 g L^{-1}). Bei Suc 4 nimmt die Biomasse mit steigender Lichtstärke hingegen ab. Während bei 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 6,3 g L^{-1} gebildet wurden, waren es bei 75 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 4,3 g L^{-1} und bei 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nur noch 3,5 g L^{-1} . Insgesamt wurde bei Suc 4 im Schnitt 4mal so viel Biomasse gebildet wie bei Suc 1, unter den jeweils besten Bedingungen sogar fast 6mal so viel.

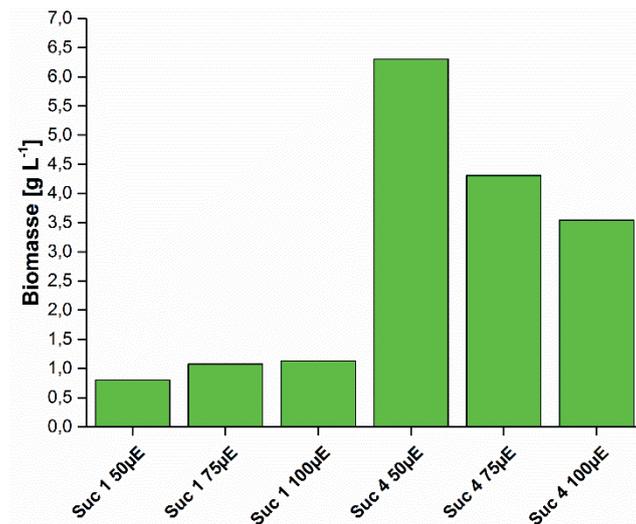


Abbildung 18: Übersicht der gebildeten Biomasse von *Salvia officinalis* auf Agarplatten bei drei verschiedenen Lichtstärken. Die Experimente wurden bei 28 °C, unter Verwendung von LS-Medium mit Agar über einen Zeitraum von 21 Tagen, in Petrischalen mit einem Füllvolumen von 10 mL durchgeführt.

Bei einer emersen Kultivierung auf Agarplatten steht der Zellkultur die gleiche Konzentration an Nährstoffen, bezogen auf das Volumen des Nährmediums, zur Verfügung wie in der submersen Suspensionskultur. Da im Vergleich aber insgesamt nur ein Fünftel des Volumens vorhanden ist, sind auch insgesamt weniger Nährstoffe vorhanden. Darüber hinaus findet keine Durchmischung der Kultur durch einen mechanischen Leistungseintrag statt, so dass die diffusive Nährstoffaufnahme bei einem dreidimensionalen Wachstum behindert wird. Positiv wirkt sich hingegen die bessere Verfügbarkeit von CO₂ aus, welches in Luft 10000mal schneller diffundiert als in Wasser (Pritchard&Currie 1982, Cadogan et al. 2014). Es wurden daher Testkultivierungen auf Agarplatten durchgeführt, um zu prüfen, in wie weit sich Wachstumsraten und die Bildung von Biomasse unterscheiden und wie groß der Einfluss der oben beschriebenen Effekte ist.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Wachstumsraten von 50 bis 100 µE m⁻² s⁻¹ innerhalb der Versuchsreihe von einem Klon jeweils zunehmen. Zwischen beiden Klonen gibt es bei diesen Versuchen, genauso wie in dem Wavebagreaktor, kaum Unterschiede. Suc 4 zeigt allerdings bei allen Kultivierungsmethoden eine höhere Wachstumsrate als Suc 1. Die Werte der Wachstumsraten auf Agarplatten sind vergleichbar zu denen im Schüttelkolben, lediglich im Wavebagreaktor wurden deutlich höhere Wachstumsraten bestimmt. Bei höheren Lichtstärken nimmt die gebildete Biomasse von Suc 4 auf Agarplatten ab und zeigt damit einen gegenläufigen Trend zu dem im Schüttelkolben. Dies liegt vermutlich an der durch das stärkere Licht verursachten erhöhten Verdunstung von Wasser im Laufe der Fermentation. So konnte trotz der vergleichbar hohen Wachstumsraten insgesamt weniger Biomasse gebildet werden.



Bei Suc 1 nimmt die Biomasse mit steigender Lichtstärke leicht zu. Im Vergleich zu Suc 4 kann aber deutlich weniger Biomasse gebildet werden. Maximal werden 1 g Biomasse bei Suc 1 gebildet, was einem Drittel der minimalen Biomassebildung von Suc 4 bei $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entspricht. Bezieht man die gebildete Biomasse der Agarplatten auf das verwendete Medium, müssten die dargestellten Werte in etwa mit 2,5 multipliziert werden. Genaue Angaben sind hier nicht möglich, da die exakte Menge des Mediums, das zur Erstellung der Agarplatten verwendet wurde, nicht bekannt ist. Annäherungsweise kann von 20 mL ausgegangen werden, so dass maximal 15 g L^{-1} Biomasse bei Suc 4 und $2,5 \text{ g L}^{-1}$ bei Suc 1 auf Agarplatten gebildet worden wären. Somit sollte eine emerse Kultivierung für die Herstellung von Triterpenen für zukünftige Versuche mit in Betracht gezogen werden.

2.6 Vergleich mit heterotropher Kultivierung von *Salvia officinalis*

Um die Ergebnisse der photo-mixotrophen Kultivierung einordnen zu können, werden sie in dem nachfolgenden Kapitel mit Ergebnissen einer klassischen heterotrophen Kultivierung verglichen. Die Daten der heterotrophen Kultivierung in diesem Abschnitt sind mit den gleichen Klonen von *Salvia officinalis* und unter den gleichen Kulturbedingungen während der Dissertation von Benjamin Ludwig am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der TU Kaiserslautern ermittelt worden (Ludwig 2014). Die Parameter der heterotrophen Kultivierung sind jeweils identisch zu den dargestellten Parametern in Tabelle 1 und Tabelle 2.

Der Vergleich soll zeigen, ob durch eine photo-mixotrophe Kultivierung die Produktion der Triterpene Oleanol- und Ursolsäure verbessert werden kann.

2.6.1 Vergleich der Wachstumsraten

Der Vergleich der Wachstumsraten von photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von *Salvia officinalis* ist in Abbildung 19 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Wachstumsrate von Suc 1 bei einer Fermentation ohne Licht mit $0,001 \text{ d}^{-1}$ um ein Vielfaches geringer ist, als die maximale Wachstumsrate von Suc 1 mit Licht ($0,138 \text{ d}^{-1}$ bei $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Bei Suc 4 ist die maximal erreichte Wachstumsrate mit Licht ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mit $0,219 \text{ d}^{-1}$ etwa doppelt so hoch als ohne Licht mit $0,1 \text{ d}^{-1}$.

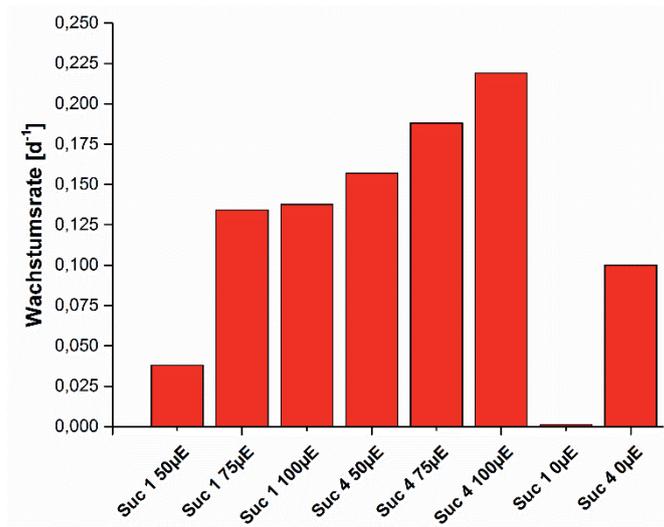


Abbildung 19: Vergleich der Wachstumsraten in photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von *Salvia officinalis* im Schüttelkolben. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.

Die erreichten Wachstumsraten im Wavebagreaktor werden in Abbildung 20 vergleichend dargestellt. Anders als im Schüttelkolben erreicht Suc 1 mit Licht eine größere Wachstumsrate (0,342 d^{-1}), sowohl als Suc 4 ohne Licht (0,31 d^{-1}) als auch Suc 4 mit Licht (0,322 d^{-1}). Die Wachstumsrate von Suc 1 ohne Licht ist sehr viel geringer und wurde bei 0,011 d^{-1} ermittelt.

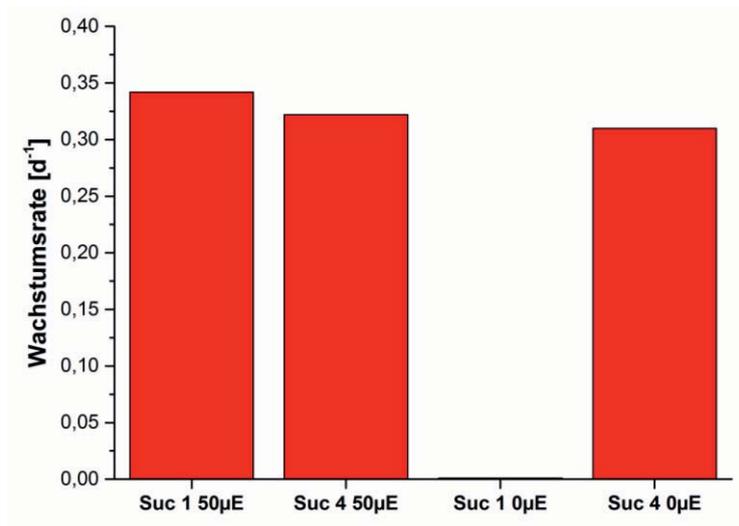


Abbildung 20: Vergleich der Wachstumsraten in photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von *Salvia officinalis* im Wavebagreaktor. Die Experimente wurden bei 28 °C, einer Kippfrequenz von 20 min^{-1} , einem Winkel von 7°, einer Lichtstärke von 50 $\mu E m^{-2} s^{-1}$ unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 18 Tagen, in 2 L Wavebags mit einem Füllvolumen von 1 L durchgeführt.



2.6.2 Vergleich der erhaltenen Biomasse

Die gebildeten Biomassen sind in Abbildung 21 dargestellt. Die erreichte Biomasse von Suc 1 ohne Licht ist mit 12 g L^{-1} deutlich höher als die maximal erreichte Biomasse bei $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mit knapp $3,3 \text{ g L}^{-1}$. Durch eine Beleuchtung von $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ kann bei Suc 4 auf der anderen Seite mit $13,3 \text{ g L}^{-1}$ etwas mehr Biomasse gebildet werden als ohne Licht mit $12,3 \text{ g L}^{-1}$.

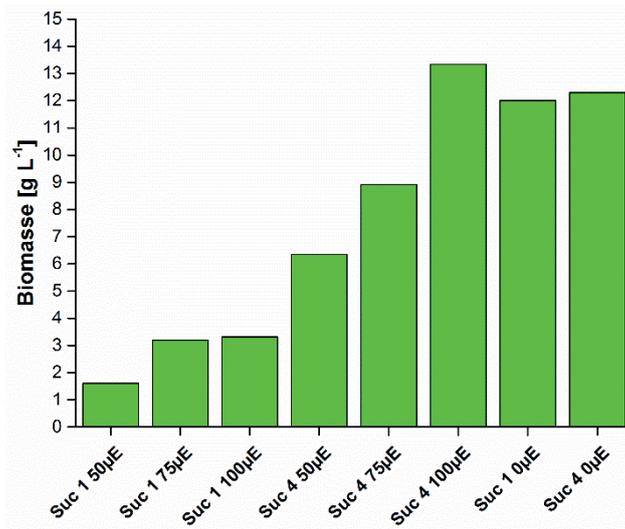


Abbildung 21: Vergleich der erhaltenen Biomasse aus photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von *Salvia officinalis* im Schüttelkolben. Die Experimente wurden bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$, 120 rpm , unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.

Der Vergleich der gebildeten Biomassen im Wavebag ist in Abbildung 22 dargestellt. Bei Suc 1 konnte durch eine Kultivierung bei $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ eine Biomasse von $3,98 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt werden, während es ohne Beleuchtung $11,7 \text{ g L}^{-1}$ waren. Für Suc 4 wurde unter heterotrophen Bedingungen eine Zunahme der Biomasse von $14,1 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt, was ebenfalls deutlich höher ist als in dem Versuch mit Licht, in dem $4,5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht wurden.

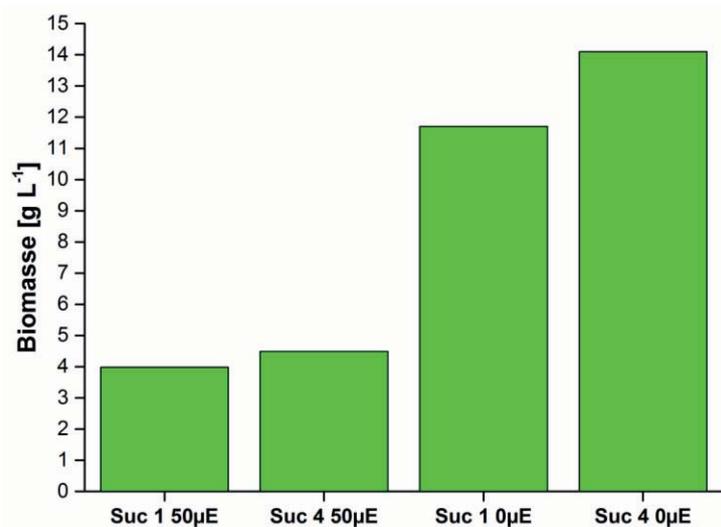


Abbildung 22: Vergleich der erhaltenen Biomasse aus photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von *Salvia officinalis* im Wavebagreaktor. Die Experimente wurden bei 28 °C, einer Kippfrequenz von 20 min⁻¹, einem Winkel von 7°, einer Lichtstärke von 50 µE m⁻² s⁻¹ unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 18 Tagen, in 2 L Wavebags mit einem Füllvolumen von 1 L durchgeführt.

2.6.3 Vergleich der erhaltenen Triterpene

Die gebildeten Konzentrationen der Triterpene sind in Abbildung 23 dargestellt. Ohne Licht konnten für Suc 1 jeweils 0,2 mg g⁻¹ BTM gemessen werden, was sehr viel geringer ist als die maximale Konzentration von 1,8 und 1,6 mg g⁻¹ BTM bei 100 µE m⁻² s⁻¹. Bei Suc 4 wurden ohne Beleuchtung während der Fermentation hingegen nur 0,25 mg g⁻¹ BTM Oleanolsäure und 0,31 mg g⁻¹ BTM Ursolsäure gebildet. Dies ist bei beiden Klonen in etwa ein Zehntel der maximal bestimmten Konzentration bei 100 µE m⁻² s⁻¹.

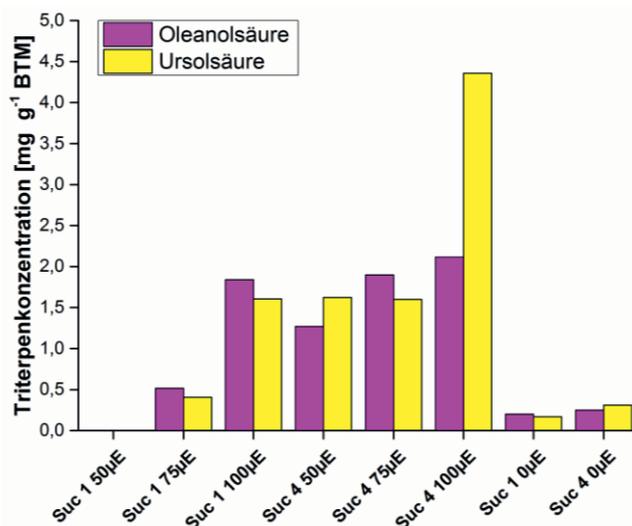


Abbildung 23: Vergleich der Triterpenkonzentration nach photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von *Salvia officinalis* im Schüttelkolben. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.



Die Konzentration der gebildeten Triterpene im Wavebagreaktor ist in Abbildung 24 zu sehen. Ohne Licht erreichen Oleanol- und Ursolsäure eine Konzentration von 0,48 bzw. 0,45 mg g⁻¹ BTM bei Suc 1 und 0,38 mg g⁻¹ bzw. 0,4 mg g⁻¹ BTM bei Suc 4. Bei einer Kultivierung mit 50 μE m⁻² s⁻¹ werden 0,1 mg g⁻¹ BTM beider Triterpene bei Suc 1 gebildet, während bei Suc 4 eine Konzentration von knapp 2 mg g⁻¹ BTM bestimmt wurde. Diese ist damit mehr als 4mal so groß wie die maximal erreichte Konzentration der Triterpene der heterotropen Kultivierung.

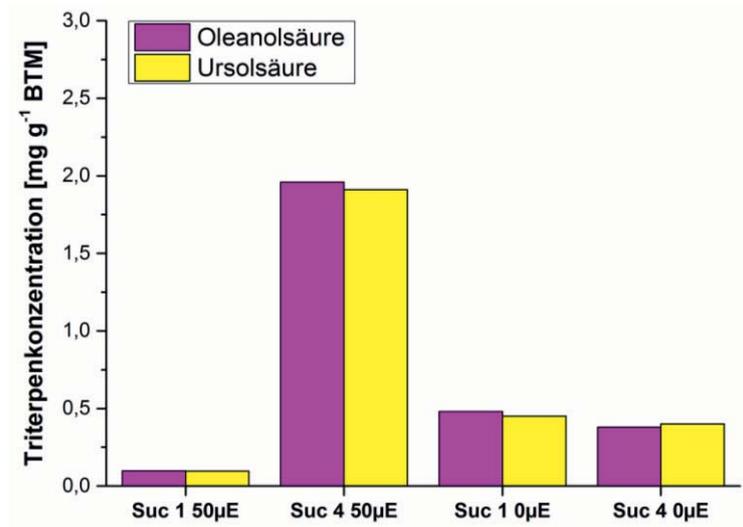


Abbildung 24: Vergleich der Triterpenkonzentration nach photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von *Salvia officinalis* im Wavebagreaktor. Die Experimente wurden bei 28 °C, einer Kippfrequenz von 20 min⁻¹, einem Winkel von 7°, einer Lichtstärke von 50 μE m⁻² s⁻¹ unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 18 Tagen, in 2 L Wavebags mit einem Füllvolumen von 1 L durchgeführt.

2.6.4 Vergleich der Produktivität

Auch die Produktivitäten wurden aus den bereits dargestellten Ergebnissen berechnet und am Beispiel der Schüttelkolben in Abbildung 25, sowie für den Wavebagreaktor in Abbildung 26 dargestellt. Für den Versuch mit Suc 1 im Schüttelkolben bei 50 μE m⁻² s⁻¹ war dies nicht möglich, da eine Bestimmung der Triterpenkonzentration durch Messfehler (siehe Abbildung 14) nicht möglich war.

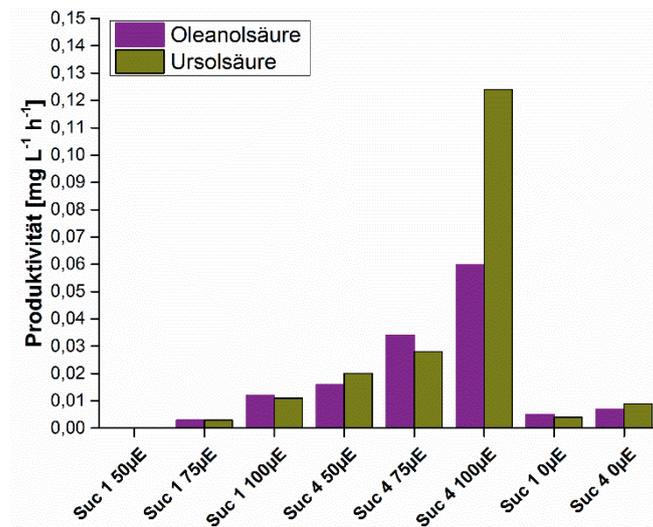


Abbildung 25: Vergleich der Produktivität der Triterpenproduktion in photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von *Salvia officinalis* im Schüttelkolben. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.

Ohne Licht werden maximal 0,007 mg L⁻¹·h⁻¹ Oleanol- und 0,009 mg L⁻¹·h⁻¹ Ursolsäure produziert. Dies ist sehr viel geringer als bei der Kultivierung mit Licht, in der Produktivitäten von bis zu 0,06 mg L⁻¹·h⁻¹ bzw. 0,124 mg L⁻¹·h⁻¹ bei 100 µE m⁻² s⁻¹ bestimmt wurden.

Im Wavebagreaktor konnten gegensätzliche Ergebnisse ermittelt werden. Hier liegt die Produktivität beider Klone bei heterotropher Kultivierung höher als bei den Versuchen mit Licht. So konnten maximal 0,025 mg L⁻¹·h⁻¹ Oleanol- und 0,026 mg L⁻¹·h⁻¹ Ursolsäure produziert werden, während das Maximum bei 50 µE m⁻² s⁻¹ lediglich bei 0,017 mg L⁻¹·h⁻¹ für beide Triterpene liegt.

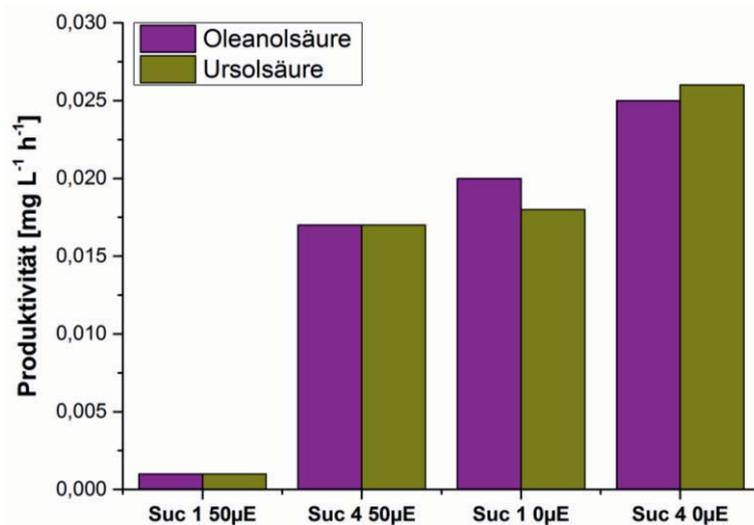


Abbildung 26: Vergleich der Produktivität der Triterpenproduktion in photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von *Salvia officinalis* im Wavebagreaktor. Die Experimente wurden bei 28 °C, einer Kippfrequenz von 20 min⁻¹, einem Winkel von 7°, einer Lichtstärke von 50 µE m⁻² s⁻¹ unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 18 Tagen, in 2 L Wavebags mit einem Füllvolumen von 1 L durchgeführt.

Es ist bereits bekannt, dass eine mixotrophe Kultivierung bei verschiedenen Algen mehr Biomasse und höhere Wachstumsraten unter den gleichen Bedingungen liefert als eine heterotrophe oder phototrophe Kultivierung (Cheirsilp&Torpee 2012). Alkhamis und Kollegen zeigten darüber hinaus am Beispiel von *Isochrysis galbana*, dass eine Lichtstärke von 100 µE m⁻² s⁻¹ optimal ist für eine mixotrophe Kultivierung und bestätigten den Vorteil einer mixotrophen Kultivierung gegenüber einer phototrophen (Alkhamis&Qin 2013). Yang und Kollegen untersuchten jeweils die Stoffwechselwege der drei Kultivierungsarten und zeigten, dass bei einer mixotrophen Kultivierung neben der Glucose im Medium noch GAP aus dem Calvin-Zyklus bei Beleuchtung der Kultursuspension für den Stoffwechsel genutzt werden kann (Yang et al. 2000). Bei einer mixotrophen Kultivierung stehen der Zelle somit zwei Wege für ihren Stoffwechsel zur Verfügung, während es bei den anderen jeweils nur ein Weg ist. Dies erklärt die verstärkte Bildung der Biomasse und höhere Wachstumsraten unter mixotrophen Bedingungen. GAP zusammen mit Acetyl-CoA sind die wichtigsten Vorstufen der Triterpensynthese, wobei darüber hinaus auch eine Synthese aus Aminosäuren möglich ist, aber im Vergleich eine untergeordnete Rolle spielt (Flores-Sanchez et al. 2002). Es wird daher erwartet, dass unter mixotrophen Bedingungen mehr Biomasse- und Triterpene gebildet werden sowie höhere Wachstumsraten auftreten als unter heterotrophen Bedingungen.

Diese Erwartungen konnten in Bezug auf die Wachstumsraten voll erfüllt werden. Die höchste Wachstumsrate von Suc 1 lag im Schüttelkolben mit 0,138 d⁻¹ erheblich über der heterotrophen Wachstumsrate von 0,001 d⁻¹. Auch die maximale Wachstumsrate von Suc 4 von 0,219 d⁻¹ ist

ca. doppelt so hoch wie die unter heterotrophen Bedingungen ermittelte mit $0,1 \text{ d}^{-1}$. Im Wavebagreaktor wurden ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Wachstumsraten gefunden. In diesem Bioreaktionssystem hat Suc 1 mit $0,342 \text{ d}^{-1}$ gegenüber von $0,001 \text{ d}^{-1}$ eine mehr als 300mal höhere Wachstumsrate als unter mixotrophen Bedingungen, während Suc 4 mit $0,322 \text{ d}^{-1}$ gegenüber von $0,31 \text{ d}^{-1}$ nur eine geringfügig höhere Wachstumsrate unter diesen Bedingungen zeigt. Bei der Biomasse zeigt sich ein geteiltes Bild. Während Suc 4 im Schüttelkolben, wie erwartet, unter mixotrophen Bedingungen die größte Zunahme an Biomasse zeigt ($13,34 \text{ g L}^{-1}$), konnte Suc 1 unter heterotrophen Bedingungen mehr als die 3fache Menge an Biomasse bilden. Im Wavebagreaktor wird durch eine heterotrophe Kultivierung eindeutig mehr Biomasse gebildet, obwohl die Wachstumsraten bei der mixotrophen Kultivierung z.T. (Suc 1) deutlich höher waren. So wurde bei der heterotrophen Kultivierung für beide Klone ca. die 3fache Menge an Biomasse gebildet, im Gegensatz zu den Versuchen unter mixotrophen Bedingungen. Die gleichen gemischten Ergebnisse lassen sich bei der Konzentration der Triterpene erkennen. Im Schüttelkolben wird mixotroph knapp die zehnfache Menge an Triterpenen und Produktivität beobachtet wie unter heterotrophen Bedingungen, während im Wavebagreaktor nur bei Suc 4 eine höhere Triterpensynthese zu finden ist. Bei der bestimmten Produktivität zeigt sich ebenso wie bei der Biomasse ein klarer Vorteil der heterotrophen Kultivierung im Wavebagreaktor.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der hier vorliegenden Daten eindeutig die Aussage treffen, dass eine mixotrophe Kultivierung einen Vorteil gegenüber der heterotrophen Kultivierung in Bezug auf die Triterpenproduktion bringt. Dieser Effekt ist jedoch abhängig von der verwendeten Lichtstärke. Bei sehr kleinen Lichtstärken ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) fällt der Effekt weniger deutlich aus als im Vergleich zu höheren Lichtstärken ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Während bei der heterotrophen Kultivierung ein Vorteil durch die Kultivierung in dem Wavebagreaktor zu erkennen ist, fällt dieser Unterschied bei gleicher Lichtstärke und gleichem Klon (Suc 4) zwischen Wavebagreaktor und Schüttelkolben sehr klein aus. So kann durch eine heterotrophe Kultivierung im Wavebagreaktor je nach verwendetem Klon eine Verbesserung der Produktivität zwischen von ca. $0,005 \text{ mg L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ auf $0,02 \text{ mg L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bei Suc 1 und von $0,008 \text{ mg L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ auf $0,025 \text{ mg L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bei Suc 4 erreicht werden. Bei mixotropher Kultivierung besteht bei gleicher Lichtstärke dagegen lediglich ein Unterschied von $0,018 \text{ mg L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ zu $0,017 \text{ mg L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Zieht man dazu natürliche Schwankungen innerhalb eines biologischen Systems und Messfehler bei der Bestimmung der Parameter in Betracht, ist davon auszugehen, dass es keinen Unterschied zwischen Wavebagreaktor und Schüttelkolben bei der mixotrophen Kultivierung gibt. Durch eine Erhöhung der Lichtstärke kann die Produktivität allerdings



deutlich gesteigert werden. So liegt das bestimmte globale Maximum für die Produktivität bei $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mit $0,06 \text{ mg L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ für Oleanolsäure und sogar $0,124 \text{ mg L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ für Ursolsäure mehr als doppelt bzw. knapp 5mal so hoch wie die höchste gemessene Produktivität bei einer heterotrophen Kultivierung der gleichen Klone. Die eingangs erwähnten Erwartungen konnten somit voll erfüllt werden, wenngleich in zukünftigen Versuchen geklärt werden muss, ob $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ tatsächlich optimal sind, da im Laufe der vorliegenden Arbeit aus technischen Gründen keine höhere Lichtstärke getestet werden konnte.

2.7 Kultivierung von *Salvia officinalis* in Pektinase-haltigen Kultursuspensionen

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass die Verwendung von Pektinase in der Suspensionskultur sowohl die Zellagglomerat-Bildung verringert als auch die Produktion von Sekundärmetaboliten fördert (Chattopadhyay et al. 2001, Flores-Sanchez et al. 2002). Es wurde daher getestet, inwiefern sich verschiedene Konzentrationen von Pektinase während einer photo-mixotrophen und einer heterotrophen Kultivierung auf die Biomasse, die Konzentration der Triterpene und die Produktivität auswirken.

Alle Versuche wurden mit Suc 4 und einer Lichtstärke von 75 bzw. $0 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ im Schüttelkolben durchgeführt. Ansonsten entsprechen die Parameter denen von Tabelle 1.

2.7.1 Vergleich der erhaltenen Biomasse

Die gebildeten Biomassen sind in Abbildung 27 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei einer Kultivierung mit Licht signifikant mehr Biomasse gebildet wird als bei einer Kultivierung ohne Licht. Die maximal erreichte Biomasse liegt hier bei einer Konzentration von $13,8 \text{ g L}^{-1}$ bei Verwendung von 0,01 % Pektinase. Ohne Pektinase bzw. mit 0,005 % werden 7,6 bzw. $6,7 \text{ g L}^{-1}$ Biomasse gebildet. Dies entspricht in etwa der Hälfte des maximalen Wertes. Bei einer Kultivierung ohne Licht werden maximal $1,24 \text{ g L}^{-1}$ Biomasse bei einem Gehalt von 0,05 % Pektinase gebildet. Minimal werden $0,75 \text{ g L}^{-1}$ gebildet bei einem Zehntel der Konzentration. Insgesamt kann durch die Verwendung von Licht mehr als 10mal so viel Biomasse gebildet werden.

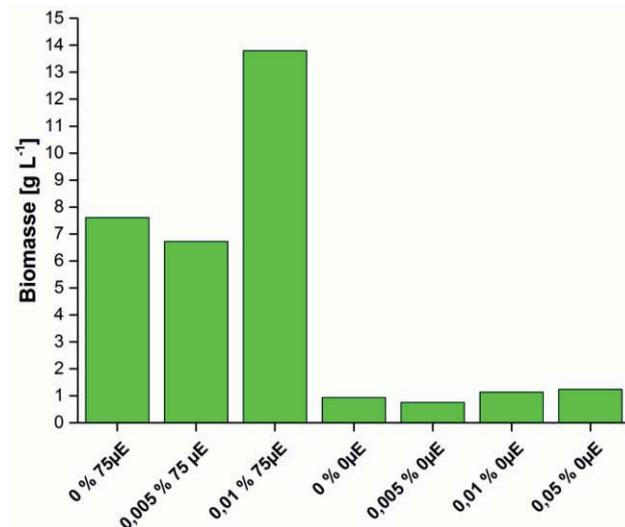


Abbildung 27: Vergleich der gebildeten Biomasse von *Salvia officinalis* mit und ohne Beleuchtung während der Kultivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen von Pektinase in der Kultursuspension. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.

2.7.2 Vergleich der erhaltenen Triterpene

Die Konzentrationen der Triterpene Oleanol- und Ursolsäure nach photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung bei verschiedenen Gehalten von Pektinase in der Zellsuspension sind in Abbildung 28 dargestellt.

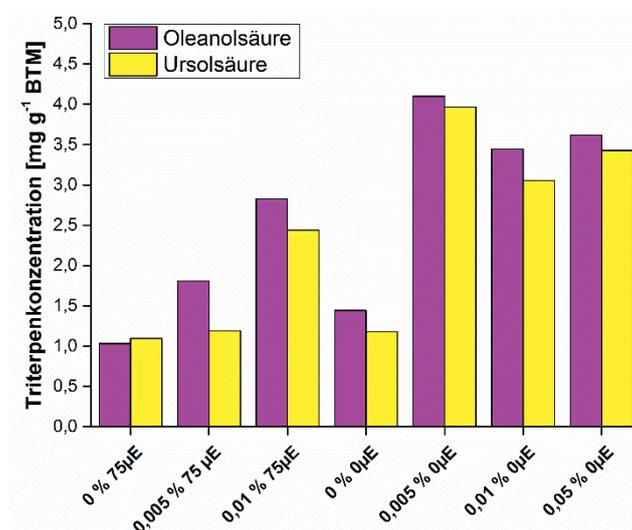


Abbildung 28: Vergleich der Triterpenkonzentration von *Salvia officinalis* mit und ohne Beleuchtung während der Kultivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen von Pektinase in der Kultursuspension. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.

Mit Licht werden bei 0,01 % Pektinase maximal 2,8 und 2,4 mg g⁻¹ BTM Oleanol- bzw. Ursolsäure gebildet. Die geringste Konzentration wurde ohne die Zugabe von Pektinase gemessen und liegt bei 1 mg g⁻¹ BTM beider Triterpene. Erfolgt die Fermentation ohne Licht



werden maximal 4,1 mg g⁻¹ BTM Oleanol- und 3,9 mg g⁻¹ BTM Ursolsäure gebildet. Die minimale Konzentration wurde auch hier in den Versuchen ohne Pektinase gemessen und liegt bei 1,4 bzw. 1,1 mg g⁻¹ BTM für Oleanol- und Ursolsäure. Insgesamt konnte durch die Zugabe von Pektinase die Konzentration der Triterpene in beiden Kultivierungsstrategien um ca. das Dreifache gesteigert werden.

2.7.3 Vergleich der Produktivität

Die Produktivität der einzelnen Versuche ist in Abbildung 29 dargestellt. Die absolut höchste Produktivität wurde in dem Versuch mit einem Gehalt von 0,01 % Pektinase und der Verwendung von Licht bestimmt. Sie liegt mit 0,068 mg L⁻¹·h⁻¹ für Oleanolsäure und 0,058 mg L⁻¹·h⁻¹ für Ursolsäure knapp 6mal so hoch wie die höchste Produktivität ohne Licht bei 0,012 mg L⁻¹·h⁻¹ (beide Triterpene) und einem Gehalt von 0,05 % Pektinase. Die geringste Produktivität wurde bei dem Versuch ohne Licht und Pektinase erreicht und liegt bei 0,004 mg L⁻¹·h⁻¹ für Oleanolsäure und 0,003 mg L⁻¹·h⁻¹ für Ursolsäure. Die Produktivitäten der Versuche mit Licht sind insgesamt alle etwas höher als die ohne Licht, auch wenn hier die Unterschiede nicht so groß sind wie in dem Versuch mit 0,01 % Pektinase und Licht.

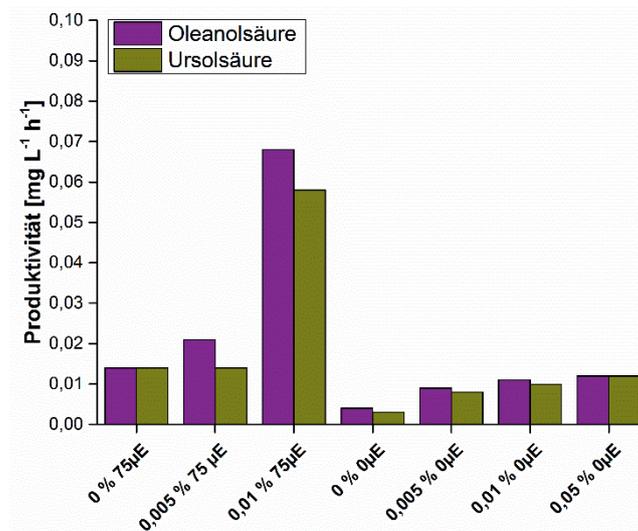


Abbildung 29: Vergleich der Produktivität der Triterpenproduktion von *Salvia officinalis* mit und ohne Beleuchtung während der Kultivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen von Pektinase in der Kultursuspension. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.

Wie bereits eingangs erwähnt, kann Pektinase in geringen Konzentrationen das Wachstum von Suspensionskulturen fördern, indem Zellagglomerate aufgelöst werden und so die Oberfläche der Zellen zur Nährstoffaufnahme vergrößert wird (Evans et al. 2003). Flores-Sanchez und Kollegen zeigten, dass Pektinase darüber hinaus als Elicitor für die Bildung von Triterpenen (Oleanol- und Ursolsäure) in *Uncaria tomentosa* dienen kann (Flores-Sanchez et al. 2002). Es

wurde daher erwartet, durch den Einsatz von Pektinase in der Suspensionskultur von *Salvia officinalis* sowohl die Biomassebildung als auch die Konzentration der Triterpene und somit die Produktivität weiter steigern zu können. Dies wurde anhand des Klones Suc 4, der sich in vorherigen Experimenten als bester Klon zur Produktion von Triterpenen herausgestellt hat, bei verschiedenen Gehalten von Pektinase sowohl in mixotropher als auch in heterotropher Suspensionskultur getestet. Wie erwartet, konnten durch den Einsatz von Pektinase sowohl die Biomasse (bei gleicher Lichtstärke) als auch die Konzentration der Triterpene und die Produktivität gesteigert werden. Dieser Effekt war bei einer mixotrophen Kultivierung deutlich stärker als bei der heterotrophen Kultivierung, bei der die Zunahme der Biomasse sehr gering war. Bei einer heterotrophen Kultivierung von Suc 4 ohne Pektinase wurden $0,9 \text{ g L}^{-1}$ Biomasse gebildet und maximal (bei 0,05 % Pektinase) $1,24 \text{ g L}^{-1}$. Dies entspricht einer Zunahme von 37 %. Bei den Triterpenen konnte eine Zunahme der Konzentration von durchschnittlich 155 % durch die Zugabe von Pektinase und bei der Produktivität eine Zunahme von durchschnittlich 150 % bestimmt werden. Bei der mixotrophen Kultivierung wurde eine Zunahme der Biomasse von 81 %, der Triterpenkonzentration von durchschnittlich 170 % und der Produktivität von 350 % bestimmt. Damit ist die mixotrophe Kultivierung zur Herstellung von Oleanol- und Ursolsäure bei $75 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und einem Gehalt von 0,01 % Pektinase 425 % effizienter als unter gleichen Bedingungen bei einer heterotrophen Kultivierung. Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass durch die Vergrößerung der Oberfläche für die Nährstoffaufnahme aus dem Medium auch die Oberfläche für eine Beleuchtung stark vergrößert wird. Somit kann die zusätzliche Energiequelle effizienter genutzt und die generellen Erwartungen an die mixotrophe Zellkultur aus Kapitel 2.5 bestätigt werden. Zukünftig sollten daher Versuche mit einer Lichtstärke von $\geq 100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und einer Pektinase Konzentration von 0,1 % durchgeführt werden, um die Produktion der Triterpene konsequent weiter zu optimieren.

2.8 Zusammenfassung

Bei einer rein mixotrophen Kultivierung konnte gezeigt werden, dass in allen drei verwendeten Kultivierungssystemen Suc 4 besser geeignet ist, um Triterpene (*in vitro*) zu produzieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass mit steigender Lichtstärke die Wachstumsraten, die gebildete Biomasse, die Konzentration der Triterpene und die Produktivität zunimmt. Eine Ausnahme bildet hier nur die Kultivierung auf Agarplatten, bei der die gebildete Biomasse im Fall von Suc 4 mit steigender Lichtstärke rückläufig war. Eine Kultivierung im Wavebagreaktor bringt durch die individuellen Reaktoreigenschaften lediglich Vorteile bei einer rein heterotrophen Kultivierung, so dass bei einem direkten Vergleich bei gleicher Lichtstärke zum Schüttelkolben keine Verbesserung für die Produktion der Triterpene erreicht werden kann.



Zieht man die hohen Kosten für den Betrieb des Wavebagreaktors mit in Betracht, stellt dieser für den aktuell betrachteten Fall keine Alternative zu einer Produktion im Schüttelkolben dar. Eine testweise Kultivierung von *Salvia officinalis* als Kallus-Kultur auf Agarplatten sollte aufgrund der relativ hohen Wachstumsraten zukünftig genauer untersucht werden, stellt aber aufgrund der aktuell fehlenden Möglichkeit für ein Scale-up ebenfalls keine Alternative zu einer submersen Kultur dar.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse mit einer heterotrophen Kultivierung der gleichen Klone von *Salvia officinalis* zeigte sich großes Verbesserungspotential durch eine vorhandene Beleuchtung. So konnte durch eine mixotrophe Kultivierung im Schüttelkolben sowohl die Synthese der Triterpene als auch die Produktivität des Prozesses im direkten Vergleich in etwa verzehnfacht werden. Durch die Verwendung eines Wavebagreaktors kann zwar, wie bereits erwähnt, die heterotrophe Kultivierung verbessert werden, kommt aber dennoch nicht an die erreichten Ergebnisse der mixotrophen Kultivierung heran.

Abschließend wurde die Wirkung von Pektinase als Elicitor für die Triterpenproduktion untersucht. Dies wurde anhand von verschiedenen Gehalten von Pektinase sowohl heterotroph als auch mixotroph am Beispiel von Suc 4 durchgeführt. Dadurch konnte sowohl die Bildung der Biomasse, die Konzentration der Triterpene als auch die Produktivität beider Kultivierungsarten gesteigert werden. Dieser Effekt war bei der mixotrophen Kultivierung jedoch deutlicher ausgeprägt, wo eine Zunahme der Biomasse von 81 %, der Triterpenkonzentration von 170 % und der Produktivität von 350 % bei einem Gehalt von 0,1 % Pektinase erreicht wurde. Die bereits beschriebenen maximalen Produktivitäten der mixotrophen Kultivierung von Suc 4 bei $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurden durch die Nutzung von Pektinase nicht erreicht, allerdings waren sie bei gleicher Lichtstärke ($75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ziemlich genau doppelt so hoch. Es ist somit davon auszugehen, dass es auch bei einer Lichtstärke von $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zu einer weiteren Verbesserung kommen würde. Die höchste Produktivität der Triterpenproduktion von Oleanol- und Ursolsäure wurde demnach in der vorliegenden Arbeit bei einer mixotrophen Kultivierung von Suc 4 bei $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Schüttelkolben bestimmt.

Maximal konnten bei *Salvia officinalis* Suc 4 2,1 mg g^{-1} BTM Oleanolsäure und 4,3 mg g^{-1} BTM Ursolsäure bei einer Lichtstärke von $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produziert werden, was einer Produktivität von 0,06 bzw. 0,12 mg $\text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ entspricht. Als Vergleich einer mixotrophen Suspensionskultur zur Herstellung von Triterpenen kann aktuell nur die Arbeit von Bolta und Kollegen genutzt werden, die knapp $400 \mu\text{g g}^{-1}$ BTM Ursolsäure mit dem *Salvia officinalis* Wildtyp herstellen konnten (Bolta et al. 2000). Dies entspricht einem Zehntel der Konzentration

von Ursolsäure der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse. Bezogen auf eine Kulturdauer von 14 Tagen ergibt sich eine Produktivität von $0,04 \text{ mg L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, was einem Drittel der hier erreichten Produktivität entspricht. Haas et al. Zeigten in einer aktuellen Veröffentlichung, dass die volumetrische Ausbeute von Oleanol- und Ursolsäure ebenfalls mit dem Wildtyp von *Salvia officinalis* durch Optimierung der Medienzusammensetzung gesteigert werden kann (Haas et al. 2014). So konnte durch eine Optimierung der Phytohormonkonzentration (Auxin und Cytokinin) gezielt Einfluss auf den Gehalt der Triterpene genommen werden und maximal $40,1 \text{ mg L}^{-1}$ Oleanolsäure sowie 25 mg L^{-1} Ursolsäure gebildet werden. Dies entspricht einer Zunahme von ca. 30 % Oleanolsäure im Vergleich zu dem hier beschriebenen Maximum von Suc 4, aber weniger als der Hälfte des Maximums von Ursolsäure. Dies bestätigt die Aussagen aus Kapitel 2.3.3.2 über das hohe Potential der Medienoptimierung. Zukünftig sollten daher mixotrophe Kultivierungen zusammen mit einer Medienoptimierung (Pektinase als Elicitor, Gehalt an Phytohormonen) untersucht und durchgeführt werden, um diesen Prozess konsequent weiter zu entwickeln.



3. Fermentation von Cyanobakterien zur Gewinnung von biotechnologischen Wertstoffen

Das nachfolgende Kapitel beschreibt die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten zur Produktion von biotechnologischen Wertstoffen mit terrestrischen Cyanobakterien.

3.1 Einleitung und Zielsetzung

Cyanobakterien werden aktuell hauptsächlich als Nahrungsergänzungsmittel oder Futter für Tiere und Fische verwendet (Macias-Sancho et al. 2014). Dafür ist es erforderlich, möglichst viel Biomasse so effizient es geht im Hinblick auf Zeit und Kosten, zu produzieren. Deswegen stehen gerade aquatische Stämme von Cyanobakterien im Fokus der industriellen Anwendung (Chakdar et al. 2012), da sie diese Vorgaben erfüllen. Terrestrische Cyanobakterien wurden auf der anderen Seite bislang kaum untersucht, da sie bei einer als Standard geltenden submersen Kultivierung wachstumslimitiert sind (Kumar et al. 2010, Malcata 2011). Unter natürlichen Bedingungen sind sie häufig an extremen Standorten zu finden, die durch eine Knappheit von essentiellen Nährstoffen charakterisiert sind. Beispielsweise bilden sie Bodenkrusten im Wüstensand und können dort großer Hitze und Trockenheit widerstehen (Dor&Danin 1996). Dies gelingt durch eine verstärkte Bildung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), die Wasser speichern und somit Schutz bieten (Crowe&Crowe 1992, Hill et al. 1997). Diese Substanzen können biologisch aktive Verbindungen sowie pharmazeutische Wirkstoffe enthalten (Burja et al. 2001, Singh et al. 2005). Aus diesem Grunde bieten terrestrische Cyanobakterien ein bislang ungenutztes, großes Potential als neue Quelle von biotechnologischen Wertstoffen.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist daher ein ganzheitlicher Ansatz zur Nutzbarmachung von terrestrischen Cyanobakterien als alternative Produktionsplattform. Dieser Ansatz reicht von einem initialen Screening geeigneter Stämme, über die Untersuchung und Optimierung der wichtigsten Wachstumsfaktoren, bis zu der Entwicklung eines völlig neuartigen emersen Photobioreaktors (ePBR), der speziell auf die Bedürfnisse von terrestrischen Cyanobakterien zugeschnitten ist. Der neue Photobioreaktor soll verfahrenstechnisch charakterisiert werden und die gezielte Produktion des Wertstoffes EPS ermöglichen. Abgerundet wird die Arbeit durch die Ableitung von zwei mathematischen Modellen, mit denen es möglich ist, den Einfluss der untersuchten Wachstumsfaktoren auf das Wachstum der Cyanobakterien zu beschreiben. Abschließend werden die submersen und die emersen Kultivierungen hinsichtlich der



Produktion von drei typischen biotechnologischen Wertstoffen aus Cyanobakterien verglichen und in andere veröffentlichte Arbeiten eingeordnet.

3.2 Stand der Technik

Nachfolgend beschrieben ist der aktuelle Stand der Technik von Photobioreaktoren und der Kultivierung von Cyanobakterien. Bei den Photobioreaktoren wird dabei auf die Typen fokussiert, deren Design am häufigsten verwendet wird.

3.2.1 Photobioreaktoren

Photobioreaktoren werden zur Kultivierung von phototrophen Organismen verwendet, die Licht als primäre Energiequelle für das Wachstum und zellinterne Reaktionen nutzen. Alle Photobioreaktoren besitzen daher eine Lichtquelle, welche sowohl das Sonnenlicht als auch eine künstliche Lichtquelle sein kann. Hier muss ein Kompromiss aus möglichst hoher Zelldichte, Durchmischung und Stärke der Beleuchtung gefunden werden, da es ansonsten entweder zu einer Unterversorgung mit Licht oder zu einer Photoinhibition kommen kann. Da phototrophe Organismen neben anorganischen Nährstoffen vor allem Kohlenstoffdioxid als C-Quelle für die Photosynthese benötigen, wird eine optimale Versorgung mit CO_2 bei gleichzeitiger Entfernung von O_2 aus dem System angestrebt. Daher ist, anders als bei Bioreaktoren zur heterotrophen Kultivierung, die Berechnung des Stoffübergangskoeffizienten von CO_2 und nicht von O_2 zur Charakterisierung sinnvoll (Chmiel 2006). Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Klassen von Systemen zur Kultivierung von phototrophen Organismen, die als „offen“ oder „geschlossen“ bezeichnet werden, je nachdem, ob direkte Wechselwirkungen mit der Umwelt möglich sind oder nicht. Zu den offenen Systemen gehören vor allem die Open- und Raceway Ponds, wobei sich die geschlossenen Systeme hauptsächlich in zwei Kategorien untergliedern: denen von außen beleuchteten Photobioreaktoren und denen von innen beleuchteten Photobioreaktoren. Zu der ersten Gruppe gehören z.B. Rührkessel aus Glas, der Rohr-Bioreaktor, der Platten-Photobioreaktor und der Folien-Photobioreaktor (Pulz 2001). Zu der zweiten Gruppe zählen z.B. Rührkessel, Zentrifugalreaktor sowie seitabstrahlende Stäbe und Lichtwellenleiter. Welches der Systeme zur Kultivierung verwendet wird, ist maßgeblich von den individuellen Ansprüchen des angestrebten Produktionsorganismus und des Zielproduktes abhängig. Der ausgewählte Reaktortyp muss zunächst ausreichend Licht für die Zellen bereitstellen, um hohe Wachstumsraten zu erreichen. Zum anderen muss auf eine optimale Zelldichte (Biomassekonzentration) geachtet werden, um hohe Produktivitäten zu erzielen und die Versorgung mit Licht an der Oberfläche des Reaktors zu gewährleisten. Die gängigsten Photobioreaktorsysteme werden nachfolgend vorgestellt.

3.2.1.1 Open Ponds

Die einfachsten Formen zur Algenkultivierung sind die sogenannten Open Ponds (Abbildung 30). Open Ponds sind große Becken oder Teiche, in denen die Kultursuspension direkt von dem Sonnenlicht bestrahlt wird (Borowitzka&Borowitzka 1988). Ab einer gewissen Zelldichte kann jedoch nicht mehr genug Licht in die unteren Schichten der Kultur eindringen, da bereits ein Großteil an der Oberfläche absorbiert wird. Dies resultiert in relativ flachen Becken von ca. 15-30 cm Tiefe. Damit dennoch wirtschaftliche Mengen von Organismen kultiviert werden können, erreicht die erforderliche Oberfläche solcher Becken schnell mehrere 10^4 m^2 . Darüber hinaus werden die Teiche weder durchmisch, noch erfolgt eine gezielte Zuführung von CO_2 . Somit können Organismen sedimentieren, und es treten große Gradienten in der CO_2 -Versorgung auf. Eine Temperierung im optimalen Bereich ist ebenfalls nicht möglich. Der geringen Produktivität dieses Reaktortyps stehen die ebenfalls geringen Investitionskosten gegenüber, welche sich zum Großteil aus lokalen Bodenpreisen zusammensetzen (Gerbsch 1997). Da durch die großen, offenen Flächen ein hohes Kontaminationsrisiko besteht und die Kultivierung wetterabhängig ist, wurden viele verschiedene geschlossene Systeme zur submersen Kultivierung von phototrophen Organismen entwickelt (Pulz 2001).



Abbildung 30: Foto von Open Ponds zur Produktion von *Spirulina platensis* in Asien (Sieg 2011).

3.2.1.2 Raceway Ponds

Raceway Ponds stellen eine Weiterentwicklung der Open Ponds hinsichtlich der Durchmischung dar. Diese Reaktorsysteme sind häufig schlaufenförmig aufgebaut und das Medium wird aktiv durch diese Schleifen gefördert (Abbildung 31). In der Regel bestehen diese Becken aus Stein oder Beton und werden durch diverse Dichtmaterialien abgedichtet (Huang&Lin 1981). Eine aktive Durchmischung wird z.B. durch Schaufelräder, Airlift-Systeme oder Pumpen erreicht. Eine aktive Temperierung findet auch in diesem System nicht



statt, allerdings wird CO_2 gezielt über eine Begasung eingebracht. Durch die geringe Verweilzeit im Medium aufgrund der Beckentiefe von 15-30 cm ist die Versorgung mit CO_2 trotzdem ungenügend. Auch eine pH-Regulierung über das eingebrachte CO_2 ist nur in engen Grenzen möglich (Gerbsch 1997). Insgesamt ist in diesem Reaktortyp das Problem der Durchmischung und CO_2 -Versorgung verringert im Vergleich zu den Open Ponds; optimale Ergebnisse hinsichtlich dieser Parameter können trotzdem nicht erzielt werden. Flächenbezogene Produktivitäten liegen hier bei ca. $12 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ und erreichbare Biomassekonzentrationen bei $0,3\text{-}0,5 \text{ g L}^{-1}$ (Weissman et al. 1988, Bosca et al. 1991).

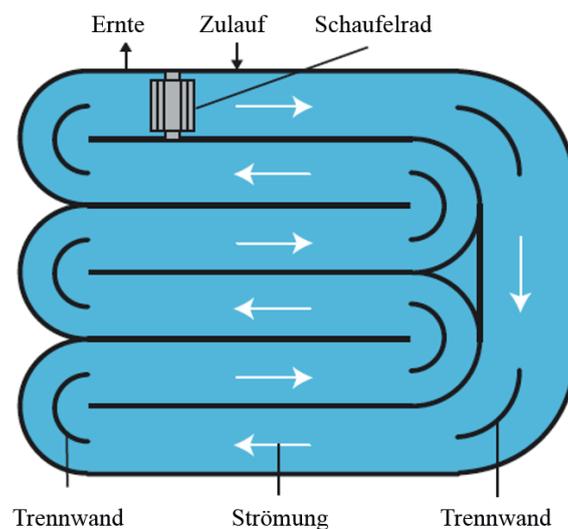


Abbildung 31: Schema eines Raceway ponds modifiziert nach (CCRES 2015)

3.2.1.3 Rohrreaktoren

Der Rohrreaktor besteht üblicherweise aus horizontal oder vertikal ausgerichteten Glas- oder Kunststoffrohren und wird über eine zentrale Einheit gesteuert. Aufgrund eines geringen Kontaminationsrisikos und einer hohen Produktausbeute wird dieser Reaktortyp bereits weltweit verwendet. Im Vergleich zu den Open Ponds sind allerdings die Anschaffungs- und Betriebskosten hoch (Pulz 2001). Mitte der 90er Jahre wurde für die optimale Versorgung der Algen mit Licht ein geschlossenes Glasröhrensystem entwickelt (Abbildung 32). 1999 wurde diese Anlage, bestehend aus einem 500 km langen Rohrsystem, in Klötze (Deutschland) gebaut. Die Organismen werden durch die Glasröhren gepumpt, wodurch eine turbulente Strömung erzeugt wird und eine gute Durchmischung gewährleistet ist. Die Beleuchtung kann entweder künstlich oder durch Sonnenlicht erfolgen. Am Ende des Systems durchläuft die Suspension eine Anlage zur Aufbereitung des Mediums, Ernte von Biomasse und Messung von Betriebsparametern, bevor sie anschließend wieder in die Glasrohre zurückgeführt wird. Im Vergleich zu den Open Ponds können die Faktoren für das Wachstum der Organismen über

mess- und regeltechnische Einheiten gezielt gesteuert werden. Wasserverdunstung und Kontaminationen werden durch das geschlossene System verhindert. Eine solche Anlage wird beispielsweise durch die Firma Roquette zur Produktion von Chlorella-Pulver betrieben (Broneske et al. 2002, Broneske et al. 2005).

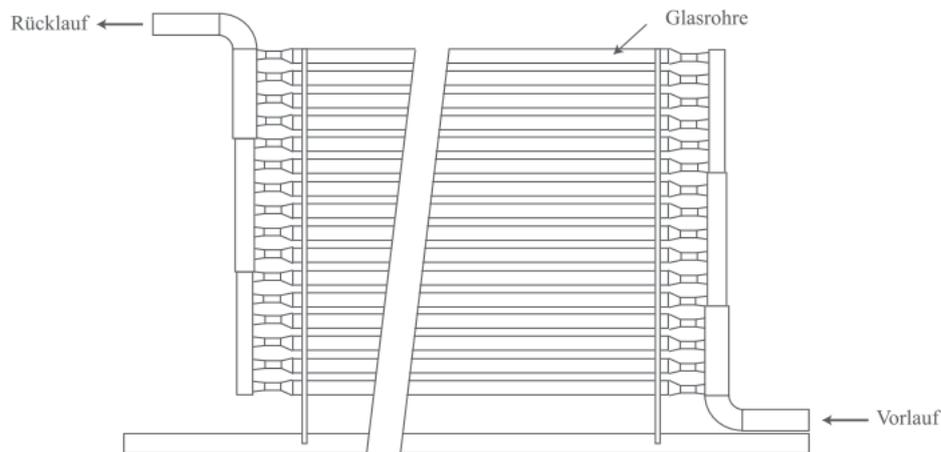


Abbildung 32: Schematischer Aufbau eines Glasrohrmoduls mit Vor- und Rücklauf modifiziert nach (Broneske et al. 2002)).

3.2.1.4 Platten-Photobioreaktoren

Ein Platten-Photobioreaktor besteht üblicherweise aus Kunststoff- oder Glasplatten, deren Zwischenraum so optimiert wird, dass eine optimale Lichtversorgung der Organismen gewährleistet ist. Als Lichtquelle können entweder das Sonnenlicht oder eine künstliche Lichtquelle verwendet werden (Pulz 2001).

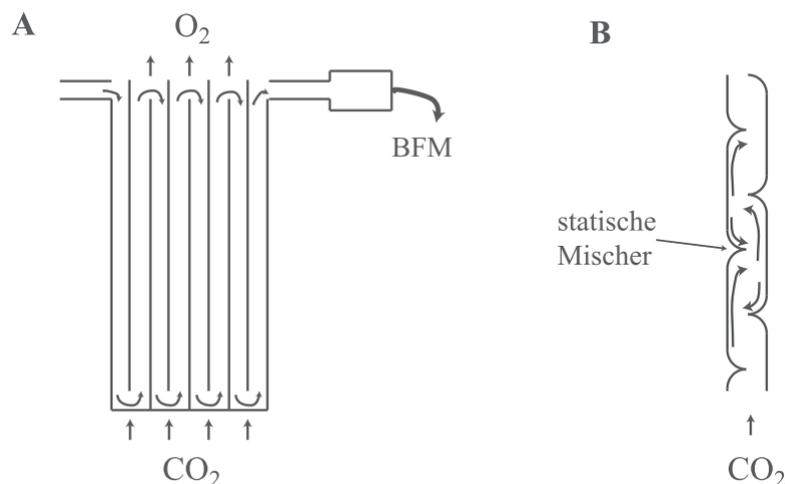


Abbildung 33: Schematischer Aufbau des Hanging-Gardens-Reaktorsystems und des FPAREaktors. A = Reaktortyp Hanging-Gardens B = Funktionsprinzip des FPA-Reaktors modifiziert nach (Eriksen&Umana 2004, Brucker et al. 2005, Trösch 2005).

Ein Beispiel sind die von der Firma ecoduna entwickelten Hanging Gardens, welche für kontinuierliche Fermentationsverfahren verwendet werden. Der Photobioreaktor besteht aus



miteinander kommunizierenden Röhren, wobei der Suspensionsfluss mit Hilfe des Mammutpumpeneffektes des einströmenden Gases unterstützt wird (Abbildung 33 A). Da das Verhältnis von Volumen zu Grundfläche hoch ist und das System nach der Sonne ausgerichtet werden kann, ist eine künstliche Beleuchtung nicht notwendig (Eriksen&Umana 2004). Am Fraunhofer IGB in Stuttgart wurde der Flachplatten-Airlift-Reaktor (FPA-Reaktor) entwickelt, welcher sich durch eine geringe Schichtdicke und gezielte Strömungsführung über statische Mischer auszeichnet. Die Licht- und Substratversorgung konnte so verbessert werden (Abbildung 33 B). Durch gezieltes Ausnutzen des auftretenden „Flashing-Light-Effektes“ werden die Zellen optimal mit Licht versorgt. Der Effekt beschreibt die Tatsache, dass die Aufnahme von Lichtquanten pro Zeiteinheit (die zur CO₂-Fixierung genutzt werden kann) begrenzt ist und durch die Bestrahlung der Zellen mit hohen Lichtintensitäten in einem kurzen Zeitintervall optimiert werden kann (Laws et al. 1983). Auf Grund des Airliftbetriebes ist der Energieeintrag mit 70 W m⁻³ niedrig (Brucker et al. 2005, Trösch 2005). Sowohl die Infektionsgefahr als auch der benötigte Energieeintrag ist bei beiden Platten-Bioreaktoren im Vergleich zu den Open Ponds geringer, die volumetrische Produktivität und die Zelldichte jedoch höher.

3.2.1.5 Folienreaktor

Unter Folien-Photobioreaktoren versteht man eine Vielzahl von unterschiedlichen Einwegreaktoren. Trotz des höheren Investitionsbedarfs für die verschiedenen Halterungssysteme ist diese Form der Algenkultivierung im Vergleich zu den anderen Systemen kostengünstig (Barbaroux&Sette 2006).

Ein RWE-Algenprojekt in Bergheim-Niederaussem (Deutschland) nutzt bereits Folien-Reaktoren zur Produktion von Mikroalgen unter gleichzeitiger CO₂-Bindung aus Kraftwerksrauchgasen. Hierbei wird Rauchgas aus einem Kraftwerkblock zunächst in einen Blasenreaktor zur Mischung mit der Algensuspension geleitet, um dann als CO₂ gesättigte Algensuspension in einen der Photobioreaktoren (NOVAgreen Projektmanagement, Vechta-Langförden, Deutschland) geleitet zu werden, die in einem Gewächshaus positioniert sind (Abbildung 34). Der Photobioreaktor besteht aus hängenden transparenten Kunststoffschläuchen, die in V-Form an Trägern befestigt sind. Zur Durchmischung des Systems wird Luft in den Reaktor geleitet, und die Biomassekonzentration wird über die optische Dichte bestimmt. Ist eine definierte Konzentration erreicht, wird die Biomasse geerntet und nicht in den Blasenbioreaktor zurückgeleitet (Cordes 2013).

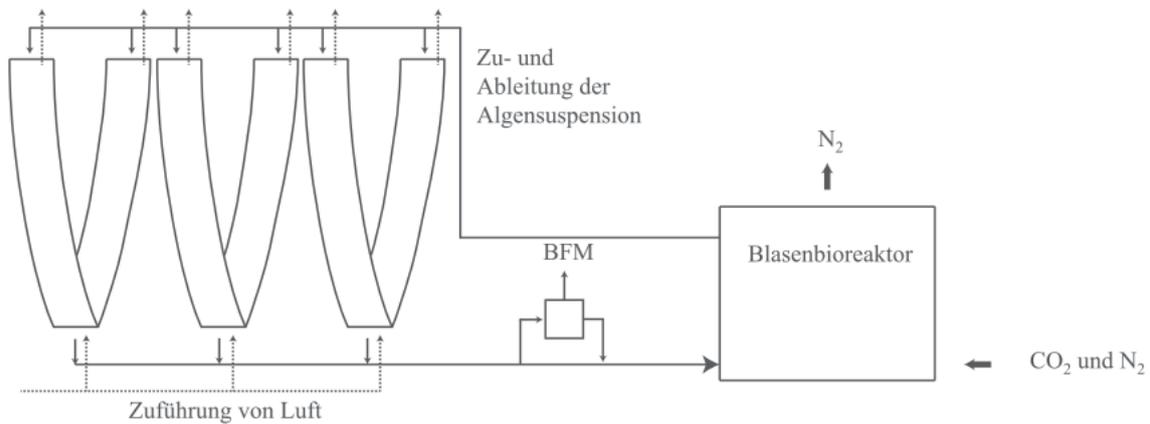


Abbildung 34: Schematischer Aufbau der Folien-Reaktoren zur Produktion von Mikroalgen unter Nutzung von Kraftwerksrauchgasen zur CO_2 -Bindung (modifiziert nach (Cordes 2013)).

3.2.1.6 Rührkessel aus Glas

Zu dieser Art von Reaktoren zählen vor allem Fermenter kleinen Maßstabes aus Glas, die auch im normalen Laborgebrauch zu finden sind. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie gut zu sterilisieren und kommerziell verfügbar sind. Die Lichtquelle kann außen um den Reaktor angebracht werden, wobei üblicherweise Leuchtstoffröhren verwendet werden. Negativ zu bewerten ist hier die ungünstige Geometrie des Reaktors selbst für eine Lichtversorgung von außen. Um das Oberflächen- zu Volumenverhältnis konsequent zu verbessern, gelangt man zu dem Design des Rohrreaktors. Demgegenüber sind neben der Sterilisierbarkeit, die Temperierung, der Gaseintrag und die Durchmischung ohne Probleme möglich (Gerbsch 1997).

3.2.1.7 Blasensäulen

Zu diesem Reaktortyp zählen alle Arten von zylindrischen Gefäßen aus Glas, die auf Basis einer normalen Blasensäule konzipiert sind. Eine Versorgung mit CO_2 sowie die Durchmischung werden durch eine Begasung von unten gewährleistet. Die Gefäße können von außen sowohl durch Sonnenlicht, als auch durch künstliche Lichtquellen beleuchtet werden. Auch bei dieser Art von Reaktoren führt die konsequente Optimierung des Oberflächen- zu Volumenverhältnis in einen Bereich, der bereits als Rohrreaktor angesehen werden kann (Radmer et al. 1987, Laing&Jones 1988, Lee&Low 1993, Gerbsch 1997).

3.2.1.8 Rührkessel

Hierbei handelt es sich um kommerziell erhältliche Rührreaktorsysteme, in die, durch z.B. Bohrungen im Deckel, eine Lichtquelle direkt in die Suspension eingebracht wird. Dadurch können Strahlungsverluste, die bei einer Beleuchtung von außen erfolgen, vermieden werden. Problematisch bei dieser Art der Kultivierung ist der Aufwuchs von Organismen direkt auf der



Lichtquelle sowie die punktuell sehr starke Strahlenbelastung. Durch eine erhöhte Erzeugung von Turbulenzen kann der Aufwuchs reduziert- und die Zeit der Strahlenbelastung verringert werden. Die daraus resultierenden Scherkräfte werden allerdings nicht von allen Organismen gleich gut toleriert. Durch die Verwendung von Edelstahlkesseln sind die Sterilisierbarkeit sowie der Scale-up meistens unproblematisch. Eingeschränkt wird letzteres nur durch die Beleuchtung, da der technische Aufwand, große Anlagen auszuleuchten, erheblich ist. Davon abgesehen, finden sich die anderen Vorteile des Rührkessels aus Glas in diesem System wieder. Es wurden Zelldichten zwischen $0,5\text{-}2\text{ g L}^{-1}$ erreicht (Borowitzka&Borowitzka 1988, Ogbonna et al. 1996, Pegallapati et al. 2012).

3.2.1.9 Zentrifugalreaktor

Dieser Photobioreaktor erzeugt durch Zentrifugalkraft einen dünnen Flüssigkeitsfilm aus Kultursuspension in einem Behälter, der in einem Edelstahlkessel zur Rotation gebracht wird. In der Mitte dieses Behälters befindet sich ein Quarzrohr, in das beliebige Lichtquellen eingebracht werden können. Durch die geringen Schichtdicken sowie die effiziente Beleuchtung wurden mit *Chlorella vulgaris* Zelldichten von $11,5\text{ g L}^{-1}$ erreicht. Der Nachteil dieses Systems liegt in dem geringen maximalen Volumen von 25 L (Tsoglin et al. 1996).

3.2.1.10 Fazit

Zu fast jedem der vorgestellten Reaktorsysteme gibt es eine oder mehrere publizierte Abwandlungen mit individuellen Änderungen oder Ergänzungen des jeweiligen zugrundeliegenden Systems. Sowohl im Bereich der Blasensäulen-Photobioreaktoren (Degen et al. 2001, Kaidi et al. 2012, Bahadur et al. 2013, Mohsenpour&Willoughby 2013) als auch der Platten-Photobioreaktoren (Zittelli et al. 2000, Hsieh&Wu 2009, Tamburic et al. 2011, Ozkan et al. 2012, Choi et al. 2013) wurden in den letzten Jahren viele neue Konzepte vorgestellt. Auch bei Rührkesselreaktoren wurden neue Designs publiziert, die neue Wege beschreiben, die Kultursuspension effizienter zu beleuchten (Csogor et al. 2001, Xue et al. 2013). Darüber hinaus wurde ein System entwickelt um Photobioreaktoren dynamisch mittels suspendierbarer Wireless Light Emitttern (WLE) zu beleuchten. Somit kann der geringen Lichteindringtiefe von externen Lichtquellen entgegen gewirkt und das Licht homogener im Reaktorraum verteilt werden. Die drahtlose Energieübertragung erfolgt bei diesem System durch eine resonante induktive Nahfeldkopplung (Heining et al. 2015). Allen Publikationen gemein ist dabei die Steigerung der Effizienz hinsichtlich der Beleuchtung sowie der Durchmischung. Welches Reaktorsystem insgesamt optimal für eine hohe Zelldichte und Produktivität ist, wird durch die individuellen Ansprüche des Organismus und das Zielprodukt

bestimmt. Offene Systeme bieten geringe Kosten, geschlossene Systeme bieten für ihre hohen Kosten auf der anderen Seite Sterilität und gute Kontrolle von Parametern wie pH, Temperatur und CO₂-Versorgung.

3.2.2 Kultivierung von Cyanobakterien

Cyanobakterien und ihre biotechnologische Anwendung werden in der Literatur häufig mit zu den Mikroalgen gezählt, obwohl sie sich von ihrer Abstammung her deutlich von Algen unterscheiden. Aktuell sind die wichtigsten Cyanobakterien im Sinne einer biotechnologischen Anwendung die Arten *Spirulina (Arthrospira) platensis*, *Nostoc* sp. und *Aphanizomenon flos-aquae* (Pulz&Gross 2004, Chakdar et al. 2012). Das vornehmlich aus Cyanobakterien hergestellte Produkt ist die eigentliche Biomasse. Diese wird entweder aus natürlichen Gewässern geerntet, in Open- und Raceway ponds kultiviert oder in seltenen Fällen in Photobioreaktoren hergestellt. Anschließend wird sie entweder durch Sonnen- oder Sprühtrocknung getrocknet, zu Pulver verarbeitet oder in Kapseln gepresst (Pulz&Gross 2004, Milledge 2011). Das fertige Produkt wird dann im Bereich der biologischen Nahrungsergänzungstoffe verkauft, da den Inhaltsstoffen der Zellen laut aktuellen Untersuchungen eine Reihe von positiven Wirkungen zugeschrieben werden (Kuriakose&Kurup 2008, Benedetti et al. 2010, Kuriakose&Kurup 2010, Martelli et al. 2014). Dieser Bereich umfasst mehr als 75 % der hergestellten Biomasse aus Cyanobakterien. Darüber hinaus gibt es einen wachsenden Markt im Bereich von Tierfutter und Aquakulturen (Macias-Sancho et al. 2014). Weltweit werden jährlich 3.000 t Biomasse von *Spirulina* hergestellt, 600 t von *Nostoc* und 500 t von *Aphanizomenon* (Milledge 2011).

Die Kultivierung von Cyanobakterien zur Herstellung von „high-value products“ befindet sich noch am Anfang der Forschung. Obwohl eine Reihe von Inhaltsstoffen beschrieben wird, die gerade im Bereich der pharmazeutischen Wirkstoffe sehr interessant sind (Boyd et al. 1997, Bewley et al. 1998, Chakdar et al. 2012), gibt es bislang noch keine industrielle Produktion. Auch die gezielte Nutzung von extremophilen Cyanobakterien in biotechnologischen Prozessen steht noch am Anfang der Forschung. Diese Organismen zeichnen sich zwar durch eine mögliche Verwendung bei Bedingungen aus, bei denen andere Organismen nicht mehr lebensfähig sind, allerdings haben sie auch eine entsprechend geringe Wachstumsrate, wodurch sie in aktuellen Prozessen nicht konkurrenzfähig sind (Pulz&Gross 2004).

Eine gezielte Nutzung von terrestrischen Cyanobakterien in biotechnologischen Prozessen ist bislang nicht beschrieben.



3.3 Theoretische Grundlagen

In diesem Abschnitt werden die wichtigsten theoretischen Grundlagen zum Verständnis der durchgeführten Arbeiten im Rahmen der Fermentation von terrestrischen Cyanobakterien zur Gewinnung von biotechnologischen Wertstoffen beschrieben. Dabei wird zunächst auf die zur Produktion verwendeten Cyanobakterien eingegangen und anschließend auf die Wachstumsfaktoren und deren Einfluss. Danach werden die wichtigsten biotechnologischen Wertstoffe aus Cyanobakterien dargestellt, sowie die konkret in dieser Arbeit verwendeten Kultivierungsstrategien und wichtige verfahrenstechnische Parameter. Abgeschlossen werden die theoretischen Grundlagen mit der Vorstellung des Designs of Experiments (DoE), welches zur Optimierung der Cyanobakterienfermentation verwendet wurde.

3.3.1 Cyanobakterien

Cyanobakterien, die auch Blaualgen genannt werden, sind gramnegative Bakterien (Rippka et al. 1979), die sich asexuell vermehren (Mur et al. 1999). Wie andere gram-negative Prokaryoten besitzen Cyanobakterien ebenfalls eine äußere Begrenzung aus Cytoplasmamembran, Peptidoglykanschicht und äußerer Membran (von innen nach außen). Da die Peptidoglykanschicht jedoch deutlich dicker ist, tritt häufig eine positive Gram-Färbung auf (Hoiczky&Hansel 2000, Weiler&Nover 2008). Die blaugrüne Färbung ist dadurch begründet, dass Cyanobakterien im Photosystem neben Chlorophyll Phycobilisome als Lichtsammelkomplexe besitzen, die blaues Phycocyanin und Phycoerythrin, ein rötliches Pigment, enthalten. Innerhalb der Domäne der Bakterien bilden sie eine eigene Abteilung aufgrund der Befähigung zur oxygenen Photosynthese (Stanier et al. 1978). Cyanobakterien besiedeln die Erde seit mehr als 3,5 Milliarden Jahren und gehören damit zu den ältesten Lebensformen auf dem Planeten. Dabei kommt ihnen eine bedeutende Rolle zu, da sie durch ihre photosynthetische Aktivität für große Mengen von Sauerstoff gesorgt haben (Waterbury et al. 1979). Somit schufen sie die Lebensbedingung für zahlreiche sauerstoffabhängige Organismen (Hoiczky&Hansel 2000).

Nach morphologischen Merkmalen wurden Cyanobakterien zunächst in fünf Gruppen (Rippka et al. 1979) eingeteilt:

- Sektion 1: Einzellige Cyanobakterien, die sich durch binäre Zellteilung oder Knospung vermehren.
- Sektion 2: Einzellige Cyanobakterien, die sich ausschließlich durch Mehrfachteilungen vermehren oder Cyanobakterien, die sich sowohl durch die binäre Zellteilung als auch durch Mehrfachteilungen vermehren.

- Sektion 3: Filamentöse Cyanobakterien ohne Heterocyten, die sich nur in einer Ebene vermehren.
- Sektion 4: Filamentöse Cyanobakterien mit Heterocyten, die sich nur in einer Ebene vermehren.
- Sektion 5: Filamentöse Cyanobakterien mit Heterocyten, die sich in mehreren Ebenen vermehren können.

Neben dieser klassischen Einteilung existiert eine weitere Variante, welche molekularbiologische Charakteristika zur Einteilung der Cyanobakterien in 7 Ordnungen (NCBI) verwendet. Diese Einteilung und Systematik ändert sich jedoch aufgrund der aktuellen Forschung über Artabgrenzung und Systematik bei asexuell vermehrenden Organismen ständig (Schlegel&Meisterfeld 2003, Kauff&Büdel 2011).

Eine Besonderheit einiger Cyanobakterien (Sektion 3 und 4) ist die Fähigkeit, Stickstoff aus der Atmosphäre zu fixieren, was in ariden terrestrischen Ökosystemen dazu führen kann, dass die Stickstofffixierung durch Cyanobakterien die dominante Stickstoffquelle darstellt. Besonders prägnant ist dies in Regionen, in denen der Stickstoffeintrag ansonsten gering ist. Spezielle Zellen, wie Akineten oder Heterocyten, sowie die Ausbildung verschiedener cytoplasmatischer Einschlüsse ermöglichen die Anpassung an aride Habitate. Auch bei der Stabilisierung des Bodens und in funktionellen Prozessen des Ökosystems spielen Cyanobakterien eine wichtige Rolle (Belnap 2002). Für das kontinuierliche photosynthetische Wachstum stickstofffixierender Cyanobakterien werden lediglich N_2 , CO_2 , Wasser, Licht und Mineralsalze benötigt. Des Weiteren haben Cyanobakterien verschiedene Speicherkörper für Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphat. Dadurch sind Cyanobakterien in großen Bereichen in ökologischen Nischen zu finden (MacColl 1998, Mur et al. 1999). Sie besiedeln die unterschiedlichsten Habitate, die mit starken Schwankungen der Lichtintensität (Lakatos et al. 2001), der Stickstoff- (Dojani et al. 2007) und Wasserverfügbarkeit (Rascher et al. 2003) einhergehen. Besonders terrestrische Cyanobakterien aus ariden oder tropischen Regionen sind besser an höhere Temperaturen angepasst, z.B. durch Zellen mit verstärkter Zellwand (Lüttge&Kluge 2012). Ferner besitzen diese, im Gegensatz zu Embryopflanzen, die Eigenschaft, völlig austrocknen zu können ohne abzusterben und bei Befeuchtung wieder in einen aktiven Zustand überzugehen (Lange et al. 1986, Lange et al. 1989, Lange et al. 1994). Selbst in extremen Habitaten, wie Heißquellen, arktischen Flüssen und in polaren Regionen, wie Eisschelfe, Gletscher, Schmelzwasserströme der Gletscher und eisbedeckte Seen, gibt es Vorkommen von Cyanobakterien (Castenholz 1969, Skulberg 2000, Vincent 2002). So gibt es in Heißquellen Vorkommen des einzelligen Cyanobakteriums *Synechococcus* bei



Temperaturen von 45°C bis zu einem Maximum von 73 °C (Brock 1967, Miller&Castenholz 2000). Das Temperaturoptimum von *Synechococcus lividus* liegt bei 63°C bis 67°C (Zuber 1979).

Zudem sind sie dafür bekannt, eine große Vielfalt an Sekundärmetaboliten mit unterschiedlichen Aktivitäten zu produzieren (Zakhia et al. 2008). Die Produktion solcher Sekundärmetabolite kann ernsthafte Probleme, wie die Verschlechterung der Wasserqualität, mit sich bringen. Zu den biologisch aktiven Verbindungen mit negativen Auswirkungen zählen unter anderem Hepatoxine, Neurotoxine und Cytotoxine. Cyanobakterien weisen aber auch eine Vielzahl nützlicher Eigenschaften auf, die in Kapitel 3.3.4 näher beschrieben werden.

3.3.2 Terrestrische Cyanobakterien

Viele terrestrische Cyanobakterien sind kosmopolitisch vertreten. Zu den am häufigsten vorkommenden Arten gehören u.a. *Microcoleus*, *Schizothrix*, *Nostoc*, *Scytonema* und *Phormidium* (Dor&Danin 1996). Diese Spezies wurden bereits in Nord Amerika (Ashley et al. 1985), Brasilien (Azevedo 1991), Afrika (Frémy 1930), Europa (Starmach&Siemínska 1979), Indien (Tiwari 1972), Himalaya (Watanabe&Malla 1988), China (Ying et al. 1992) und Israel (Lange et al. 1992) nachgewiesen. Die genaue Verteilung der Arten variiert stark je nach Herkunft, den lokalen Umwelteinflüssen (Zusammensetzung des Bodens, Ionenstärke, pH-Wert und dem jährlichem Niederschlag) (Metting 1981, Hoffmann 1989, Ying et al. 1992). Die Fähigkeit von terrestrischen Cyanobakterien, stabile Krusten bilden zu können, ist schon lange bekannt (Booth 1941). Meistens bilden gerade die filamentös wachsenden Cyanobakterien die dafür notwendigen extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS) (Danin et al. 1989, Winder 1990, Belnap&Gardner 1993). Durch die EPS werden Partikel gebunden, immobilisiert und so gegen Erosion von Wind und Wasser geschützt (Belnap&Gardner 1993). Darüber hinaus wird die Rückhaltung von Nährstoffen und Feuchtigkeit verbessert (Shields&Durrell 1964, Brock 1975, Campbell 1980, Brotherson&Rushforth 1983). Dies hat nicht nur einen Effekt auf die Stabilität und die Fruchtbarkeit des Bodens, sondern auch auf eine ausgeglichene Luftfeuchtigkeit (Metting 1981, Harper&Pendleton 1993, Painter 1993). Biotechnologische Wertstoffe aus terrestrischen Cyanobakterien werden detailliert in Kapitel 3.3.4 und die konkret für Versuche dieser Dissertation verwendeten Stämme in Kapitel 3.4 dargestellt. Die einzelnen Wachstumsfaktoren werden nachfolgend beschrieben.

3.3.3 Wachstumsfaktoren

Nachfolgend dargestellt sind die wichtigsten Parameter mit einem direkten Einfluss auf das Wachstum, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Dazu gehört auch Wasser selbst

(Kapitel 3.3.3.7), da es durch die Kultivierung in dem ePBR erstmals möglich ist, austrocknungsinduzierte Stoffwechselfvorgänge zu untersuchen.

3.3.3.1 Wachstum

Cyanobakterien vermehren sich, wie bereits erwähnt, asexuell durch vegetative Zellteilung. Hierbei wird das Chromosom repliziert und als ringförmiges Molekül an die Membran angeheftet. Unter optimalen Wachstumsbedingungen erfolgt die Zellteilung schneller als das Chromosom dupliziert werden kann, was dazu führt, dass mehrere Kopien des Erbguts parallel angefertigt werden. Während der Duplizierung des Erbguts verdoppelt die Zelle ihre Größe und bildet zur Abschnürung der Tochterzelle einen Ring, welcher die Membran und die Zellwand zusammenzieht. Das Wachstum einer Bakterienkultur lässt sich in mehrere charakteristische Phasen unterteilen (Purves et al. 2011). Zunächst findet eine Anlauf-Phase, die sogenannte lag-Phase, statt (Abbildung 35 Phase I). Waren die Zellen zuvor einem Nahrungsmangel ausgesetzt oder muss die Anpassung an eine neue Umgebung erfolgen, so müssen die benötigten Enzyme zunächst gebildet werden.

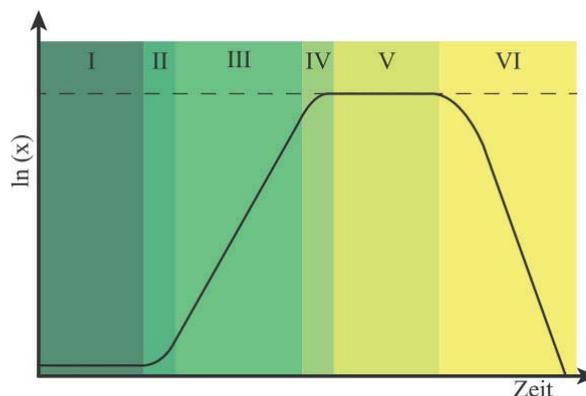


Abbildung 35: Darstellung einer bakteriellen Wachstumskurve. Aufgetragen ist der Logarithmus der Zellzahl der Zeit. Die Phasen I bis VI beschreiben dabei das bakterielle Wachstum: I = lag Phase, II = Übergangsphase, III = exponentielles Wachstum, IV = verzögertes Wachstum, V = stationäre Phase und VI = Absterbephase. Die gestrichelte Linie illustriert die Kapazitätsgrenze. Abbildung modifiziert nach (Cypionka 2010).

Es setzen Regulationssysteme ein, die Transportsysteme und Enzyme zur Verwertung des angebotenen Substrats bilden. Haben sich die Zellen an die Umgebungsfaktoren angepasst, ist die Teilungsrate höher als die Absterberate, und es kommt zu einer Übergangsphase (Abbildung 35 Phase II). Die Übergangsphase zeichnet sich dadurch aus, dass die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die Phase des exponentiellen Wachstums übergehen. Die exponentielle Phase (Abbildung 35 Phase III) beschreibt somit jene Phase, in der alle Zellen ein exponentielles Wachstum aufweisen. Der momentane Zuwachs μx wird durch die Änderung der Masse $[dx]$, dividiert durch die Änderung der Zeit $[dt]$, berechnet:



$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x \quad (1)$$

Durch Integration des momentanen Zuwachses, lässt sich das exponentielle Wachstum über einen bestimmten Zeitraum beschreiben:

$$\ln(x) = \ln(x_0) + \mu \cdot t \quad (2)$$

x_0 = Startbiomasse

x_t = Biomasse zum Zeitpunkt t

In exponentieller Schreibweise bedeutet dies:

$$x_t = x_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad (3)$$

Durch Umstellen der expliziten Form zur Bestimmung des momentanen Zuwachses, lässt sich die Wachstumsrate im exponentiellen Bereich mathematisch bestimmen:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{x_2}{x_1}\right)}{t_2 - t_1} = \frac{\ln(x_2) - \ln(x_1)}{t_2 - t_1} \quad (4)$$

t_1 = Startzeitpunkt

t_2 = Endzeitpunkt

x_1 = Biomasse zum Zeitpunkt t_1

x_2 = Biomasse zum Zeitpunkt t_2

Die Wachstumsrate μ ist abhängig von sowohl abiotischen als auch biotischen Faktoren (Cypionka 2010). Ist das Substrat, bzw. ein wachstumslimitierender Faktor wie beispielsweise Stickstoff, aufgebraucht, wird die Kapazitätsgrenze des Wachstums erreicht. Dadurch kann es zu einer innerartlichen Konkurrenz kommen, wodurch das exponentielle Wachstum gebremst wird, die Mortalitätsrate zunimmt und es zu einem verzögerten Wachstum kommt (Abbildung 35 Phase IV) (Hofbauer&Sigmund 1984). Die stationäre Phase wird erreicht, wenn die Teilungs- und Absterberate im Gleichgewicht stehen (Abbildung 35 Phase V). Entweder wird das Wachstum eingestellt und die Zellen gehen in einen Überdauerungszustand über oder die Organismen bilden z.B. verschiedene Toxine, um ihre direkten Konkurrenten auszuschalten (Martin&Allgaier 2002). Beobachtet man eine Bakterienkultur über einen längeren Zeitraum unter Nährstoffmangel, so nimmt die Anzahl an lebensfähigen Zellen exponentiell ab (Abbildung 35 Phase VI) (Cypionka 2010). Zur Berechnung des gesamten Wachstumsprozesses reicht demnach eine logarithmische bzw. exponentielle Verteilung nicht aus. Hierfür wird auf die logistische Verteilung zurückgegriffen (Britton 2003):

$$x_t = G \cdot \frac{1}{1 + 10^{-k \cdot G \cdot t} \cdot \left(\frac{G}{x_0} - 1\right)} \quad (5)$$

G = Maximale Konzentration

K = Populationskonstante

Die wichtigsten Einflussfaktoren sowie die jeweilige Art des Einflusses auf das Wachstum von Cyanobakterien werden in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt.

3.3.3.2 Licht

Die grundlegenden Mechanismen der Photosynthese (Lichtreaktion und Dunkelreaktion) sind bei Cyanobakterien und höheren Pflanzen gleich. Das Gleiche gilt für den Einfluss der Lichtstärke. Beides wurde bereits in Kapitel 2.3.2 dargestellt, so dass nachfolgend auf die wesentlichen Unterschiede näher eingegangen wird.

3.3.3.2.1 Photopigmente

Ein freiliegendes System von Thylakoidmembranen nimmt einen Großteil des Protoplasten ein, an denen die Reaktionen der Photosynthese und der Zellatmung ablaufen (Liberton et al. 2006). Anders als bei höheren Pflanzen ist das Photosystem gleichmäßig in der Thylakoidmembran verteilt. Typisch für Cyanobakterien sind granuläre Zelleinschlüsse, die Cyanophycin, Volutin oder Glykogene enthalten (Weiler&Nover 2008). Im Unterschied zu den Pflanzen fehlt den Cyanobakterien jedoch das Chlorophyll *b*, wobei die Antennenpigmente Chlorophyll *a* und Carotinoide an das membranständige PS II assoziiert sind (Bald et al. 1996). Zusätzlich sind der Thylakoidmembran pigmenthaltige Antennenkomplexe, die Phycobilisomen, aufgelagert und nicht in ihr eingebettet. Diese geben mit Hilfe der Biliproteine Phycoerythrin, Phycocyanin und Allophycocyanin die Anregungsenergie auftreffender Photonen an das PS II weiter und schließen gleichzeitig teilweise die sogenannte „Grüne Lücke“ im Absorptionsspektrum (490 bis 620 nm) zwischen Chlorophyll *a* und den Carotinoiden (Govindjee&Shevela 2011). So wird die Photosyntheserate erhöht und das Lichtspektrum kann effizienter genutzt werden. Einige Cyanobakteriengattungen sind sogar in der Lage, die Zusammensetzung von Phycoerythrin und Phycocyanin an die Lichtqualität anzupassen und so die vorhandene Strahlung bestmöglich zu nutzen, was als „Komplementäre Chromatische Adaption“ bezeichnet wird (Tandeau de Marsac&Houmard 1993, Mur et al. 1999). Abbildung 36 zeigt deutlich, dass sich die Absorptionsmaxima von Phycoerythrin und Phycocyanin in einem Wellenlängenbereich befinden, in dem Chlorophyll *a* und *b* nur gering oder kein Licht absorbieren können. Dies verschafft den Cyanobakterien unter bestimmten Lichtverhältnissen Vorteile gegenüber anderen Photosynthese betreibenden Organismen. Die Zusammensetzung der Pigmente ist



artspezifisch und unter anderem abhängig von den vorherrschenden Lichtverhältnissen. Alle Cyanobakterien enthalten jedoch Chlorophyll a, Carotinoide und Phycocyanin (Mur et al. 1999). In wenigen Taxa wurden auch andere Chlorophylle wie Chlorophyll *d* und kürzlich Chlorophyll *f* gefunden (Zakhia et al. 2008, Chen et al. 2010). Je nach Zusammensetzung der Pigmente variiert die Farbe der Cyanobakterien von rötlich über bläulich bis hin zu grünlich.

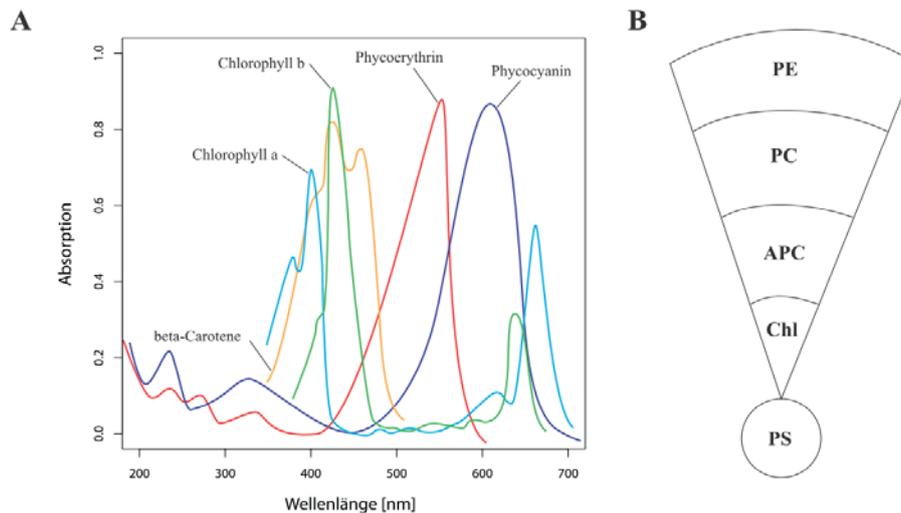


Abbildung 36: Absorptionsspektren von Photopigmenten. A = Absorptionsspektren der verschiedenen Photopigmente Chlorophyll a, Chlorophyll b, Phycoerythrin, Phycocyanin und beta-Carotene. B = Schematisch dargestellter Lichtsammelkomplex. PE = Phycoerythrin; PC = Phycocyanin; APC = Allophycocyanin; Chl = Chlorophyll a; PS = Photosystem. Die Lichtenergie wird nach dem Trichter-Prinzip an das Reaktionszentrum weitergeleitet modifiziert nach (Kupper et al. 2009).

3.3.3.2.2 Chlorophyll a Fluoreszenz

Chlorophyll a wird durch Quanten aus dem violetten und roten Spektralbereich angeregt. Dabei werden delokalisierte Außenelektronen von dem Grundzustand (S_0) in einen energetisch höheren Singulettzustand (S_1 , S_2) angehoben. Der Übergang von höheren angeregten Singulettzuständen zum S_1 -Zustand erfolgt strahlungslos. Bei dem langsameren Übergang vom S_1 - zum S_0 -Zustand konkurrieren mehrere energietransformierende Prozesse miteinander. Wird die absorbierte Energie nicht für photochemische Prozesse benötigt oder auf andere Moleküle übertragen, kehren die Elektronen in den Singulett-Grundzustand S_0 durch Emission einer Fluoreszenz zurück. Die in Form von Fluoreszenz abgegebene Energie ist für die Photosynthese verloren. Die Ausbeute der Fluoreszenz steht deshalb in direktem Zusammenhang mit der Photosyntheseleistung. Eine Verminderung der Ausbeute der Fluoreszenz wird als Löschung (Quench) bezeichnet. Die Fluoreszenz macht etwa 1 bis 3 % an der Dissipation der gesamten Anregungsenergie aus. Unter bestimmten Bedingungen ist auch ein Übergang von S_1 in T_1 möglich (Lawlor 2001, Schopfer&Brennicke 2010). Eine graphische Übersicht ist in Abbildung 37 dargestellt. Die Fluoreszenz kann z.B. mit Hilfe der Puls-Amplituden-Modulation-Technik

gemessen und mit Hilfe einer Kamera in einem Bild sichtbar gemacht werden (Imaging-PAM). Über die Berechnung der aufgezeichneten Fläche in bestimmten zeitlichen Abständen kann in einem weiteren Schritt das Wachstum einer phototrophen Kultur bestimmt werden (Murchie&Lawson 2013). Die genaue Funktionsweise der Imaging-PAM ist im Anhang A.3.13 beschrieben.

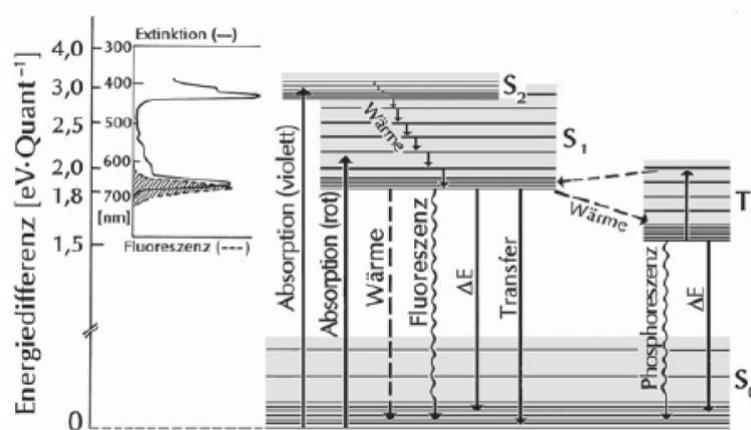


Abbildung 37: Vereinfachtes Termschema für Chlorophyll. Das Pigment kann, entsprechend seinem Extinktionsspektrum, durch Quanten aus dem roten und dem violetten Spektralbereich vom Grundzustand (S_0) in distinkte elektronische Anregungszustände überführt werden, die man 1. und 2. Singulett (S_1 bzw. S_2) nennt. S_1 und S_2 unterscheiden sich stark in ihrer Lebensdauer. Der Übergang $S_2 \rightarrow S_1$ ist so von so kurzer Dauer, dass die Energiedifferenz ausschließlich in Wärme umgewandelt werden kann. Der Übergang $S_1 \rightarrow S_0$ ist ausreichend langsam, um auch andere Energieumwandlungen zu gestatten: Emission eines Lichtquants = Fluoreszenz; Emission eines energiereichen Elektrons = photochemische Redoxreaktion, ΔE ; strahlungsloser Energietransfer zum Nachbarmolekül. Der Übergang zum angeregten Triplett ($S_1 \rightarrow T_1$) ist mit einer Umkehrung des Elektronenspins verbunden und kann nur langsam rückgängig gemacht werden. Der Übergang $T_1 \rightarrow S_0$ liefert eine relativ lang anhaltende Lichtemission (= Phosphoreszenz, $\lambda_{\text{max}} \approx 750 \text{ nm}$) (Schopfer&Brennicke 2010).

3.3.3.3 Kohlenstoffdioxid

Die Aufnahme von CO_2 spielt für die Versorgung der Zelle mit Kohlenstoff eine entscheidende Rolle. Unter submersen Bedingungen liegt je nach pH-Wert, Druck und Temperatur unterschiedlich viel CO_2 in chemisch oder physikalisch gelöster Form vor. Dies beeinflusst maßgeblich die Art der CO_2 -Aufnahme in die Zelle, die Verfügbarkeit der primären C-Quelle und somit das Wachstum des Organismus.

Cyanobakterien haben in ihrer Zellmembran und Thylakoidmembran aktive Transportsysteme, die sowohl Bikarbonat als auch CO_2 -Moleküle unter Energieverbrauch in die Zelle transportieren. Der Energiebedarf wird durch die absorbierte Lichtenergie gedeckt. Somit ist die CO_2 -Aufnahme auch abhängig von einer ausreichenden Beleuchtung der Zellen. Zusätzlich diffundiert gelöstes CO_2 in die Zelle (Badger&Price 2003, Moroney et al. 2013). In der Zelle wird CO_2 durch den sogenannten „ CO_2 concentrating mechanism“ (CCM) als Bikarbonation angereichert.

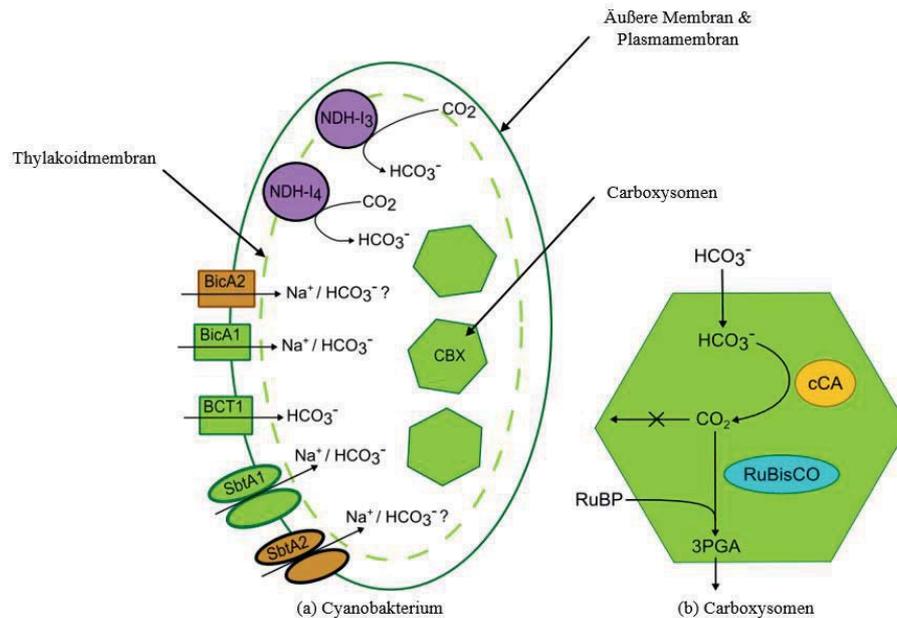


Abbildung 38: CO_2 -Aufnahme eines Cyanobakteriums inkl. CCM in der Zelle modifiziert nach (Badger&Price 2003).

Intrazellulär wird aus CO_2 , durch Reaktion mit H_2O , HCO_3^- gebildet und so akkumuliert. Da im Calvin-Zyklus CO_2 benötigt wird und RuBisCO neben O_2 nur CO_2 fixieren kann, ist eine Rückreaktion in CO_2 nötig. Dies wird durch eine enzymatische Reaktion der Carboanhydrasen erreicht, wodurch CO_2 fixiert und im Calvin-Zyklus verwendet werden kann (Badger&Price 2003, Moroney et al. 2013). Zusätzlich wird die CO_2 Verfügbarkeit für RuBisCO erhöht und damit die unerwünschte Fixierung von Sauerstoff durch die Konzentrierung von CO_2 verringert. Des Weiteren können sich Cyanobakterien somit an die CO_2 -Verfügbarkeit in der Umgebung anpassen. Unter CO_2 -armem Wachstum kann es zu einer Deckung des CO_2 -Bedarfs durch eine stärkere Ausbildung der Bikarbonat-Transporter kommen. Bei einer hohen CO_2 -Verfügbarkeit werden die benötigten Proteine für die CO_2 -Aufnahme und Umwandlung stärker produziert (Badger&Price 2003, Moroney et al. 2013). Eine Übersicht der aktuell bekannten Transportsysteme für CO_2 bei Cyanobakterien ist in Abbildung 38 dargestellt.

Das Verhältnis von CO_2 zu O_2 (CO_2/O_2 -Balance) ist wichtig, da es bei einer zu hohen Sauerstoffkonzentration zur Photorespiration und dadurch zu Zellschädigungen kommt. Aus diesem Grund sollte das Verhältnis von Sauerstoff zu Kohlenstoffdioxid so eingestellt werden, dass das primäre Carboxylierungsenzym RuBisCO mit CO_2 und nicht mit O_2 reagiert. In Zellkulturen mit einer hohen Zelldichte muss daher Sauerstoff aktiv aus dem Medium entfernt werden. Photorespiration konnte bislang allerdings nicht komplett verhindert werden. Sauerstofftransferraten im Medium zwischen 28 und $120 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ BTM h}^{-1}$ resultieren je nach Organismus in optimalem Wachstum. Bei einem zu geringen Sauerstoffabtransport wird das

Verhältnis von Sauerstoff zu Kohlenstoffdioxid verändert, und es kommt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies ROS, die unter anderem die Zellmembran schädigen. Cyanobakterien können hohen Sauerstoffkonzentrationen nicht standhalten und sterben innerhalb von 2-3 Stunden ab. Der Prozess wird durch hohe Temperaturen und CO₂-Limitierung beschleunigt (Pulz 2001).

3.3.3.4 pH-Wert

Ein optimaler pH-Wert ist ausschlaggebend für den Ablauf der Photosynthese. Werden die Organismen in einem Medium mit suboptimalem pH-Wert inkubiert, kann es zu Störungen im Stoffwechsel und zu einer unverhältnismäßig hohen Produktion von Zwischenprodukten der Photosynthese kommen. Ein pessimaler pH-Wert kann demnach zu physiologischen Reaktionen und zu Problemen bei der Leistungsfähigkeit bzw. Produktivität führen (Pulz 2001).

Bei einer niedrigen Protonenkonzentration, also einem hohen pH-Wert, stehen vor allem basische Kationen wie Mg²⁺ oder Ca²⁺ zur Verfügung. Basische Kationen haben nicht die Eigenschaft, Protonen zu binden wie Brønsted-Basen. Die Bezeichnung bezieht sich auf die Eigenschaften der Hydroxide dieser Metall-Ionen, die starke Basen sind. Bei einem niedrigen pH-Wert liegen hauptsächlich Kationensäuren (echte Säuren nach der Definition von Brønsted) wie Aluminium, Eisen oder Cadmium im Nährmedium vor (Munk 2011). Eine Übersicht der Löslichkeiten von Mineralstoffen bei verschiedenen pH-Werten ist in Abbildung 39 dargestellt.

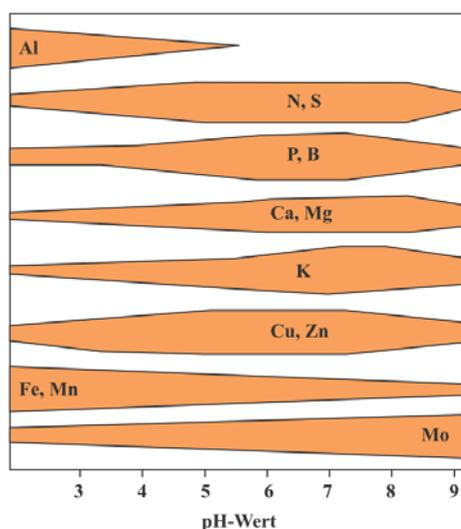


Abbildung 39: Löslichkeit von Mineralstoffen entlang von pH-Gradienten modifiziert nach (Munk 2011).

Durch eine Veränderung des pH-Wertes im Medium kommt es zu chemischen Reaktionen der gelösten Mineralstoffe. Bei einem neutralen bzw. alkalischen Medium kommt es beispielsweise zur Bildung von Eisenoxidhydroxiden. Diese können von den Cyanobakterien nicht



aufgenommen werden was in einem Eisenmangel resultiert. Des Weiteren steht der pH-Wert in einem engen Zusammenhang mit den DIC-Spezies (Dissolved Inorganic Carbon) (Abbildung 40).

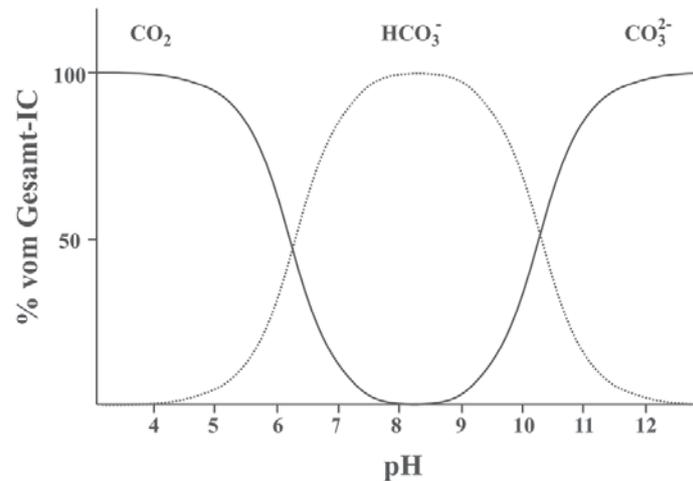
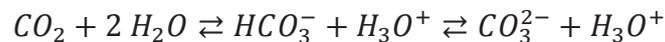


Abbildung 40: Verhältnisse von CO₂ in Wasser in Abhängigkeit des pH-Werts. IC = Inorganic Carbon modifiziert nach (Walter 1999).

Wird Kohlenstoffdioxid in Wasser gelöst, liegt folgendes Reaktionsgleichgewicht vor:



Bei einem pH-Wert von 9 verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung des Hydrogencarbonats. Bei einer weiteren Alkalisierung des Mediums sind vor allem Karbonate im Medium gelöst. Cyanobakterien können sowohl physikalisch gelöstes CO₂ als auch Hydrogencarbonat aufnehmen (siehe Kapitel 3.3.3.3). Durch die Verschiebung der DIC-Spezies kommt es zu Veränderungen der Photosyntheseleistung (Talling 1976). Zudem ist die Verfügbarkeit von gelösten Nährstoffen abhängig vom pH-Wert und beeinflusst indirekt den Primär- und Sekundärmetabolismus der Organismen. Aus diesem Grund kann der pH-Wert einen direkten positiven bzw. negativen Effekt auf die Biomasseproduktion, die Synthese der Photopigmente und die EPS-Produktion haben.

3.3.3.5 Temperatur

Grundsätzlich setzt sich die Photosynthese aus dem lichtabhängigen (photochemischen) Reaktionskomplex und einer Reihe von temperaturabhängigen (enzymatischen) Reaktionen zusammen. Liegen Kohlenstoff und Licht als limitierende Faktoren vor, so hat die Temperatur keinen signifikanten Einfluss auf die Photosyntheseleistung. Liegen keine limitierenden Faktoren vor und kommt es zu einem Temperaturanstieg, so erhöht sich die Photosyntheseleistung. In diesem Fall ist die Leistung des photochemischen

Reaktionskomplexes maximal und die temperaturabhängigen, enzymatischen Reaktionen laufen schneller ab als bei niedrigen Temperaturen. Das Temperaturoptimum von Cyanobakterien liegt je nach Organismus zwischen 25 °C und 40 °C (Reynolds 1984). Werden Cyanobakterien Temperaturen von über 40 °C ausgesetzt, so kommt es ohne spezielle Schutzmechanismen, wie beispielsweise Hitzeschockproteine, zur Denaturierung von Proteinen. Dies führt zu einer irreversiblen Inaktivierung verschiedener wärmeempfindlicher Komponenten des Calvin-Zyklus und des PS II (Schopfer&Brennicke 2010).

Des Weiteren hat eine Erhöhung der Temperatur Einfluss auf das Verhältnis von gelöstem CO₂ und O₂ im Nährmedium. Die Löslichkeit von CO₂ wird bei Erhöhung der Temperatur stärker herabgesetzt als die von O₂. Dies beeinflusst im Calvin-Zyklus das Carboxylaseenzym RuBisCO. RuBisCO bevorzugt CO₂ gegenüber O₂, da es eine höhere Affinität zu CO₂ (K_m 6,4-19,2 µM) als zu Sauerstoff (K_m 183-806 µM) hat (Schopfer&Brennicke 2010, GalmÉS et al. 2014). Da jedoch Sauerstoff sowohl in der Luft als auch im Wasser in höheren Konzentrationen im Vergleich zu CO₂ vorliegt, wird jedes zweite bis vierte Molekül RubP2 (Ribulose-1,5-bisphosphat) mit Sauerstoff anstatt Kohlenstoffdioxid umgesetzt. Wird nun die Temperatur erhöht, so steigt der Sauerstoffpartialdruck, und RuBisCO verwendet Sauerstoff, um RubP2 in 3-Phosphoglycerat umzuwandeln. Bei der sogenannten Photorespiration entsteht das toxische Stoffwechselprodukt 2-Phosphoglycolat, welches unter hohem Energieverbrauch in biochemischen Reaktionen umgewandelt werden muss (Pulz 2001).

3.3.3.6 Mineralsalze

Die Nährstoffe stehen Cyanobakterien als gelöste Ionen in wässriger Lösung zur Verfügung. Die Wichtigsten sind in Tabelle 3 zusammengefasst dargestellt. Bei Nährstoffmangel kommt es zu morphologischen und physiologischen Mangelsymptomen (Schopfer&Brennicke 2010). Ein Mangel kann z.B. durch einen suboptimalen pH-Wert verursacht werden (Kapitel 3.3.3.4).



Tabelle 3: Die wichtigsten Nährstoffe und ihre Funktion modifiziert nach (Schopfer&Brennicke 2010).

Nährstoff	Vorkommen	Funktion
Stickstoff		Bestandteil von Makromolekülen (DNA, RNA)
Schwefel	Aminosäuren, Nucleotide	
Phosphat		
Eisen	Ferredoxin	Elektronenüberträger beim Elektronentransport
Magnesium	Chlorophyll, Zellwandbestandteile	Lichtabsorption in der Photosynthese, Schutz
Kalium	Freies Kation im Cytosol	Aufrechterhaltung des pH-Wertes im Cytosol, Cofaktor von Enzymen
Calcium	Freies Kation im Cytosol, Zellwandbestandteil	Aufrechterhaltung des pH-Wertes im Cytosol, Schutz

3.3.3.7 Wasser

Metabolisch aktive Gewebe bestehen zu 85-95 % aus Wasser. Wasser ist ein Dipol und dadurch ein optimales Lösungsmittel für ein breites Spektrum stark polarer bis mäßig apolarer Teilchen. Als Lösungsmittel ist Wasser relativ inert und ermöglicht dadurch die Diffusion und chemische Wechselwirkungen mit anderen Teilchen. Wasser ist an zahlreichen Stoffwechselprozessen beteiligt und wichtig für das Wachstum von Cyanobakterien (Richter 1998, Schopfer&Brennicke 2010). Bei einem Wasserüberschuss ist der Diffusionswiderstand für CO₂ hoch und eine Diffusion nur langsam möglich. Die CO₂-Aufnahme in einem submersen System ist dadurch etwa 1000-mal langsamer als bei einer luftexponierten Kultivierung, wodurch die Photosyntheseleistung und das Wachstum verringert werden. Bei Wassermangel, bzw. Trockenstress, kommt es zu einer energieaufwendigen Stressreaktion. Cyanobakterien produzieren in diesem Fall u.a. vermehrt EPS. Die Energie, die für diese Schutzmechanismen verwendet wird, kann somit nicht für das Wachstum genutzt werden (Smith&Smith 2009).

3.3.4 Biotechnologische Wertstoffe

Die wichtigsten Wertstoffe aus Cyanobakterien sind nachfolgend dargestellt. Diese reichen von der bloßen Verwendung der Biomasse, über Inhaltstoffe der Zellen bis hin zu speziellen Stoffwechselprodukten.

3.3.4.1 Biomasse

Die Biomasse von Cyanobakterien kann auf Grund des hohen Gehaltes von Eisen, Proteinen und Vitaminen einiger Stämme als Nahrungsmittelergänzung für Menschen (Balch 2006) oder als Tierfutter (Kay 1991, Becker 2007) verwendet werden. Zum Beispiel aßen Chinesen bereits vor über 2000 Jahren Mikroalgen, um Hungersnöte zu überstehen (Spolaore et al. 2006).

Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass einige Arten von Cyanobakterien Gifte (sogenannte Cyanotoxine) produzieren können. Diese können gesundheitliche Schäden hervorrufen oder sogar tödlich wirken (Höll&Grohmann 2002). Diazotrophe (stickstofffixierende) Cyanobakterien eignen sich als Düngemittel aufgrund ihres hohen Stickstoffgehaltes (Raven&Allen 2003).

Ausgehend von der traditionellen Medizin einiger Völker werden gezielt Mikroorganismen auf potente Verbindungen hin untersucht. So wird beispielsweise die Biomasse einiger Nostoc-Arten seit 1500 v. Chr. zur Behandlung von Gicht, Fisteln und verschiedenen Formen von Krebs (Burja et al. 2001) und die des aquatischen Cyanobakteriums *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in Kosmetika (Chakdar et al. 2012) u.a. Pharmazeutika verwendet.

3.3.4.2 Photopigmente

Die Photopigmente von Cyanobakterien finden immer häufiger Anwendung als rein biologischer Farbstoff z.B. in Lebensmitteln. Da diese Farbstoffe nicht chemisch hergestellt wurden, wird eine „Bio“-Zertifizierung nicht gefährdet. Beispiel hierfür sind die Pigmente Chlorophyll (E140) und beta-Carotin (E160c) von *Arthrospira platensis* als natürlicher Farbstoff in Süßigkeiten (Glazer 1977, Downham&Collins 2000, Chakdar et al. 2012).

3.3.4.3 Antivirale Wirkstoffe

Systematisches Screening nach Bioaktivität zeigt, dass Cyanobakterien ein breites Spektrum an bioaktiven Stoffen aufweisen (Patterson et al. 1993). Ferner wurden auch antivirale Substanzen (gegen HIV, z.B. in einigen terrestrischen Arten wie *Nostoc* und *Scytonema*), Immunsuppressiva und Substanzen mit anti-fungizider Wirkung nachgewiesen (Falch 1996, Gustafson et al. 1997, Pulz&Gross 2004, Muller-Feuga et al. 2007). Des Weiteren enthalten die Sekundärmetabolite verschiedener Cyanobakterien Inhibitoren, Zytostatika, Hepatoxine, Cytotoxine und Neurotoxine (Skulberg 2000). Viele der antiviralen und pharmazeutisch interessanten Wirkstoffe sind Bestandteile der extrazellulären polymeren Substanzen, die von einigen Cyanobakterien gebildet werden. Diese werden im nachfolgenden Kapitel näher beschrieben.

3.3.4.4 Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS)

Cyanobakterien verfügen über ein breites Spektrum an Anpassungsstrategien an extreme Bedingungen. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Fähigkeit beruht auf der Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen, kurz *EPS* genannt, die die Zelle vollständig überziehen. Ein Unterschied zwischen Cyanobakterien und Algen ist, dass diese sehr große Mengen an EPS produzieren, die manchmal sogar 50% bis 90% des gesamten Kohlenstoffgehalts der



Cyanobakterien darstellen (Nielsen&Jahn 1999). Sie bilden bis zu drei differenzierbare Schichten aus (Li et al. 2001):

Scheide: eine dünne, einheitliche Schicht aus konzentrischen oder radialen Fibrillen, die direkt auf der äußeren Zellmembran aufliegt

Kapsel: (CPS = capsulare polysaccharid). Eine Zone aus diffus verteilten Polysacchariden, die noch mit der Zelloberfläche assoziiert ist, jedoch durch z. B. Warmwasser oder Natriumchlorid-Lösung entfernt werden kann

Schleim: (RPS = released polysaccharid). Zone von Polysacchariden, die entweder lose an die Kapsel gebunden sind oder gelöst im Nährmedium vorliegen

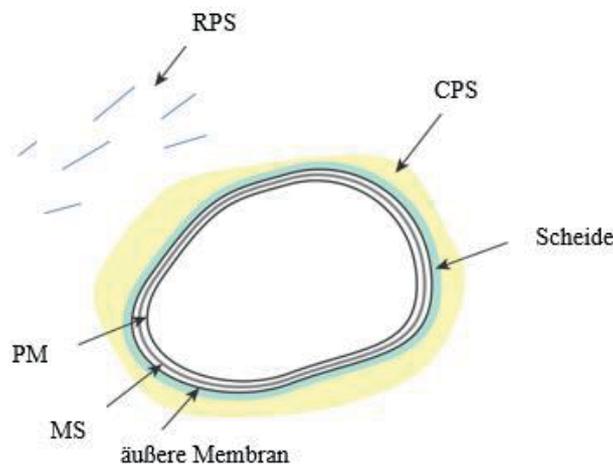


Abbildung 41: Die Hauptgruppen der EPS. Dargestellt ist eine bakterielle Zelle mit den drei Hauptgruppen der EPS. RPS = Released polysaccharid, CPS = Capsulare polysaccharid und Scheide. MS = Mureinschicht, PM = Plasmamembran. Abbildung modifiziert nach (Sutherland 1988).

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Begriff EPS als Sammelbegriff für CPS und RPS verwendet, da diese den Hauptanteil der extrazellulären Substanzen ausmachen und mit der verwendeten Analytik untersucht wurden. Bei EPS-bildenden Organismen wird die EPS in der Praxis zur Biofeuchtmasse gezählt.

Die Exopolysaccharide der Cyanobakterien können in Homo- und Heteropolysaccharide unterteilt werden. Erstere haben ein einheitliches Polymergerüst, wobei glykosidisch verknüpfte Monosaccharide als Grundeinheit dienen, wogegen Heteropolysaccharide hochmolekulare Komplexe bilden (Pereira et al. 2009). Sie bestehen zu großen Teilen aus Glucuron- und Galacturonsäuren sowie häufig Glucose und weiteren Monosacchariden wie Xylose, Arabinose, Fucose oder Mannose. Ebenso sind Methylzucker mit Pyruvat-, Acetat- oder sogar Sulfatgruppen nachweisbar (Sutherland 1990). Insbesondere die sulfatierten

Polysaccharide zeigen eine pharmakologische Wirksamkeit und sind daher für die medizinische Forschung interessant (Namikoshi&Rinehart 1996). Die Zusammensetzung und Quantität der cyanobakteriellen EPS wird durch die Kultivierungsbedingungen erheblich beeinflusst, wobei der Einfluss abiotischer Faktoren je nach Stamm sehr unterschiedlich ausfallen kann. So scheiden manche Stämme bei Nährstoff- oder Stickstoffmangel vermehrt EPS aus, während dies bei anderen Bakterien die EPS-Synthese verringert (De Philippis et al. 1998). Sutherland und Mitarbeiter konnten zeigen, dass ein niedriges Stickstoff-zu-Kohlenstoffverhältnis die Proteinsynthese hemmt, jedoch die Produktion von Polysacchariden begünstigt (Sutherland 1996). Aufgrund der artspezifischen EPS-Zusammensetzung durch Veränderung abiotischer Faktoren, wie Strömungsgeschwindigkeit, Begasungsrate, Lichtintensität oder der Temperatur, sind zur Ermittlung optimaler Kultivierungsbedingungen in der Regel Einzelfalluntersuchungen notwendig.

Lebensgemeinschaften von Cyanobakterien in Wüstengebieten tolerieren hohen osmotischen Stress, indem sie unter anderem das Disaccharid Trehalose anreichern. Zum einen verhindert Trehalose durch Bildung von Wasserstoffbrücken mit den Phosphatenden der Phospholipidmembran das Verschmelzen der Zellmembranen (Crowe&Crowe 1992, Hill et al. 1997) und zum anderen schützen sie die Membranproteine, indem sie die Funktion der Hydrathülle übernehmen. Diese Funktionen bezeichnet man auch als *Wasser-Ersatz-Mechanismus* (Potts 1994). Mit Hilfe von EPS binden Cyanobakterien bei Austrocknung so zusätzlich Wassermoleküle über einen langen Zeitraum und sind in der Lage bei erneuter Wasserverfügbarkeit innerhalb von Minuten zu rehydrieren (Hill et al. 1997, Helm et al. 2000). Zudem stellen die EPS einen Mineral- und Nährstoffspeicher dar. Einige xerische Arten lagern zudem UV-Strahlen absorbierende Pigmente in die Glycokalyx ein, um die Zelle vor photooxidativem Abbau zu schützen (Sutherland 1988, Garciapichel et al. 1992).

Bereits seit 1950 sind extrazelluläre polymere Substanzen bekannt, und bei hunderten Cyanobakterien-Stämmen wurde die Synthese der EPS erforscht (De Philippis et al. 2001). Auf Grund der vielfältigen physikalischen und chemischen Eigenschaften werden Bakterien, denen die Fähigkeit der EPS-Bildung eigen ist, in der chemischen und pharmazeutischen Industrie, der Medizintechnik, in Kosmetika und Lebensmitteln sowie in der Erdölförderung und Erzextraktion genutzt (Sutherland 1990). In der Lebensmittelchemie oder Pharmazie werden sie zur Stabilisierung von Gelen, Suspensionen, Emulsionen und umwelttechnologisch zur Klärung von Gewässern durch Bindung von Schwebstoffen oder Schwermetallen (Sutherland 1996, De Philippis et al. 2001) verwendet. Hier zeigt die cyanobakteriell produzierte EPS eine höhere pH-Toleranz sowie temperaturstabile Viskosität im Vergleich zum herkömmlichen



Xanthan (De Philippis et al. 2000). Zudem enthält EPS auch eine Reihe von bioaktiven und antiviralen Substanzen. *Nostoc ellipsosporum* produziert Cyanovirin, das zur Bekämpfung des HI-Virus eingesetzt werden kann, und in vielen weiteren Stämmen wurden Bestandteile mit antibiotischen, cholesterinsenkenden oder antimutagenen Stoffen entdeckt, deren Einsatz in der Humanmedizin vielfach erst noch bevorsteht (Burja et al. 2001, Singh et al. 2005). Auch der Einsatz zur Produktion von Biokraftstoffen durch Cyanobakterien wird intensiv untersucht (Mata et al. 2010, Wijffels et al. 2010). Dabei stehen gerade EPS-produzierende Cyanobakterien noch am Beginn des Screening-Prozesses, obwohl deren Toleranz hoher Temperaturen, pH-Werte und weiterer abiotischer Faktoren die Verwendung zur biotechnologischen Massenproduktion begünstigt (Mata et al. 2010).

3.3.4.5 Weitere

Weitere wertvolle Substanzen wie Stoffwechselmetabolite mit antioxidativen Wirkungen sowie Glyco- und Phospholipide, welche in der Kosmetikindustrie Verwendung finden, können ebenfalls aus Cyanobakterien gewonnen werden und finden in Zukunft mehr Beachtung (Muller-Feuga et al. 2007).

3.3.5 Kultivierung von terrestrischen Cyanobakterien

Zur Kultivierung phototropher Organismen, wie terrestrischer Cyanobakterien, wird im Allgemeinen eine spezielle Form von Bioreaktor, ein sogenannter Photobioreaktor verwendet. Grundsätzlich gibt es zwei Typen von Photobioreaktoren: offene und geschlossene Systeme (Pulz 2001). Da sich diese Arbeit ausschließlich mit geschlossenen Systemen befasst (bzw. eine neue Art von Photobioreaktor vorgestellt wird), wird auf offene Systeme an dieser Stelle nicht näher eingegangen. Nachfolgend werden daher alle in dieser Arbeit verwendeten Bioreaktorsysteme sowie wichtige verfahrenstechnische Parameter zur Charakterisierung einer Fermentation dargestellt. Die Entwicklung sowie die Parameter des während der Dissertationszeit entstandenen emersen Photobioreaktors (ePBR) wird ausführlich in Kapitel 3.8 erläutert. Andere Photobioreaktoren wurden bereits in Kapitel 3.2.1 besprochen.

3.3.5.1 Leistungseintrag und mechanische Belastung

Der Leistungseintrag entspricht der Menge an Leistung, die durch Rührwerk, Schütteln oder Begasung als Bewegungsenergie in den Reaktor eingebracht wird. Die Berechnung der volumetrischen bzw. spezifischen Leistungsdichte (P/V) ist je nach Art und Kombination der in das System eingebrachten Leistung verschieden. Darüber hinaus spielt die Art und Form der verwendeten Bauteile eine entscheidende Rolle. Des Weiteren werden für die Berechnung

häufig empirische Werte betrachtet, Vorversuche durchgeführt oder CFD-Simulationen gemacht (Buchs 2001, Peter et al. 2006).

Eine ausreichende Durchmischung der Kultursuspension bei einer submersen Fermentation ist sehr wichtig, um eine hohe OTR/CTR und gute Versorgung mit Nährstoffen zu erreichen. Dies wird zum einen durch eine Verringerung der Blasengröße und zum anderen durch die Verhinderung von Zellagglomeraten erreicht. Beides führt durch eine Optimierung des Oberflächen- zu Volumenverhältnis dazu, die für einen Stofftransport notwendige Oberfläche zu vergrößern. Die eingebrachte mechanische Leistung ist auf der anderen Seite auch ein Stressfaktor für die Organismen, da es durch die Bewegung und das Zerplatzen von Gasblasen, beim Austritt der Blasen aus der Flüssigkeitsphase, zu einer direkten mechanischen Belastung kommt. Es zeigte sich, dass besonders kleine Gasblasen diesen Effekt haben. Eine weitere Quelle mechanischer Belastung ist die Bewegung der Flüssigkeit selbst (McDaniel&Bailey 1969). Jeder Mikroorganismus weist eine artspezifische Widerstandskraft gegen mechanische Belastungen auf. Diese hängt von Faktoren, wie zum Beispiel der Dicke der Zellwand oder der Ausbildung einer EPS-Hülle, ab. Auch die Art des Wachstums ist ausschlaggebend. Kugelige Agglomerate sind widerstandsfähiger gegenüber Scherstress als fadenförmige Zellzusammenschlüsse (Bronnenmeier&Markl 1982). Sobczuk untersuchte das Verhalten von Grünalgen auf verschiedenen hohe Leistungsdichten und stellte fest, dass es einen Bereich für optimales Wachstum gibt (Sobczuk et al. 2006). Wurde diese optimale Leistungsdichte unter- oder überschritten, so kam es zu schlechterem Wachstum der Algen.

Da die Leistungsdichte grundlegend die Art der Strömung, die OTR und das Wachstum der Mikroorganismen im Reaktor beeinflusst, ist sie eine wichtige Kenngröße, um Bioreaktorsysteme vergleichen zu können.

3.3.5.2 Sauerstofftransferrate OTR

Die Sauerstofftransferrate OTR (oxygen transfer rate) ist eine weitere Kenngröße, die häufig zur Charakterisierung von Bioreaktoren genutzt wird. Die OTR wird unter anderem von der spezifischen Stoffaustauschfläche und dem flüssigkeitsseitigen Stofftransportkoeffizienten beeinflusst. Die Stoffaustauschfläche hängt dabei direkt mit dem Leistungseintrag in das betrachtete System und der Art des Zellwachstums zusammen. Je größer die zur Verfügung stehende Fläche ist, desto größer kann auch die OTR sein. Aufgrund der Zweifilmtheorie wird dabei angenommen, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Sauerstofftransportes der Widerstand zwischen der Gas- und der Flüssigkeitsgrenzschicht (Flüssigkeitsgrenzfilm) ist. Mit dem entsprechenden Transportwiderstand k_{LA} gilt die allgemeine Stoffübergangsgleichung:



$$OTR = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) \quad (6)$$

k_L = Stoffübergangskoeffizient	[m s ⁻¹]
a = volumenbezogene spezifische Grenzfläche	[m ² m ⁻³]
$c_{O_2}^*$ = Gleichgewichtskonzentration an der Phasengrenzfläche	[mol L ⁻¹]
c_{O_2} = Gaskonzentration der Lösung	[mol L ⁻¹]

In einem aeroben, nicht limitierten Prozess ist die OTR gleich der Sauerstoffaufnahme rate OUR. Diese kann z. B. mit Hilfe einer Abgasanalytik aus der Massenbilanz des Sauerstoffes in Zu- und Abluft bestimmt werden. Des Weiteren kann die OTR auch nach Formel (6) berechnet werden, wenn $k_L a$ experimentell bestimmt und $C_{O_2}^*$ mit Hilfe der Henry-Konstante und dem Sauerstoffpartialdruck berechnet wurde. Die entsprechenden Formeln zu OTR und $k_L a$ sind dem Anhang A.1.2 und A.1.3 zu entnehmen.

3.3.5.3 Verwendete Kultivierungsstrategien

Nachfolgend dargestellt sind die verwendeten submersen und emersen Kultivierungsstrategien zur Fermentation von terrestrischen Cyanobakterien. Genaue Angaben zu den Methoden sind dem Anhang A.1 sowie A.2 zu entnehmen. Des Weiteren wurden Schüttelkolben und Agarplatten verwendet, die bereits in Kapitel 2.3.3.9.1 bzw. 2.3.3.9.3 beschrieben wurden.

3.3.5.3.1 Blasensäulen

Die einfachste Form einer Blasensäule stellt der Gärbottich dar. Wird dieser zusätzlich steril verschlossen und besitzt eine Vorrichtung zur Dispergierung für Gas, erhält man den einfachsten pneumatisch betriebenen Bioreaktor. Mögliche Begasungsorgane können z.B. Düsen, Lochplatten, oder Begasungsringe sein. Bei der kostengünstigsten Bauform wird das Gas im Sumpf in die Flüssigkeit dispergiert und strömt durch die Kolonne bis zum Kopf. Dort kommt es zu einer Trennung von Gas und Flüssigkeit. Der Leistungseintrag und damit verbunden der Stoffübergang werden hauptsächlich durch die Druckdifferenz des Gases zwischen Ein- und Austritt sowie der Blasengröße bestimmt. Blasensäulenreaktoren zeichnen sich besonders durch ihre konstruktive Einfachheit aus, was sie zu einem preiswerten und wenig störungsanfälligen Reaktorsystem macht. Sie werden daher vor allem für die Massenproduktion von Biomasse verwendet (Storhas 2000). Eine Anpassung an unterschiedliche Kultivierungsbedingungen, insbesondere im Hinblick auf die Viskosität der Flüssigkeit, ist sehr beschränkt (Goedecke 2006, Grote 2011). Ungeeignet sind sie daher für Kultivierungen, bei denen leicht Schaum entsteht, es schnell zur Sedimentation kommen kann oder der Leistungsbedarf zu hoch wird. Werden die beschriebenen Reaktoren noch um Einbauten sowie

verschiedene Sensorik und Regeltechnik erweitert, spricht man im Allgemeinen von Airliftreaktoren (siehe auch Kapitel 3.2.1)(Storhas 2000).

In dieser Arbeit wurden begaste Glasröhren als Reaktionsgefäße (Abbildung 43 B) in einer Kniese-Apparatur betrieben (EDWARDS, KNIESE & Co., Marburg). Diese werden nachfolgend aufgrund ihrer baulichen Ähnlichkeit zur Vereinfachung als Blasensäule bezeichnet, obwohl sie einige allgemeingültige Kriterien einer Blasensäule nicht erfüllen (Storhas 2000). Die Kniese-Apparatur ermöglicht eine permanente Belichtung mittels Leuchtstoffröhren bei einer über Wasserkühlung konstant gehaltenen Temperatur. Die Reaktionsgefäße können durch Leuchtstoffröhren mit regelbarer Lichtintensität gleichmäßig ausgeleuchtet werden. Die Begasung erfolgt mit steriler Frischluft (Böhme 2002). Der Vorteil, im Vergleich zum herkömmlichen Erlenmeyerkolben, liegt in der verbesserten Versorgung der Kultur mit CO_2 über die Begasung. Ein Prozessschema der Versuche in der Kniese-Apparatur ist in Abbildung 42 dargestellt. Durch die Verwendung eines Luftbefeuchters sowie einer Tropfenfalle kann der Kulturmedienverlust während der Fermentation drastisch verringert werden.

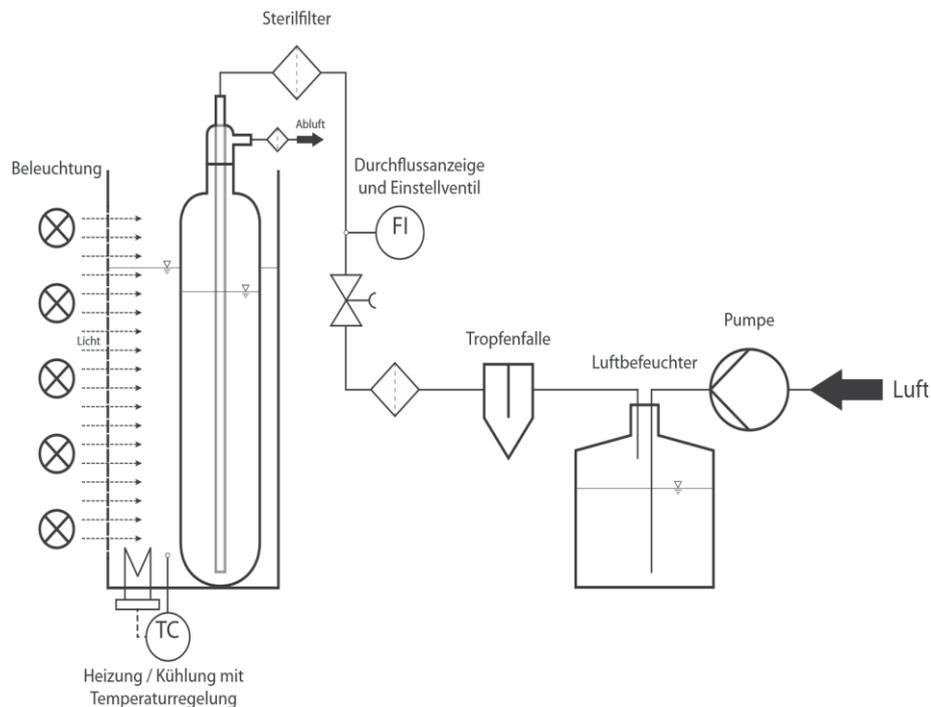


Abbildung 42: Aufbau für die Luftversorgung der Blasensäule. Die angesaugte Umgebungsluft wird mit Wasser gesättigt, um einen Verlust von Flüssigkeit in der Blasensäule zu vermindern. Um ein Verstopfen der Ventile und Sterilfilter zu verhindern, strömt die Luft durch eine Tropfenfalle. Die Durchflussmenge wird am Einstellventil manuell reguliert. Vor dem Eintritt in die Blasensäule wird die Luft durch einen Sterilfilter geleitet, um eine Kontamination der Mikroorganismen zu verhindern. Auch am Austritt befindet sich ein Filter. Ein temperiertes Wasserbad sorgt für die richtige Temperatur in der Blasensäule.



3.3.5.3.2 Rührkesselreaktoren

Rührkesselreaktoren gehören aktuell zu den meist genutzten Bioreaktoren. Der Reaktor besteht aus einem Behälter mit gewölbtem Boden. Die Temperierung wird meistens durch einen Doppelmantel (Heiz-/Kühlmantel) realisiert und durch einen entsprechenden Messfühler gesteuert. Das Rührwerk besteht aus einem Rührer (z.B. Scheibenrührer, Ankerrührer, Impellerrührer, Propellerrührer etc.) und einer Welle (Abbildung 43 C). Der Stoffübergang und die Flüssigkeitsströmung kann durch die Verwendung von unterschiedlichen Rührertypen und Stromstörern variiert werden. Die Zuluft gelangt über einen Gasverteiler (z.B. perforiertes Rohr) in das Medium. Zusätzliche Komponenten könnten beispielsweise auch Sonden für die Ermittlung des pH-Wertes, der Schaumhöhe und der Sauerstoff- sowie Kohlenstoffdioxidkonzentrationen sein. Mit Hilfe dieser Sonden können auch bestimmte Regelkreise für die Fermentation eingestellt werden (Storhas 2000). Je nach Bedarf kann der Reaktor im Fed-batch- oder Batchmodus betrieben werden (Chmiel 2006, Grote 2011). Die Sauerstofftransferate liegt durch den mechanischen Leistungseintrag oberhalb der des Schüttelkolbens (Chmiel 2006). Bei der Fermentation entstehen jedoch durch die Gasblasen Scherkräfte, die empfindliche Zellen beschädigen können. Daher werden Rührkesselreaktoren kaum zur Kultivierung von z.B. Pflanzenzellen eingesetzt.

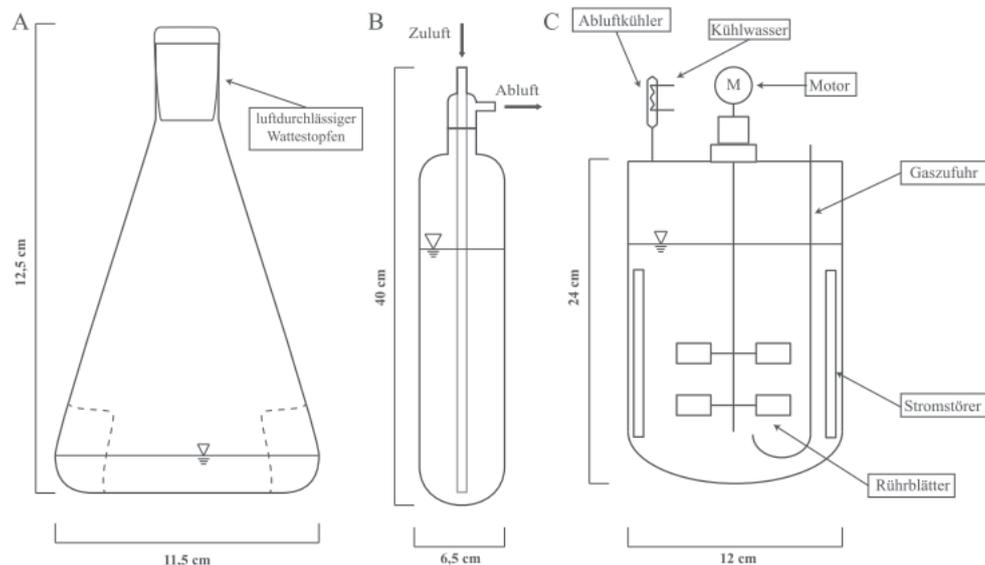


Abbildung 43: Schema der verwendeten Reaktoren. A = Schüttelkolben B = Blasensäule C = Rührreaktor. Wichtige Parameter zur Charakterisierung der Reaktoren sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Charakterisierung der verwendeten Bioreaktorsysteme aus Abbildung 43.

Parameter	Schüttelkolben	Blasensäule	Rührreaktor
Höhe [cm]	12,5	40	24
Breite [cm]	11,5	6,5	12
Volumen [mL]	300	1000	2500
Schlankheitsgrad	-	6	2

3.3.5.3 Emerser Photobioreaktor (ePBR)

Der während dieser Arbeit entwickelte emerse Photobioreaktor (ePBR) kann verschiedene phototrophe Organismen luftexponiert kultivieren. Parameter, wie Nährstoffversorgung, Austrocknung, Temperatur und Lichtstärke können hier gezielt eingestellt und variiert werden. Alle weiteren Details werden ausführlich in Kapitel 3.8 dargestellt.

3.3.6 Statistische Versuchsplanung

Mit Hilfe von statistischer Versuchsplanung, auch Design of Experiments (DoE) genannt, lässt sich die Anzahl der Versuche, die notwendig sind, um Abhängigkeiten zwischen untersuchten Faktoren und einer Zielgröße zu ermitteln, stark verringern. Dies ist besonders dann entscheidend, wenn Zeit und Kosten zu den limitierenden Faktoren einer Versuchsplanung gehören, wie es z.B. in der Industrie häufig der Fall ist.

Die Reduktion der notwendigen Versuche durch DoE wird am Beispiel von Abbildung 44 deutlich. Gegenübergestellt sind hier die klassische „One factor at a time“-Methode sowie die statistische Versuchsplanung. Um zwei Anlagen bei zwei verschiedenen Temperaturen zu untersuchen, sind nach der klassischen Methode 3×8 , also insgesamt 24 Versuche notwendig. Mit DoE wird sogar ein Faktor mehr untersucht, die Gesamtzahl der Versuche beträgt mit 16 (4×4) jedoch insgesamt 8 Versuche weniger. Da trotzdem je Faktor (Temperatur und Anlage) 8 Datensätze vorhanden sind, ist die statistische Absicherung genauso gut wie bei der klassischen Methode.

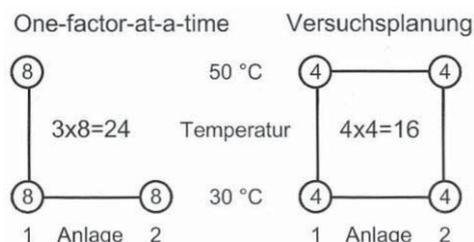


Abbildung 44: Vergleich von One-factor-at-a-time mit statistischer Versuchsplanung (DoE) nach (Kleppmann 2008)



Die Anzahl der nötigen Versuche steigt mit der Zahl der zu untersuchenden Faktoren und kann mit Hilfe Formel 7 berechnet werden (Kleppmann 2008):

$$N = n \cdot m^k = 60 \cdot \left(\frac{\sigma}{\Delta\mu}\right)^2 \quad (7)$$

$n =$ Anzahl der Durchführung der Faktorstufenkombination

$m^k =$ Faktorstufenkombination

$m =$ Anzahl der Stufen

$k =$ Anzahl der Faktoren

$\sigma =$ Standardabweichung der Einzelwerte

$\Delta\mu =$ Tatsächlich vorhandener Unterschied der Einzelwerte

Da bei vollständig faktoriellen Versuchen die Zahl der Faktorstufenkombinationen mit der Anzahl der Faktoren sehr schnell zunimmt, wurden fraktionelle faktorielle Versuchspläne entwickelt. Sie finden dann Anwendung, wenn viele Faktoren untersucht werden sollen, man diese Faktoren gewichten möchte und der Einfluss auf eine Zielgröße bestimmt werden soll. Aufgrund dessen werden sie auch als „Screening-Versuchspläne“ oder 2^{k-p} bezeichnet. Anders als bei voll-faktoriellen Versuchsplänen (2^k) wird nur ein Anteil von Faktorstufenkombinationen $1/2^p$ untersucht. Graphisch kann dies anhand von Abbildung 45 veranschaulicht werden. Obwohl nicht alle Faktorkombinationen (Eckpunkte des Würfels) untersucht werden, kann trotzdem der gesamte Würfel (Versuchsraum) abgebildet werden.

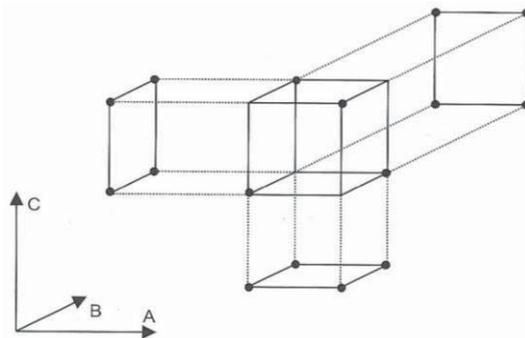


Abbildung 45: Vollständiger faktorieller Versuchsplan umfasst alle Ecken des Würfels, fraktioneller faktorieller Versuchsplan nur die markierten Eckpunkte. Abbildung nach (Kleppmann 2008).

Ein fraktioneller Versuchsplan kann durch eine nachträgliche Durchführung der ausgelassenen Versuche jederzeit wieder zu einem vollständigen Versuchsplan ergänzt werden. Die Gefahr dieser Versuchspläne liegt in einer potentiellen Vermengung von Effekten. Dies kommt dadurch zu Stande, dass, wie gesagt, nur ein Teil der Faktorstufenkombinationen realisiert wird und sich bei diesen Kombinationen vermengte Effekte nicht unterscheiden. Man muss an dieser Stelle durch technische Überlegungen entscheiden, welcher der vermengten Effekte ein

Ergebnis bestimmt. Sind diese Überlegungen falsch, oder werden potentielle Verfälschungen ignoriert, kommt man insgesamt zu einem falschen Ergebnis. Ggfs. werden weitere Einzelversuche notwendig, um zu einer klaren Unterscheidung zu kommen. Da davon auszugehen war, dass Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Faktoren dieser Arbeit bestehen, wurde des Weiteren ein D-optimaler Versuchsplan erstellt. Dieser ist ein Spezialfall von fraktionellen faktoriellen Plänen und optimal zur eindeutigen Ermittlung dieser Wechselwirkungen. Vorteil eines D-optimalen Versuchsplanes ist die Möglichkeit, bei der Vergabe der Kandidaten für einen Faktor beliebige Werte festzulegen; bereits vorhandene Daten können mit einbezogen werden, und die Anzahl der Einzelversuche ist beliebig wählbar (oberhalb der Mindestzahl nach Vorgabe des Modells). Mit Hilfe einer statistischen Analyse der Daten können Faktoren auch nachträglich neu bewertet und ggfs. ignoriert werden (Kleppmann 2008, Siebertz et al. 2010).

Um einen entsprechenden Versuchsplan aufzustellen und die erhaltenen experimentellen Daten zu analysieren, wurde in dieser Arbeit die Software Visual-Xsel der Firma crgraph (München) verwendet. Um die Abhängigkeit der Zielgröße von den betrachteten Variablen zu bestimmen, führt das Programm eine multivariante Regressionsanalyse durch und verwendet hierzu folgendes Modell:

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n (a_{ij} \cdot x_i \cdot x_j) + \sum_{i=1}^n (a_{ii} \cdot x_{ii}^2) + \varepsilon \quad (8)$$

$y =$ experimentell ermittelter Wert

$a_i, a_{ij}, a_{ii} =$ Regressionskoeffizienten

$x_i, x_{ij}, x_{ii} =$ unabhängige Variablen

$\varepsilon =$ Versuchsfehler

Zur Einschätzung der Genauigkeit des erzeugten Modells stehen Angaben zum Bestimmtheitsmaß (R^2), zum adjustierten Bestimmtheitsmaß, der Residuenverteilung, dem p-Wert (probability) und der Standardabweichung zur Verfügung. Beide Bestimmtheitsmaße liegen bei Werten zwischen 0 und 1, wobei sie besser sind, je näher sie an 1 liegen. Anhand der Residuenverteilung kann eine Normalverteilung der Werte geprüft werden, um systematische Fehler auszuschließen und Ausreißer zu identifizieren. Der p-Wert gibt Aufschluss über die Signifikanz eines betrachteten Faktors für das Modell. Je kleiner dieser Wert ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass der betrachtete Faktor einen signifikanten Einfluss hat (Kleppmann 2008, Siebertz et al. 2010).



3.4 Verwendete Organismen

Nachfolgend werden alle Organismen und Zellkulturen detailliert beschrieben, die für die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation verwendet wurden.

Alle Cyanobakterien-Stammkulturen wurden von Prof. Dr. Büdel aus der Abteilung Pflanzenökologie und Systematik der TU Kaiserslautern bereitgestellt. Für dieses Projekt wurden zunächst neun verschiedene Stämme von terrestrischen Cyanobakterien vorselektiert, die sich besonders gut zur Kultivierung in dem emersen Photobioreaktor-Prototyp eignen sollten. Die Selektion richtete sich zum einen auf schnelle Wachstumsraten und zum anderen auf eine gute Anheftung an Oberflächen. Alle Kulturen stammen aus xerischen oder ariden Habitaten und sind in Tabelle 5 aufgelistet. Durch Vorversuche zur physiologischen Charakterisierung dieser Stämme, durchgeführt am Lehrstuhl für Pflanzenökologie und Systematik, stellten sich *Nostoc muscorum* (90.3) und *Trichocoleus (Microcoleus) sociatus* (92.2) als am besten geeignet heraus. Diese Cyanobakterien wurden daher ausgewählt und für alle cyanobakteriellen Versuche dieser Arbeit verwendet (in Tabelle 5 fett gedruckt).

Tabelle 5: Übersicht aller initial für das Screening verwendeter Organismen. Die verwendeten Organismen stammen aus der Sammlung von Prof. Dr. Burkhard Büdel; Technische Universität Kaiserslautern, Abteilung Pflanzenökologie und Systematik.

Organismen	Stamnummer	Habitat
<i>Nostoc muscorum</i>	90.3	Allison, USA
<i>Leptolyngbya</i> sp.	2292.1	Soebatsfontein, Südafrika
<i>Phormidium</i> sp.	15060	Wlotzkasbaken, Namibia
<i>Trichocoleus (Microcoleus) sociatus</i>	92.2	Nizzana, Israel
<i>Microcoleus vaginatus</i>	15066	Sonop, Namibia
<i>Microcoleus chthonoplastes</i>	02.17	Wüstensand, Namibia
<i>Scytonema javanicum</i>	96.13	Regenwald, Costa Rica
<i>Scytonema ocellatum</i>	02.1	Wüstensand, Namibia
<i>Tolypothrix byssoidea</i>	14620	Ratelgat, Namibia

Aride Habitate sind durch hohe Tagestemperaturen und potentielle Evaporationsraten, die den Niederschlag übersteigen, charakterisiert. Dadurch bedingt herrschen meist sehr niedrige Luftfeuchtigkeiten.

Trichocoleus sociatus 92.2 stammte aus dem Wüstenboden in Nizzana (Israel), wurde am 18.10.1991 durch Prof. Büdel isoliert und im Dezember 1991 in die Stammkultur der Ökologie aufgenommen. Nizzana liegt im Norden Israels und somit im Übergangsbereich von einem

mediterranen- zum Wüstenklima. Dieses Gebiet zeichnet sich durch heiße, trockene Sommer und feuchte, milde Winter aus. Der pH-Wert des Bodens liegt zwischen pH 6,8 und pH 9,7 (Breckle et al. 2008). *Trichocoleus sociatus* zeichnet sich durch einen bei hoher Luftfeuchtigkeit turgeszenten Gaswechsel aus. Der Stamm wächst filamentös und ist von einer dünnen EPS-Hülle umgeben. *Trichocoleus sociatus* bildet keine Heterocyten und kommt häufig im Boden vor. Darüber hinaus ist zu diesem Stamm bislang sehr wenig bekannt.

Nostoc muscorum 90.3 stammt aus Bodenproben von Columbia (USA). In die Kultursammlung von Prof. Büdel aufgenommen wurde *Nostoc muscorum* im Januar 1990 und erstmals isoliert am 01.01.1930 (Allison et al. 1936). Der Stamm ist identisch mit dem Stamm PCC 7906 (Pasteur Culture Collection) und LCC 1453/12 (Labatt Culture Collection). *Nostoc muscorum* wächst filamentös und besiedelt zahlreiche verschiedene ökologische Nischen. So kommt das Cyanobakterium sowohl terrestrisch als auch aquatisch vor und ist dadurch kosmopolitisch verbreitet (Blumwald&Tel-Or 1982). Auf Grund der zellulären Beschaffenheit und der Fähigkeit zur metabolischen Anpassung an verschiedene Umgebungsbedingungen kann *Nostoc muscorum* sehr unterschiedliche Ökosysteme besiedeln. Dazu gehören beispielsweise heiße Quellen, die Arktis, Antarktis und der Wüstenboden. Am weitesten ist *Nostoc muscorum* jedoch als terrestrisches Cyanobakterium verbreitet (Dodds et al. 1995). Der optimale, organismusspezifische pH-Wert wird zwischen pH 7 und pH 8,5 beschrieben, mit einer unteren Grenze bei pH 5,7 (Allison et al. 1936). Ein Unterschied zu *Trichocoleus sociatus* besteht vor allem durch die potentielle Fixierung von Luftstickstoff (diazotroph), die in den Heterocyten stattfindet. Des Weiteren produziert *Nostoc muscorum* Cyanovirin-N eine antivirale Substanz mit nachgewiesener bioaktiver Wirkung gegen den HI-Virus (Bewley et al. 1998). Abbildung 46 zeigt mikroskopische Aufnahmen der verwendeten Organismen.

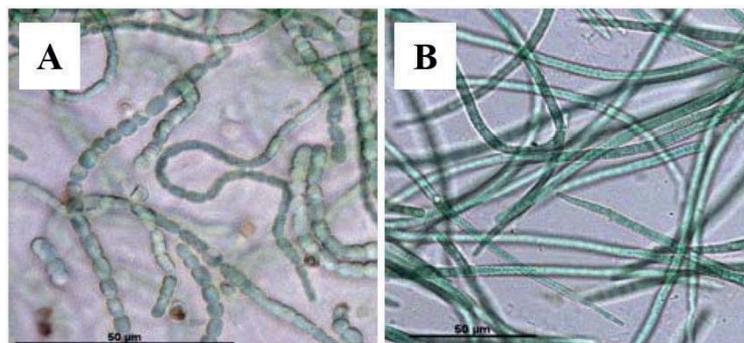


Abbildung 46: Mikroskopische Aufnahmen der zwei verwendeten terrestrischen Cyanobakterien. **A** *Nostoc muscorum*; **B** *Trichocoleus (Microcoleus) sociatus*



3.5 Untersuchung und Optimierung der wesentlichen Wachstumsfaktoren

Die Auswirkung der in Kapitel 3 dargestellten Faktoren auf die Wachstumsrate von *T. sociatus* und *N. muscorum* wurde nach dem „One factor at a time“-Prinzip untersucht. Die Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

3.5.1 Untersuchung des Leistungseintrages

Die Untersuchung des Leistungseintrages ist besonders wichtig, um verschiedene Kultivierungssysteme vergleichen und die jeweilige Durchmischung bewerten zu können. Dadurch, dass Nährstoffe diffusiv aus dem Kulturmedium in die Zelle aufgenommen werden, hat die Mischgüte einen direkten Effekt auf die Wachstumsrate. Darüber hinaus unterscheiden sich die Arten des Leistungseintrages je nach Kultivierungssystem, genauso, wie die organismusspezifischen Ansprüche an eine Durchmischung während der Kultivierung. Während die meistens Grünalgen (z.B. *Chlorella* und *Chlamydomonas*) sehr robust sind, sind gerade fadenförmig wachsende Organismen scherstressempfindlich (Smith et al. 1990, Eriksen 2008). Es ist daher wichtig, sowohl die Größe des Leistungseintrages als auch die Art des Leistungseintrages eines Kultivierungssystems hinsichtlich des Einflusses auf das Wachstum zu untersuchen.

Um den Einfluss des Leistungseintrages auf das Wachstum von *T. sociatus* und *N. muscorum* zu bestimmen, wurden die Cyanobakterien in drei unterschiedlichen Bioreaktionssystemen bei unterschiedlichen Leistungseinträgen kultiviert. Alle Wachstumsfaktoren außer dem Leistungseintrag waren, soweit möglich, bei den Versuchen identisch und sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Zusammensetzung des verwendeten Kulturmediums BG 11 ist im Anhang D.2.1 beschrieben.

Tabelle 6: Parameter der Versuche zur Bestimmung des Einflusses des Leistungseintrages auf die Wachstumsrate.

Zeit [d]	Temperatur [°C]	Licht [$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	Medium	pH-Wert [-]
7	24	100	BG 11	7

Niedrige Leistungseinträge von $0\text{-}100 \text{ W m}^{-3}$ wurden in einer Knie-Apparatur untersucht und durch verschiedene Begasungsraten eingestellt. So entsprach eine Begasung von $0,3 \text{ vvm}$ einem Leistungseintrag von $14,7 \text{ W m}^{-3}$, eine Begasungsrate von $0,7 \text{ vvm}$ einem Leistungseintrag von

29,4 W m⁻³ und eine Begasungsrate von 1,6 vvm einem Leistungseintrag von 70,6 W m⁻³. Mittlere Leistungseinträge von 100 bis 1000 W m⁻³ wurden in Schüttelkolben mit einer Nenngröße von 500 mL untersucht und durch Variation des Füllvolumens und der Schüttelfrequenz erreicht. Die Leistungseinträge lagen bei 358 W m⁻³ bei 50 mL / 90 rpm, 429 W m⁻³ bei 150 mL / 120 rpm und 858 W m⁻³ bei 50 mL und 120 rpm. Der insgesamt größte Leistungseintrag von 1500 W m⁻³ wurde in einem Rührreaktor untersucht bei einer Drehzahl von 150 rpm und einer Begasungsrate von 1 vvm bei der Verwendung von einem Liter Kulturmedium. Die Leistungseinträge wurden anhand von Formel 20 (Rührkessel), Formel 21 (Blasensäule), sowie Formel 22 und Formel 23 (Schüttelkolben) berechnet und sind inkl. ihrem Gültigkeitsbereich im Anhang A.1.1 dargestellt. Da eine Bestimmung der Biomasse während der Kultivierung aufgrund der technischen Gegebenheiten und des fädigen Wachstums der Cyanobakterien nicht möglich war, wurde eine Differenz aus der Startbiomasse und der Biomasse am Ende des Versuches gebildet und die durchschnittliche Wachstumsrate μ daraus berechnet.

Die Ergebnisse für *T. sociatus* sind in Abbildung 47 dargestellt. Die niedrigsten Wachstumsraten im Vergleich wurden in Schüttelkolben im Bereich der mittleren Leistungseinträge ermittelt. Das Minimum liegt bei einem Wachstum von 0,0064 d⁻¹ bei einem Leistungseintrag von 358 W m⁻³. Die höchste Wachstumsrate wurde im Rührreaktor bei dem höchsten Leistungseintrag bestimmt und liegt bei 0,109 d⁻¹. Die höchste Wachstumsrate in der Kniese-Apparatur liegt bei 0,08 d⁻¹ und einem Leistungseintrag von 29 W m⁻³. Bezogen auf das Wachstum pro Leistungseintrag ist dies der höchste Wert.

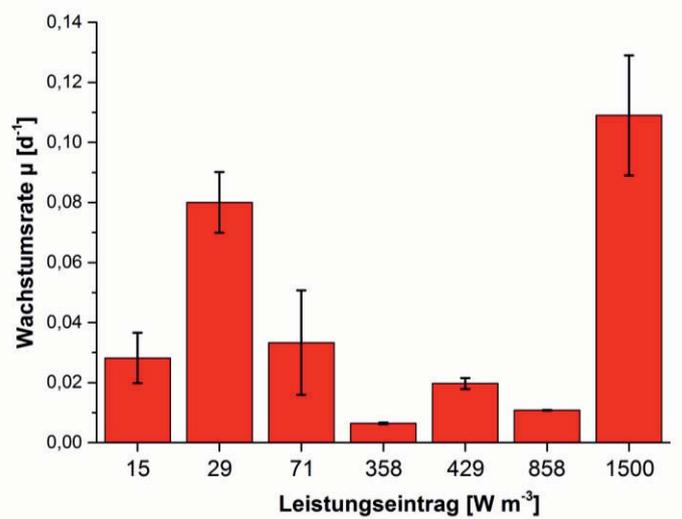


Abbildung 47: Vergleich der Wachstumsraten von *T. sociatus* bei verschiedenen Leistungseinträgen. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in verschiedenen Bioreaktorsystemen durchgeführt.

Die Ergebnisse für *N. muscorum* sind in Abbildung 48 dargestellt. Auch für diesen Organismus wurden die niedrigsten Wachstumsraten im mittleren Bereich des Leistungseintrages ermittelt und die höchsten im Rührreaktor bei dem höchsten Leistungseintrag. Das Minimum liegt bei 0,0046 d^{-1} bei einem Leistungseintrag von 358 W m^{-3} und das Maximum liegt bei 0,32 d^{-1} bei 1500 W m^{-3} . Die höchste Wachstumsrate in der Kniese-Apparatur liegt bei 0,12 d^{-1} und entspricht damit einem Drittel des maximalen Wertes, bei einem 1/20 des Leistungseintrages. Wie bei *T. sociatus* ist die Kniese-Apparatur, bezogen auf das Wachstum pro Leistungseintrag, das effizienteste Bioreaktorsystem.

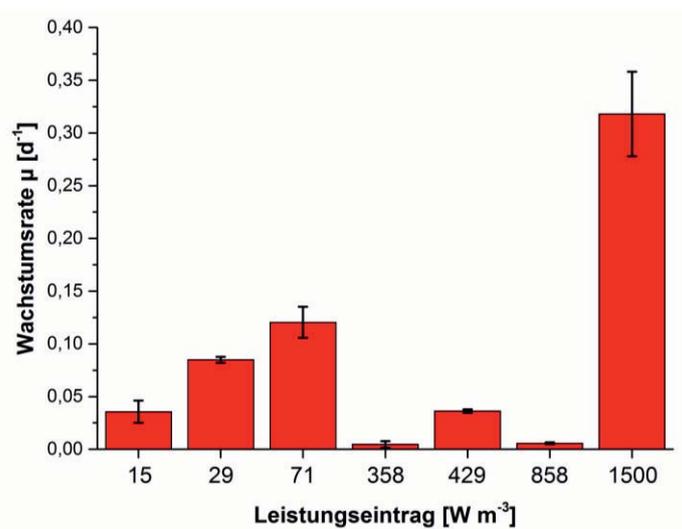


Abbildung 48: Vergleich der Wachstumsraten von *N. muscorum* bei verschiedenen Leistungseinträgen. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in verschiedenen Bioreaktorsystemen durchgeführt.

Der Leistungseintrag und der mechanische Stress während einer Kultivierung haben Einfluss auf die Wachstumsraten von Cyanobakterien. Organismusspezifisch wurden daher verschiedene Optima erwartet, da die Toleranz gegen mechanischen Stress bei jedem Organismus unterschiedlich ist. Ein hoher Leistungseintrag korreliert vereinfacht bis zu einem gewissen Punkt mit einem hohen Gasaustausch und einer guten Durchmischung, wodurch eine gute Versorgung mit Nährstoffen erreicht werden kann. Dabei spielen auch Phänomene wie Blasenkoaleszenz, Verweilzeit und Rührerüberflutung eine Rolle, die diesen Effekt je nach Reaktorsystem z.T. stark vermindern und ihm entgegen wirken können. Dementsprechend gibt es für jeden Organismus ein bestimmtes Optimum, an dem die Nährstoffversorgung und der Gasaustausch durch den Leistungseintrag in das System maximal sind. Nach diesem Optimum treten bei einer weiteren Erhöhung des Leistungseintrages mechanische Schädigungen der Zellen auf, oder der zunächst positive Effekt ist rückläufig, während bei einem geringeren Leistungseintrag der Gasaustausch der limitierende Faktor ist. Diese Zusammenhänge wurden bereits eingehend am Beispiel der Grünalgen *Phaeodactylum tricornutum* und *Porphyridium cruentum* beschrieben (Sobczuk et al. 2006). Grundsätzlich konnten diese Erwartungen durch die experimentellen Daten bestätigt werden, wobei jedoch teilweise signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Kultivierungssystemen festgestellt wurden. Obwohl das System mit dem größten Leistungseintrag (Rührreaktor) auch die größten Wachstumsraten zeigte, konnten die zweithöchsten im System mit den niedrigsten Leistungseinträgen gefunden werden (Kniese-Apparatur), während die Leistungseinträge im Schüttelkolben im Schnitt zehnmal so hoch waren. Dies liegt daran, dass das Oberflächen- zu Volumenverhältnis beider Systeme sehr unterschiedlich ist. In einem Schüttelkolben kann der Gasaustausch nur an der Oberfläche des rotierenden Parabolids stattfinden, wodurch nur kleine k_{LA} -Werte möglich sind. Durch hohe Gasleerrohrgeschwindigkeiten kann der Gasaustausch in der Kniese-Apparatur im Vergleich deutlich verbessert werden. So können in Blasensäulen k_{LA} -Werte von 50 bis 1000 h^{-1} erreicht werden (RÖMPP 2015). Auch in kleinen Blasensäulen (100-200 mL) wurden bereits k_{LA} -Werte von 576 h^{-1} beschrieben (Weuster-Botz et al. 2001), während typische k_{LA} -Werte für Schüttelkolben zwischen 8 und 200 h^{-1} liegen. Dies wird durch die Abschätzung der k_{LA} -Werte anhand der Formeln im Anhang A.1.2 bestätigt. Die k_{LA} -Werte lagen für die Versuche mit Schüttelkolben, berechnet durch Formel 30, zwischen 6,1 (150 mL, 120 rpm) und 15,25 h^{-1} (50 mL, 120 rpm) bezogen auf CO_2 . Für 50 mL und 90 rpm wurde ein k_{LA} -Wert von 11,9 h^{-1} berechnet. Eine Abschätzung der k_{LA} -Werte in der Blasensäule ergab anhand von Formel 29 k_{LA} -Werte von 10,8 h^{-1} (0,3vvm), 18 h^{-1} (0,7 vvm) und 36 h^{-1} (1,6 vvm). Im Rührreaktor wurde unter den genannten Versuchsbedingungen experimentell ein k_{LA} -Wert von 15,25 h^{-1} bestimmt



und entspricht somit exakt dem abgeschätzten k_{LA} -Wert im Schüttelkolben mit 50 mL und 120 rpm. In Produktionsbioreaktoren liegen typische k_{LA} -Werte nach Doran zwischen 72 h^{-1} und 900 h^{-1} (Doran 1995). Der k_{LA} -Wert wird vor allem von der Dispergierwirkung des Rührers beeinflusst. Hierbei ist die Größe der Gasblasen entscheidend und beeinflusst die spezifische Phasengrenzfläche. Durch die Erzeugung von kleineren Blasen, kann die spezifische Phasengrenzfläche erhöht und dadurch eine Steigerung des k_{LA} -Wertes erzielt werden (Hass&Pörtner 2009). Die Abweichung zu den Literaturwerten ist dadurch zu erklären, dass in den beschriebenen Versuchen lediglich mit 150 rpm gerührt wurde, um den Scherstress für die fadenförmig wachsenden Cyanobakterien gering zu halten. Darüber hinaus unterscheidet sich auch die Reaktorgeometrie des verwendeten Bioreaktors deutlich in Bezug auf die Höhe der Flüssigkeit bzw. des Mediums von Produktionsbioreaktoren. Je höher der Füllstand im Inneren des Reaktors ist, desto länger ist auch die Verweilzeit des Gases im Medium und desto besser ist der Stoffübergang, bis die Konzentration an O_2 in der Gasblase erschöpft ist. Bei großen Reaktoren kann sich, aufgrund des erhöhten Druckes durch die Wassersäule, deutlich mehr O_2 lösen. Durch diese Faktoren konnte lediglich ein Sechstel des ansonsten üblichen k_{LA} -Wertes experimentell bestimmt werden. Der Rührreaktor ist der Kniese-Apparatur sehr ähnlich was die Art der Begasung angeht. Diese findet in beiden Systemen von unten durch die Kultursuspension statt. Darüber hinaus findet im Rührreaktor eine Dispergierung der Blasen statt, wodurch die Blasen vom Volumen verkleinert werden, aber ihre Oberfläche für einen Gasaustausch vergrößert wird. Obwohl der mechanische Stress für die Zellen dadurch vergrößert wird, ist der positive Effekt durch den verbesserten Gasaustausch größer. Durch die Verwendung von anderen Rührern kann das submerse Wachstum von Cyanobakterien potentiell weiter verbessert werden. Generell ist zu beachten, dass die dargestellten Leistungseinträge Annäherungen aufgrund von entsprechenden Veröffentlichungen sind, die die gleichen oder sehr ähnlichen Systeme hinsichtlich des Leistungseintrages charakterisiert haben. Wirklich exakte Werte für den Leistungseintrag sind nur durch eine Messung unter Versuchsbedingungen am jeweiligen System zu bestimmen. Dies war während dieser Arbeit technisch nicht möglich, weshalb auf die zitierten Literaturdaten zu einer Abschätzung des Leistungseintrages zurückgegriffen wurde.

3.5.2 Untersuchung des pH-Wertes

Der pH-Wert ist ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf das Wachstum von Organismen. Sein Optimum ist dabei von Organismus zu Organismus unterschiedlich, basierend auf den verschiedenen Habitaten. Um das Optimum von *T. sociatus* und *N. muscorum* zu ermitteln, wurden entsprechende Versuche in Schüttelkolben als Schlachtkolben-Versuche durchgeführt

und jeweils die Wachstumsrate in Abhängigkeit von dem pH-Wert bestimmt. Die Parameter der Versuche sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Parameter der Versuche zur Bestimmung der optimalen pH-Werte von *T. sociatus* und *N. muscorum*.

Zeit	Temperatur	Kolben	Füllmenge	P/V	k_{La}	Licht	Drehzahl
[d]	[°C]	[mL]	[mL]	[W m ⁻³]	[h ⁻¹]	[$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	[rpm]
7	24	300	50	100	15,25	100	120

Die Wachstumsraten in Abhängigkeit von dem pH-Wert bei *T. sociatus* sind in Abbildung 49 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass *T. sociatus* in einem breiten pH-Bereich wächst, sein Optimum jedoch bei pH 8 liegt, wo eine Wachstumsrate von 0,014 h⁻¹ ermittelt wurde. Die minimale Wachstumsrate von 0,005 h⁻¹ wurde bei pH 4 bestimmt. Unter pH 4 und über pH 11 konnte kein Wachstum mehr festgestellt werden. Die Zellen aus diesen Versuchen waren jeweils nach wenigen Tagen abgestorben, wodurch keine Wachstumsraten erfasst wurden.

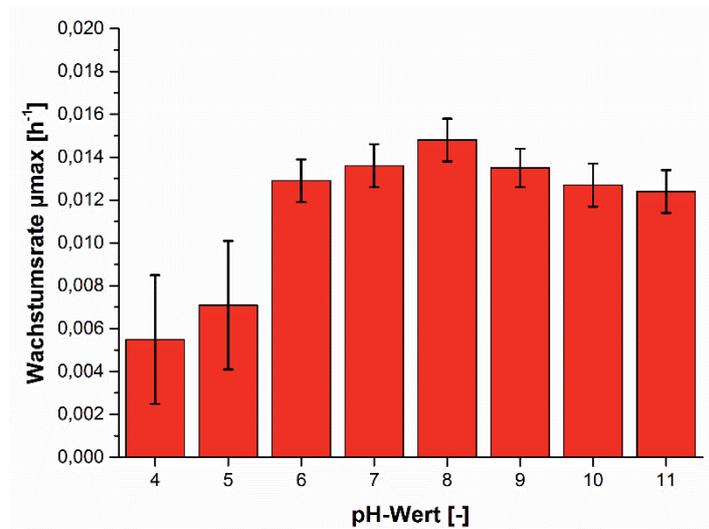


Abbildung 49: Vergleich der Wachstumsraten von *T. sociatus* bei verschiedenen pH-Werten. Die Experimente wurden bei 24 °C, 120 rpm, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 50 mL durchgeführt.

Die Wachstumsraten bei verschiedenen pH-Werten von *N. muscorum* sind in Abbildung 50 dargestellt. Wie auch *T. sociatus* kann *N. muscorum* in einem großen pH-Bereich wachsen, sein Optimum (0,0148 h⁻¹) wurde jedoch bei pH 6 ermittelt. Die minimale Wachstumsrate liegt bei pH 4 (0,0055 h⁻¹), und genau wie bei *T. sociatus* wurde unter pH 4 und über pH 11 kein Wachstum mehr festgestellt. Auffällig ist, dass bei beiden Cyanobakterien der optimale pH-Wert von dem pH-Wert des standardisierten Kulturmediums BG 11 abweicht.

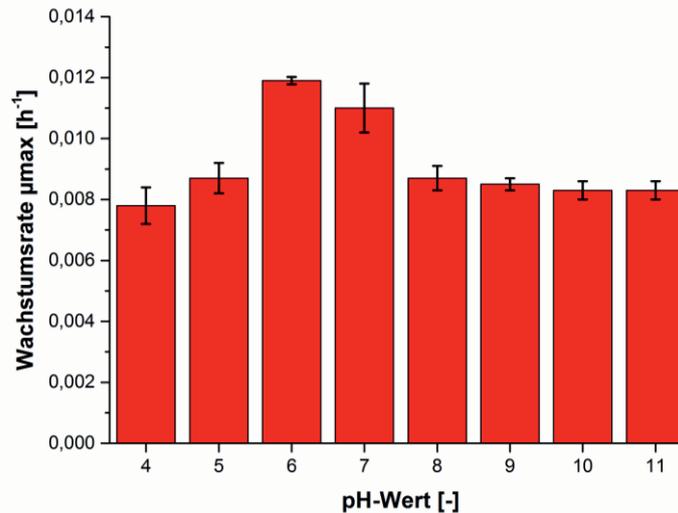


Abbildung 50: Vergleich der Wachstumsraten von *N. muscorum* bei verschiedenen pH-Werten. Die Experimente wurden bei 24 °C, 120 rpm, einer Lichtstärke von 100 $\mu E m^{-2} s^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 50 mL durchgeführt.

Aufgrund des ursprünglichen Habitates wurde erwartet, dass jeder Organismus ein spezifisches pH-Optimum ausweist, welches sich von pH 7 des BG 11 Mediums unterscheidet. Des Weiteren wurde erwartet, dass die Wachstumsraten an diesem pH-Optimum jeweils höher sind und somit durch die Optimierung des pH-Wertes eine Optimierung der Kultivierung erreicht werden kann. *T. sociatus* stammt aus einer trockenen Wüstengegend im Norden von Israel, wo im Boden typischerweise ein pH-Wert von 6,8 bis 9,7 gemessen wird (Breckle et al. 2008). Daher wurde ein pH-Optimum in diesem Bereich erwartet und durch die Versuche bei pH 8 bestätigt. Das pH-Optimum von *N. muscorum* wurde bereits untersucht und liegt laut Literatur zwischen 7 und 8,5 (Allison et al. 1936, Sand-Jensen&Jespersen 2012). Dies konnte durch diese Arbeit nicht bestätigt werden, da hier ein Optimum bei pH 6 ermittelt wurde. Der Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass *N. muscorum* ein kosmopolitisches und sehr anpassungsfähiges Cyanobakterium ist (Allison et al. 1936, Sand-Jensen&Jespersen 2012), was zu Unterschieden zwischen verschiedenen Stämmen führen kann (Blumwald&Tel-Or 1982). Bei beiden Stämmen wurde die niedrigste Wachstumsrate bei pH 4-5 bestimmt. Dies ist dadurch zu erklären, dass während der Lichtreaktion die Aufnahme von Phosphat Na^+ -und/ oder K^+ -abhängig ist (Avendaño&Valiente 1994). Deswegen kommt es bei einem Mangel an Natrium- oder Kalium-Ionen im Medium (bei sauren pH-Werten und pH-Werten über pH 8) zu einer Reduzierung der Phosphataufnahme. Phosphat wird bei einem Phosphatüberschuss (z.B. während der Vorkultivierung) in sogenannten „Polyphosphat bodies“ gespeichert (Richmond 2008). Aus diesem Grund reagieren die Mikroorganismen erst einige Stunden nach dem Einsetzen des Phosphatmangels, oder eines Mangels an Natrium oder Kalium, mit einer

Reduzierung der Wachstumsrate, was ein Grund für die relativ hohen Standardabweichungen unter diesen Bedingungen ist.

Im Durchschnitt konnten die Wachstumsraten durch eine Optimierung des pH-Wertes um 8,5 % erhöht werden. Der größte Effekt wurde bei *T. sociatus* ermittelt, wo die Wachstumsrate um 9 % gesteigert werden konnte. Dies zeigt das hohe Potential einer pH-Optimierung, um Wachstumsraten für Produktionsprozesse zu steigern.

3.5.3 Untersuchung der Temperatur

Neben dem pH-Wert ist die Temperatur ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf das Wachstum von Organismen, dessen Optimum genauso je nach Lebensraum organismusspezifisch ist. Um die optimale Temperatur für das Wachstum von *T. sociatus* und *N. muscorum* zu bestimmen, wurden Versuche auf Agarplatten durchgeführt und mit Hilfe einer Imaging-PAM hinsichtlich der maximalen Wachstumsrate μ_{max} analysiert. Die Parameter der Versuche sind in Tabelle 8 dargestellt. Es wurde der jeweils optimale pH-Wert (vgl. Kapitel 3.5.2) verwendet.

Tabelle 8: Parameter der Versuche zur Bestimmung der optimalen Temperatur von *T. sociatus* und *N. muscorum*.

Zeit [d]	Temperatur [°C]	Licht [$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	Medium	pH-Wert [-]
35	17, 24, 30, 38	100	BG 11	6 <i>N. muscorum</i> 8 <i>T. sociatus</i>

Die Ergebnisse der Versuche mit *T. sociatus* sind in Abbildung 51 dargestellt. Das Optimum wurde mit einer Wachstumsrate von $0,018 \text{ h}^{-1}$ bei 30°C ermittelt. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 38°C lieferte die insgesamt geringste Wachstumsrate von $0,004 \text{ h}^{-1}$. Auch bei einer Absenkung der Temperatur unter 30°C nimmt die Wachstumsrate ab und liegt bei 24°C bei $0,008 \text{ h}^{-1}$ und bei 17°C bei $0,006 \text{ h}^{-1}$.

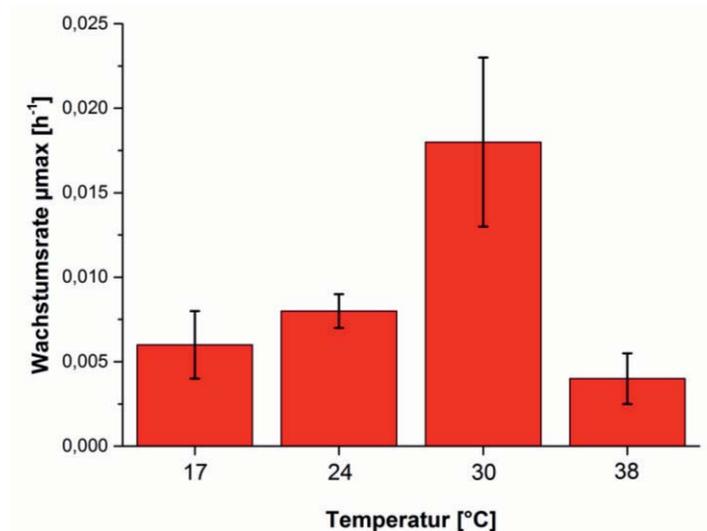


Abbildung 51: Vergleich der Wachstumsraten von *T. sociatus* bei verschiedenen Temperaturen auf Agarplatten. Die Experimente wurden bei Temperaturen zwischen 17 und 38 °C, einer Lichtstärke von $100 \mu E m^{-2} s^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium mit Agar mit pH 8, über einen Zeitraum von 31 Tagen, in Petrischalen durchgeführt.

Die Ergebnisse von *N. muscorum* sind in Abbildung 52 dargestellt. Bei diesem Cyanobakterium konnte kein eindeutiges Optimum bestimmt werden. Bei 24 °C und 30 °C konnte jeweils die gleiche maximale Wachstumsrate von $0,012 h^{-1}$ bestimmt werden. Mit einer Erhöhung über 30 °C oder einer Verringerung unter 24 °C nahm die Wachstumsrate deutlich ab. Bei 17 °C wurde eine maximale Wachstumsrate von $0,006 h^{-1}$ ermittelt und bei 38 °C $0,004 h^{-1}$.

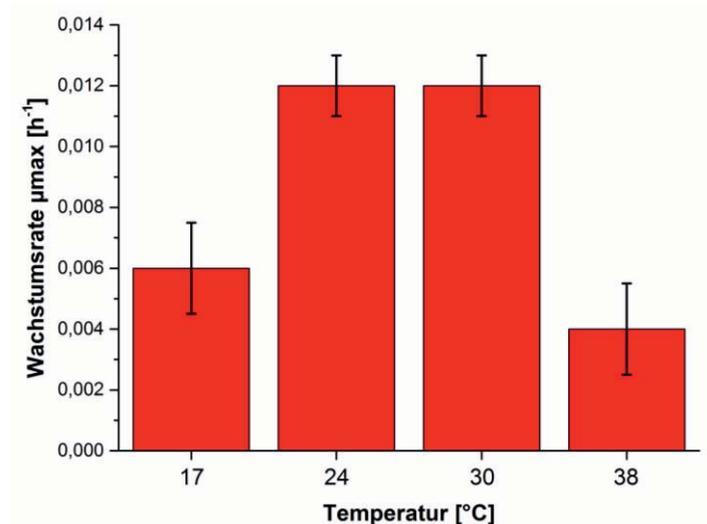


Abbildung 52: Vergleich der Wachstumsraten von *N. muscorum* bei verschiedenen Temperaturen auf Agarplatten. Die Experimente wurden bei Temperaturen zwischen 17 und 38 °C, einer Lichtstärke von $100 \mu E m^{-2} s^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium mit Agar mit pH 6, über einen Zeitraum von 31 Tagen, in Petrischalen durchgeführt.

Da alle enzymatischen Reaktionen stark temperaturabhängig sind (Richter 1998) und bei der Photosynthese sowie dem Stoffwechsel der Cyanobakterien eine Vielzahl von enzymatischen Reaktion beteiligt sind, wurde erwartet, dass die Temperatur einen Einfluss auf die maximale

Wachstumsrate hat und diese bei einer bestimmten Temperatur ein Optimum aufweist (Housman et al. 2006). Auf Grund der unterschiedlichen Herkunftsorte der Organismen wird weiterhin davon ausgegangen, dass das Temperaturoptimum, ebenso wie der pH-Wert, organismusspezifisch ist.

T. sociatus stammt aus der Wüste im Norden Israels (Nizzana). Diese Region ist gekennzeichnet durch heiße, trockene Sommer und feuchte, milde Winter. Die Temperaturen liegen tagsüber im Schnitt zwischen 20 °C und 32 °C und nachts zwischen 15 °C und 25 °C. Es wird daher ein entsprechendes Temperaturoptimum zwischen 20 °C und 30 °C erwartet. Weiterhin wird erwartet, dass Temperaturen über 30 °C und unter 20 °C zwar toleriert werden, das Wachstum jedoch deutlich geringer ist. *T. sociatus* zeigte die maximale Wachstumsrate von 0,018 h⁻¹ bei 30 °C und die zweithöchste Wachstumsrate bei 24 °C. Da eine Erhöhung über 30 °C sowie eine Verringerung der Temperatur unter 24 °C zu deutlich geringeren Wachstumsraten führte, wurden die Erwartungen bestätigt. *N. muscorum* stammt aus Columbia, USA. Da es sich bei diesem Stamm um ein sehr anpassungsfähiges, terrestrisches Cyanobakterium handelt und die optimale Temperatur für Cyanobakterien zwischen 25 °C und 40 °C liegt (Reynolds 1984), ist davon auszugehen, dass das Temperaturoptimum ebenfalls in diesem Bereich liegt, obwohl es keine direkten Angaben zum Klima des eigentlichen Habitats gibt. *N. muscorum* wies die höchsten maximalen Wachstumsraten (0,012 h⁻¹) bei 24 °C und 30 °C auf. Die Erwartungen konnten somit bestätigt werden. Bisher gibt es nur wenige Veröffentlichungen, die sich mit dem Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von Cyanobakterien befassen (Tang&Vincent 1999), und diese fokussieren auf aquatische Cyanobakterien, deren Toxine und Temperaturextreme (Castenholz 1969, Mur et al. 1999, Coles&Jones 2000). Darüber hinaus wurden hauptsächlich die Temperaturoptima für die Produktion verschiedener biotechnologischer Wertstoffe untersucht. So liegt z.B. das Temperaturoptimum für die Wasserstoffproduktion mit *N. muscorum* bei 22 °C (Ernst et al. 1979). Dies lässt jedoch keine unmittelbaren Rückschlüsse auf das Temperaturoptimum für das Wachstum zu.

Bei Cyanobakterien zeigten sich bei 17 °C und bei 37 °C geringere Wachstumsraten. Bei Temperaturen unter 20 °C laufen die enzymatischen Reaktionen langsamer ab, und bei Temperaturen über 30 °C kann es zu Schädigungen des Photosyntheseapparats kommen. Bei einer weiteren Erhöhung der Temperatur kommt es dann zu einer Denaturierung von Proteinen und nachhaltigen Schädigungen der Zellen (Richter 1998). Darüber hinaus kommt es bei hohen Temperaturen verstärkt zur Ausbildung einer EPS-Schutzschicht, um die Zellen vor



Austrocknung zu schützen. So werden Metabolite für die Bildung von EPS verwendet und nicht länger für die Biomassebildung. Des Weiteren verdunstet durch die erhöhten Temperaturen mehr Feuchtigkeit aus den Platten, wodurch sich die Nährstoffverfügbarkeit und die Versorgung mit Wasser ändern, was sich negativ auf die Wachstumsrate auswirkt (Chen et al. 2011).

Aus diesem Grund findet die Stammhaltung der Cyanobakterien bei Temperaturen weit unter 20 °C statt, da die Zellen so nicht geschädigt werden und das Wachstum deutlich verlangsamt wird. Da bereits kleine Unterschiede der Temperatur einen großen Einfluss auf das Wachstum haben können (Schlösser 1966), sollte bei weiteren Untersuchungen der Bereich zwischen 24 °C und 30 °C betrachtet werden, um das Temperaturoptimum weiter eingrenzen zu können.

3.5.4 Untersuchung der Lichtstärke

Der Einfluss der Lichtstärke auf die Wachstumsrate der terrestrischen Cyanobakterien *T. sociatus* und *N. muscorum* wurde in Schüttelkolben untersucht. Die Experimente wurden als Schlachtkolben-Versuche durchgeführt, um nicht nur das durchschnittliche Wachstum μ , sondern die maximale Wachstumsrate μ_{\max} bestimmen zu können. Die Parameter der Versuche sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Parameter der Versuche zur Bestimmung der optimalen Lichtstärke von *T. sociatus* und *N. muscorum*.

Zeit	Temperatur	Kolben	Füllmenge	P/V	k_{La}	Licht	Drehzahl
[d]	[°C]	[mL]	[mL]	[W m ⁻³]	[h ⁻¹]	[$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	[rpm]
7	24	300	50	100	15,25	50, 70, 100	120

Darüber hinaus wurde die Elektronentransportrate ETR von *N. muscorum* exemplarisch mit Hilfe einer Imaging-PAM untersucht, um zu bestimmen, ob bereits bei der maximal möglichen Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Schüttelkolben die Lichtsättigung erreicht wird.

Die maximalen Wachstumsraten der beiden Cyanobakterien bei 50, 70 und 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sind in Abbildung 53 dargestellt. Bei *N. muscorum* traten bei 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ derart große Schwankungen der Biomasse auf, dass eine Bestimmung von μ_{\max} nicht möglich war. Bei beiden Stämmen ist zu erkennen, dass die größte Lichtstärke (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) auch die größte maximale Wachstumsrate liefert. Diese ist bei geringeren Lichtstärken (50/70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) jeweils deutlich geringer. Bei *T. sociatus* liegt das Optimum bei 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und 0,01 h⁻¹ und bei *N. muscorum* bei der gleichen Lichtstärke und 0,007 h⁻¹.

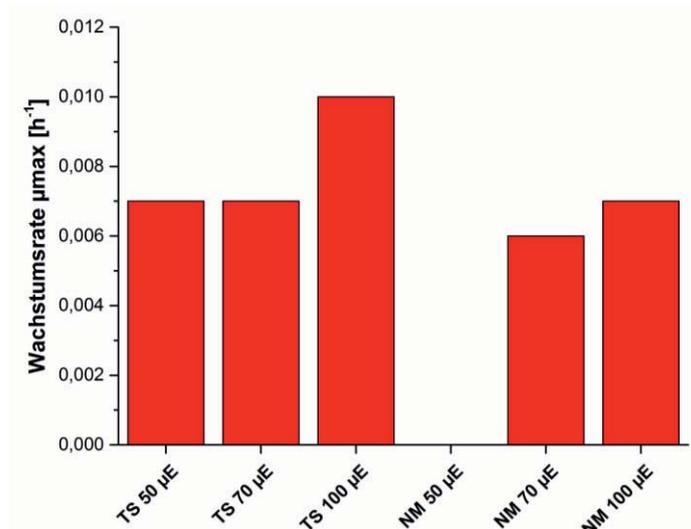


Abbildung 53: Vergleich der Wachstumsraten von *T. sociatus* (TS) und *N. muscorum* (NM) bei verschiedenen Lichtstärken. Die Experimente wurden bei 24 °C, 120 rpm, einer Lichtstärke von 50 bis 100 μE m⁻² s⁻¹, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 50 mL durchgeführt.

Die Ergebnisse zur Bestimmung der ETR in Abhängigkeit von der Lichtstärke bei *N. muscorum* sind in Abbildung 54 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Elektronentransportrate ihr Maximum von 31 μE m⁻² s⁻¹ bei einer Lichtstärke von ca. 700 μE m⁻² s⁻¹ erreicht. Ab ca. 750 μE m⁻² s⁻¹ ist die Lichtsättigung überschritten und die ETR nimmt ab. Bis zu einer Lichtstärke von 350 μE m⁻² s⁻¹ ist der Anstieg der ETR noch linear und geht dann langsam in die bereits genannte Lichtsättigung über (vgl. Abbildung 3).

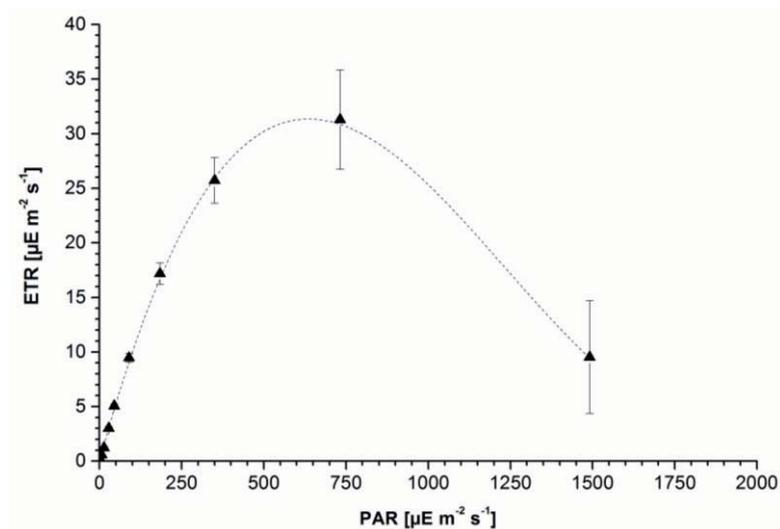


Abbildung 54: Verlauf der Elektronentransportrate (ETR) in Abhängigkeit von der Lichtstärke (PAR) am Beispiel von *N. muscorum*.

Aufgrund von Abbildung 3 wurde erwartet, dass die Photosyntheseleistung und somit auch die maximale Wachstumsrate der Cyanobakterien mit der Lichtstärke bis zu einem Optimum zunimmt. Ab diesem Optimum sollte eine weitere Erhöhung der Lichtstärke zu einer Abnahme



der maximalen Wachstumsrate aufgrund von Zellschäden führen. Diese Erwartungen konnten für beide Stämme erfüllt werden, da die maximalen Wachstumsraten mit steigender Lichtstärke zunahmen. Durch eine Erhöhung der Lichtstärke von 50 auf 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nahm die maximale Wachstumsrate von *T. sociatus* von 0,007 auf 0,01 h^{-1} zu. Dies entspricht einer Steigerung um 43 %. Bei *N. muscorum* führte eine Steigerung der Lichtstärke von 70 auf 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zu einer Steigerung von 0,006 auf 0,007 h^{-1} , was einer Zunahme von 17 % entspricht. Dies konnte bereits von Singh und Kollegen gezeigt werden, die ebenfalls eine Zunahme der Wachstumsrate von *N. muscorum* bei einer Steigerung der Lichtintensität von 10 auf 100 μE beobachtet haben (Singh et al. 2012). Da bei der technisch maximal einstellbaren Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ keine Abnahme der Wachstumsrate zu beobachten war, wurde davon ausgegangen, dass eine Lichtsättigung noch nicht erreicht ist. Weitere Gründe hierfür sind, dass in der Wüste im Norden von Israel, aus der *T. sociatus* isoliert wurde, durchschnittlich eine Lichtstärke von 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ herrscht. Darüber hinaus veröffentlichten Harris und Kollegen bereits, dass die optimale Lichtstärke bei einer submersen Kultivierung zwischen 200 und 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ liegt (Harris 2009). Die daraufhin durchgeführte Untersuchung der Elektronentransportrate von *N. muscorum* zeigte eine Lichtsättigung erst bei ca. 700 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Für *T. sociatus* wird eine Lichtsättigung aufgrund seiner Herkunft in der gleichen Größenordnung erwartet. Sowohl das geringe Wachstum bei 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ als auch das Optimum bei ca. 700 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurde bereits am Beispiel von *N. muscorum* gezeigt (Ohad et al. 2010), so dass die Ergebnisse den Erwartungen entsprechen. Eine konkrete Überprüfung, ob auch die Wachstumsraten bis zu 700 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei beiden Stämmen zunehmen, war technisch nicht durchführbar.

3.5.5 Untersuchung des CO_2 -Gehaltes

Liegt die Lichtintensität im Bereich der Lichtsättigung, so stellt Kohlenstoffdioxid den limitierenden Faktor der Photosynthese dar. Da der Gehalt an CO_2 in der Raumluft von 0,04 % nicht optimal für das Wachstum ist, führt eine Erhöhung der CO_2 -Konzentration zu einer Steigerung der Photosyntheseleistung (Richter 1998). Deswegen wurde der Einfluss von verschiedenen CO_2 -Gehalten in der Zuluft auf die Wachstumsrate submers im beleuchteten Rührreaktor untersucht. Die Parameter der Versuche sind in Tabelle 10 dargestellt. Da eine genaue Bestimmung der Biomasse im Laufe der Kultivierung aufgrund des fädigen Wachstums und der daraus resultierenden Verstopfung der Probennahmeleitung der Organismen nicht unter Wahrung der Sterilität möglich war, wurde die durchschnittliche Wachstumsrate μ aus der Differenz der Biomasse zum Start und am Ende der Fermentation bestimmt. Der k_{LA} -Wert wurde, wie im Anhang A.1 beschrieben, experimentell bestimmt und bezieht sich auf CO_2 .

Tabelle 10: Parameter der Versuche zur Bestimmung des optimalen CO₂-Gehalts für die Kultivierung von *T. sociatus* und *N. muscorum*.

Zeit	Temperatur	CO ₂ -Gehalt	Füllmenge	P/V	k _{La}	Licht	Drehzahl
[d]	[°C]	[%- Vol.]	[mL]	[W m ⁻³]	[h ⁻¹]	[μE m ⁻² s ⁻¹]	[rpm]
7	24	0.03, 2, 5	1000	1500	15,25	110	150

Neben den oben dargestellten Prozessparametern spielt die Löslichkeit von CO₂ eine entscheidende Rolle. Daher wurden die verschiedenen Löslichkeiten von CO₂ in dem verwendeten Medium BG 11, in Abhängigkeit von dem CO₂-Gehalt in der Begasung, berechnet und in Tabelle 11 dargestellt (siehe Anhang A.1). Zusätzlich wurden die gleichen Berechnungen für VE-Wasser durchgeführt und sind ebenfalls in Tabelle 11 vergleichend dargestellt.

Tabelle 11: Löslichkeit von CO₂ in dem verwendeten Medium BG 11 sowie in Deionat zum Vergleich, bei verschiedenen Gehalten von CO₂ in der Begasung. Die Löslichkeit wurde nach (Weisenberger&Schumpe 1996) berechnet.

CO ₂ -Konzentration Begasung	CO ₂ -Konzentration Medium	
	BG11	CO ₂ -Konzentration Deionat
[%]	[mol L ⁻¹]	[mol L ⁻¹]
0,03	0,0103	0,0104
2	0,6790	0,6960
5	1,6990	1,7390

Die Ergebnisse des Einflusses verschiedener CO₂-Gehalte in der Zuluft auf die Wachstumsrate von *T. sociatus* und *N. muscorum* sind in Abbildung 55 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass eine Erhöhung der CO₂-Konzentration von 0,03 %-Vol. auf 2 bzw. 5 %-Vol. zu einer deutlichen Erhöhung der Wachstumsrate bei beiden Stämmen führt. Bei *T. sociatus* liegt das Optimum bei 2 %-Vol. (1,15 d⁻¹) und bei *N. muscorum* bei 5 %-Vol. (0,72 d⁻¹). Die Wachstumsrate konnte so um das 10fache bzw. um das 11fache gesteigert werden.

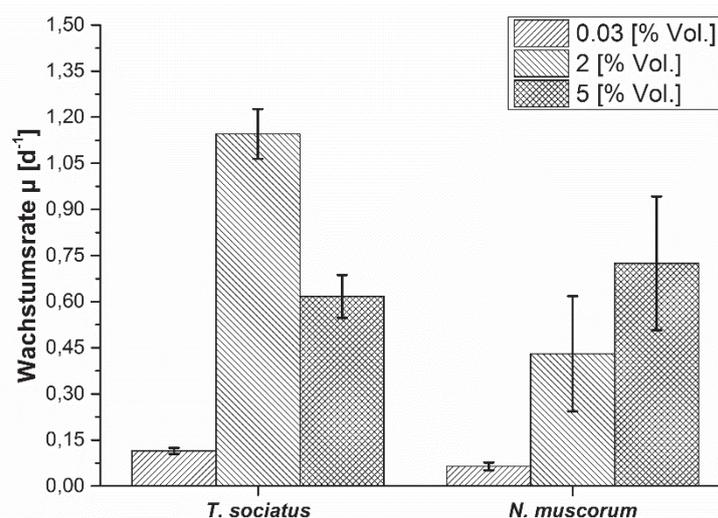


Abbildung 55: Vergleich der Wachstumsraten von *T. sociatus* und *N. muscorum* bei verschiedenen CO₂-Konzentrationen in der Zuluft. Die Experimente wurden bei 24 °C, 150 rpm, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, einem CO₂-Gehalt von 0,03 bis 5 %-Vol., unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in einem Rührreaktor mit einem Füllvolumen von 1 L durchgeführt.

Laut Badger und Kollegen gibt es mehrere Möglichkeiten für Cyanobakterien, CO₂ in die Zelle aufzunehmen (Badger&Price 2003) (vgl. Kapitel 3.3.3.3). Demnach kann CO₂ entweder chemisch gelöst oder physikalisch gelöst in die Zelle gelangen. Durch eigene Vorarbeiten ist bekannt, dass weder *T. sociatus* noch *N. muscorum* ausschließlich chemisch gelöstes CO₂ nutzen können und hohe Konzentrationen von Bikarbonat im Medium sogar zu einem Absterben der Kultur führen. Durch die Zugabe von NaHCO₃ als Bikarbonationenquelle wird die Na⁺-Ionenkonzentration im Medium stark erhöht. Dadurch kann es zu einer Störung des Elektronenflusses der Zelle kommen, wodurch die photosynthetischen Reaktionen gestört werden und so das Wachstum der Zellen beeinträchtigt wird. Darüber hinaus kann es zu einer Störung der Stickstofffixierung (Blumwald&Tel-Or 1982) und des Osmosehaushaltes kommen (Chen et al. 2003). Stehen den Cyanobakterien über einen längeren Zeitraum hauptsächlich Bikarbonationen als C-Quelle zur Verfügung, kommt es zu einer verstärkten Bildung von Bikarbonat-Transportern. Ist das Gegenteil der Fall, werden entsprechend weniger Bikarbonat-Transporter ausgebildet, und die Aufnahme findet hauptsächlich über physikalisch gelöstes CO₂ statt (Moroney et al. 2013). Da somit eine Anpassung an die Umgebung stattfinden kann, haben sich die beiden Cyanobakterien im Laufe der Zeit angepasst (Badger&Price 2003) und höchstwahrscheinlich die Bikarbonat-Transporter aufgrund der terrestrischen Habitate zurückgebildet (Moroney&Ynalvez 2007).

Es wurde also erwartet, dass eine Erhöhung der CO₂-Konzentration in der Zuluft zu einer erhöhten Löslichkeit von CO₂ im Medium führt (Tabelle 11) und somit mehr CO₂ in die Zellen

der Cyanobakterien aufgenommen werden kann. In der Zelle führt ein erhöhter CO₂-Gehalt zu einer Verringerung der Substratlimitierung der RuBisCO. Dadurch können Elektronen von dem PS I auf Sauerstoff übertragen werden, wodurch weniger ROS gebildet und dadurch Zellschädigungen minimiert werden (Stern 2009). Dementsprechend sollte die Wachstumsrate mit steigender CO₂-Konzentration bis zu einem Optimum zunehmen, ab dem eine weitere Erhöhung zu keiner weiteren Verbesserung führt. Diese Erwartungen konnten erfüllt werden, da eine Erhöhung der CO₂-Konzentration zu einer Erhöhung der Wachstumsrate bei beiden Cyanobakterien führte. Die Unterschiede zwischen den Wachstumsraten bei 2 und 5 %-Vol. sind nicht mehr so gravierend wie zwischen 0,03 %- Vol. und dem jeweiligen Optimum. Dies liegt daran, dass bereits eine CO₂-Konzentration von 1 %-Vol. die CO₂-Limitierung der RuBisCO aufhebt (Stern 2009). Gesteigerte Wachstumsraten bei 1 %- Vol. wurden daher schon mehrfach veröffentlicht (Harris 1989, Sultemeyer et al. 1995). Geier und Kollegen zeigten am Beispiel von *Chlamydomonas reinhardtii*, dass die Wachstumsrate bei 3 %-Vol. optimal ist, eine weitere Erhöhung jedoch keinen positiven Effekt hat (Geier 2011). Das gleiche Ergebnis wurde von Ketseoglou und Kollegen für das Cyanobakterium *Anabaena* veröffentlicht (Ketsoglou&Bouwer 2013). Die Ergebnisse erfüllen somit die Erwartungen, wobei die bereits publizierten Arbeiten nahelegen, den Bereich zwischen 1 und 3 %-Vol. noch genauer zu untersuchen, um das jeweilige Optimum noch genauer eingrenzen zu können.

3.6 Modellierung des Wachstums in Abhängigkeit der oben genannten Parameter

In Kapitel 3.5 wurden verschiedene Parameter hinsichtlich ihres Einflusses auf die Wachstumsrate von *T. sociatus* und *N. muscorum* untersucht. Basierend auf diesen Ergebnissen soll nun das Wachstum der Cyanobakterien mathematisch formuliert werden, um durch das resultierende Modell das Wachstum von Cyanobakterien zukünftiger Versuche optimieren zu können.

3.6.1 Mathematische Beschreibung der experimentell bestimmten Daten ohne Berücksichtigung von Interaktionen

Basierend auf den Daten aus Kapitel 3.5 wurde zunächst ein grundlegendes Modell entwickelt, das den Einfluss von der Substratkonzentration, der Temperatur und des pH-Wertes auf die Wachstumsrate beschreibt. Es wurde weiterhin vereinfachend angenommen, dass die genannten Parameter über die Zeit konstant bleiben und sich nicht gegenseitig beeinflussen. Daraus ergibt sich Gleichung (9):



$$\mu = \mu_{max} \cdot f_{Substrat} \cdot f_{Temperatur} \cdot f_{pH} \quad (9)$$

Die Faktoren f_i beschreiben den Einfluss der einzelnen Versuchsparameter auf die Wachstumsrate. Ist der betreffende Versuchsparameter optimal, so ist der entsprechende Faktor $f_i = 1$. Wird durch den Versuchsparameter das Wachstum gänzlich verhindert, so ist der Faktor $f_i = 0$.

Die Photosyntheseleistung setzt sich aus dem photochemischen Reaktionskomplex und einer Reihe enzymatischer Reaktionen zusammen (Richter 1998). Während die photochemischen Prozesse vor allem von der Lichtstärke abhängen, sind die enzymatischen Reaktionen stark temperaturabhängig. Demnach hängt auch die maximale Wachstumsrate von der Temperatur ab, und der entsprechende Einflussfaktor kann über eine Glockenkurve beschrieben werden (Gerber&Span 2008). Mathematisch ergibt sich dadurch für die Temperatur Gleichung (10):

$$f_{Temperatur} = e^{-\left(\frac{T_x - T_{opt}}{A}\right)^2} \quad (10)$$

$T_x =$	Verwendete Temperatur	[°C]
$T_{opt} =$	Organismusspezifische optimale Temperatur	[°C]
$A =$	Peakbreite	[-]

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Wachstumsrate wurde bereits häufig untersucht. Cole und Mitarbeiter beschrieben, dass die Wachstumsrate direkt proportional zur H^+ -Ionenkonzentration ist (Cole et al. 1990). Presser und Mitarbeiter erweiterten diese Annahme in der Hinsicht, dass die Wachstumsrate proportional ist zur Differenz der herrschenden H^+ -Ionenkonzentration und der Konzentration, bei der kein Wachstum möglich ist (Presser et al. 1997):

$$\mu = c \cdot ([H^+]_{max} - [H^+]) \quad (11)$$

$c =$	Proportionalitätskonstante
$[H^+]_{max} =$	H^+ -Ionen-Konzentration bei der kein Wachstum möglich ist
$[H^+] =$	Verwendete H^+ -Ionen-Konzentration

Durch die Annahme, dass $[H^+]_{max} = pH_{min}$ ist, ergibt sich durch Einsetzen in Formel (11) nach (Presser et al. 1997) durch Umformen:

$$\mu = (c \cdot 10^{-pH_{min}}) \cdot \left(\frac{10^{-pH_{min}} - 10^{-pH}}{10^{-pH_{min}}} \right) \quad (12)$$

Durch Gleichsetzen von $c \cdot 10^{-pH_{min}}$ mit μ_{max} und Umformen der Gleichung ergibt sich (Presser et al. 1997):

$$\mu = \mu_{max} \cdot \left(1 - \frac{10^{pH_{min}}}{10^{pH}} \right) \quad (13)$$

Um den gesamten pH-Bereiche zu beschreiben ergibt sich final folgende Gleichung:

$$f_{pH} = \left(1 - \frac{10^{pH_{min}}}{10^{pH}} \right) \cdot \left(1 - \frac{10^{pH}}{10^{pH_{max}}} \right) \quad (14)$$

Zusammengefasst ergibt sich zur Beschreibung der Wirkung von Temperatur und pH-Wert auf die Wachstumsrate Gleichung (15):

$$\mu = \mu_{max} \cdot e^{-1\left(\frac{T_x - T_{opt}}{A}\right)^2} \cdot \left(1 - \frac{10^{pH_{min}}}{10^{pH}} \right) \cdot \left(1 - \frac{10^{pH}}{10^{pH_{max}}} \right) \quad (15)$$

Die Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Substratkonzentration wird durch die Monod-Gleichung (16) beschrieben (Monod 1949, Antranikian 2005):

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_S + S} \quad (16)$$

μ_{max} = maximale Wachstumsrate

S = Konzentration des limitierenden Substrats [g L⁻¹]

K_S = Sättigungskonstante

Da in dieser Arbeit keine Versuche zur Substratlimitierung durchgeführt wurden, konnten für die Sättigungskonstante und die Konzentration des limitierenden Substrats lediglich Annahmen getroffen werden. CO₂ ist zwar ein Substrat, aber die Konzentration bleibt während der Kultivierung konstant. Daher wird davon ausgegangen, dass andere Nährstoffe, wie Phosphat oder Stickstoff, den limitierenden Faktor darstellen, da die experimentellen Daten auf eine klare



Substratlimitierung hinweisen. Für die Berechnung der Wachstumskurve wurde Funktion (17) verwendet:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot e^{-1\left(\frac{T_x - T_{opt}}{A}\right)^2} \cdot \left(1 - \frac{10^{pH_{min}}}{10^{pH}}\right) \cdot \left(1 - \frac{10^{pH}}{10^{pH_{max}}}\right) \quad (17)$$

Das Wachstum von *N. muscorum* im Schüttelkolben bei optimalem pH-Wert (pH 6) und 24 °C wurde mit Hilfe der voranstehenden Funktion berechnet. Analog wurde mit *T. sociatus* bei pH 8 und 30°C verfahren. Die eingestellte Temperatur T_x im Schüttelkolben lag bei 24 °C. Die Peakbreite A der Glockenkurve wurde mittels nicht-linearer Regression berechnet und betrug 8,19. Das Wachstum beider Cyanobakterien war bei pH-Werten von 3 und 12 nicht mehr möglich, woraus sich $pH_{min} = 3$ und $pH_{max} = 12$ ergibt. Da das limitierende Substrat nicht bestimmt wurde, wurde eine Substratkonzentration (S) von 2 g L^{-1} angenommen, was auf der Konzentration der im Medium BG 11 gelösten Nährstoffe basiert (Rippka et al. 1979). Für die Sättigungskonstante wurde der publizierte Wert der Mikroalge *Porphyridium* sp. ($K_S = 0,7 \text{ g L}^{-1}$) verwendet. Obwohl dieser Organismus taxonomisch nicht eng mit den Cyanobakterien verwandt ist, wurde dieser Wert trotzdem verwendet, da die Versuche mit *Porphyridium* sp. unter den gleichen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur und Substratverfügbarkeit) durchgeführt wurden wie die Versuche in dieser Arbeit. Dies ist relevant, da K_S von diesen Parameter abhängig ist (Uhlenhut 1999, Tiemeyer 2007, Rojas 2014).

Das Wachstum der Cyanobakterien wurde in Berkeley Madonna (Betaversion; University of California, Berkeley, USA), basierend auf der erstellten Funktion, nachgebildet und den experimentell ermittelten Daten vergleichend gegenübergestellt. Das Ergebnis ist für *T. sociatus* und für *N. muscorum* in Abbildung 56 dargestellt. Das Modell gibt die experimentellen Daten mit einer Genauigkeit von 98,8 % ($R^2=0,988$) bei *N. muscorum* und mit 75,0 % ($R^2=0,75$) bei *T. sociatus* wieder.

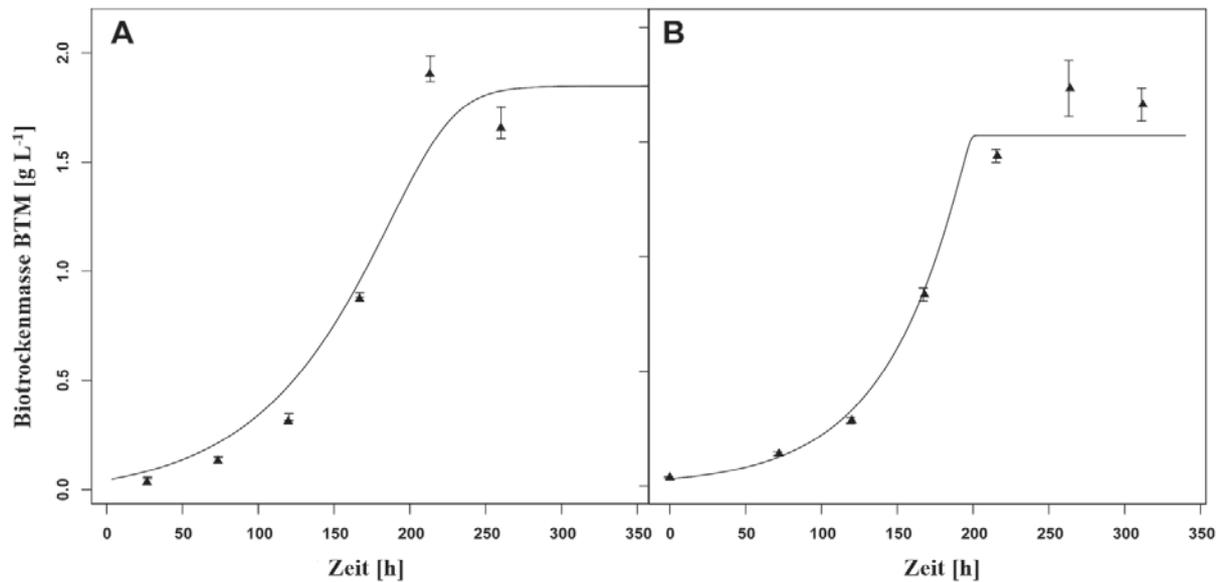


Abbildung 56: Mathematische Beschreibung der experimentell bestimmten Wachstumskurve von *Nostoc muscorum* (A) und *T. sociatus* (B). ▲ = die experimentell bestimmte Biomasse BTM pro Zeit im Schüttelkolben bei optimalem pH-Wert und Temperatur. Die schwarze Linie stellt die berechnete Wachstumskurve dar.

Es wurde erwartet, das Wachstum der Cyanobakterien *T. sociatus* und *N. muscorum* bereits durch ein einfaches Modell beschreiben zu können. Diese Erwartungen konnten hinreichend bei *T. sociatus* (75 %) und sehr gut bei *N. muscorum* (98,8 %) erfüllt werden. Mathematische Modelle basieren auf den Daten, die verwendet wurden, um sie zu erstellen. Darüber hinaus müssen die Spezifikationen an verschiedene Organismen angepasst werden können. Jeder betrachtete Organismus hat je nach Herkunft individuelle Optima, die dann zu unterschiedlichen Funktionen führen, um diese Optima akkurat zu beschreiben. Weiterhin nimmt die Genauigkeit eines Modells mit der Quantität der Daten zu, die bei der Erstellung genutzt werden können. So konnten in dem vorliegenden Beispiel jeweils nur 4 verschiedene Temperaturen für die Ableitung der Glockenkurve genutzt werden. Dies kann durch weitere Versuche zukünftig noch verbessert werden. Das Gleiche gilt für die Betrachtung des pH-Wertes. Es wurde für das Modell angenommen, dass der pH-Wert während der Kultivierung konstant ist. Dies ist in der Realität nicht der Fall, wo es durch Alkalisierung des Mediums oder durch aktive Ausscheidung von kompatiblen Soluten zu einer Veränderung des pH-Wertes kommt (Brock 1973, Lustigman et al. 1995). Deswegen muss die Änderung des pH-Wertes über die Zeit optimaler Weise mit in das Modell integriert werden. Um dies zu erreichen, müsste der Zusammenhang der Alkalisierung des Mediums und der Bildung von Biomasse über die Zeit untersucht werden. Des Weiteren hat der pH-Wert großen Einfluss auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen im Medium und die Löslichkeit von CO₂. Beide Effekte sind bislang im Modell nicht berücksichtigt. Auch Versuche zur Bestimmung von S und K_s müssen noch



durchgeführt werden, um die Genauigkeit weiter zu verbessern. Der wichtigste Punkt ist jedoch die Vernachlässigung der Wechselwirkung der einzelnen Parameter (Temperatur, pH, CO₂ etc.) untereinander, welche den Hauptgrund für die Ungenauigkeit des Modells darstellt. Obwohl all diese Punkte noch Raum zur Verbesserung des Modells bieten, konnte das Wachstum unter den gegebenen Bedingungen bereits gut abgebildet werden.

3.6.2 Bestimmung der Wechselwirkungen zwischen den Parametern durch DoE

In Kapitel 3.5 wurde bereits der Einfluss verschiedener Faktoren auf das Wachstum von terrestrischen Cyanobakterien untersucht. Dabei wurden die einzelnen Parameter jeweils separat betrachtet, wodurch ein gegenseitiger Einfluss (z.B. Temperatur, pH-Wert und CO₂) nicht erkennbar wird. Daher wurden die gegenseitigen Wechselwirkungen der Parameter Temperatur, pH-Wert, CO₂-Konzentration der Zuluft und Gehalt an Mineralsalzen- sowie den Einfluss dieser Faktoren, zusammen mit dem von Licht, auf die Wachstumsrate mit Hilfe von DoE untersucht. Dazu wurde ein D-optimaler Versuchsplan mit Hilfe der Software Visual-Xsel (crgraph, München) erstellt und die Versuche im beleuchteten Rührreaktor durchgeführt. Die Parameter der einzelnen Versuche wurden innerhalb der in Kapitel 3.5 beschriebenen Grenzen vorgegeben und sind inkl. der ermittelten Wachstumsraten im Anhang A.3 dargestellt. Aufgrund der Vielzahl der nötigen Versuche wurde exemplarisch *N. muscorum* untersucht und für eine bessere Vergleichbarkeit mit bereits beschriebenen Daten die maximale Wachstumsrate μ_{\max} ermittelt. Um dies erreichen zu können, wurde auf eine sterile Probennahme verzichtet, die Sterilität der Versuche jedoch versuchsbegleitend mikroskopisch kontrolliert. Die Grenzen der verschiedenen Einflussfaktoren wurden nach den Ergebnissen aus Kapitel 3.5 festgelegt. Somit wurde ein Temperaturbereich von 18-36 °C, pH-Werte zwischen 5 und 8, Lichtstärken zwischen 50 und 110 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, CO₂-Konzentrationen zwischen 0,03 und 5 %-Vol. sowie verschiedene Gehalte an Mineralsalzen zwischen 25 und 100 % der normalen Konzentration des BG 11-Mediums untersucht. Ein höherer Gehalt an Mineralsalzen wurde nicht untersucht, da laut Rippka und Kollegen in der üblichen Zusammensetzung des Mediums alle Nährstoffe bereits im Überschuss vorhanden sein sollen (Rippka et al. 1979).

Die erhaltenen Daten wurden mittels multipler Regression in Visual-Xsel ausgewertet und die maximale Wachstumsrate μ_{\max} als Zielfaktor definiert. Eine graphische Übersicht der Ergebnisse ist in Abbildung 57 dargestellt.

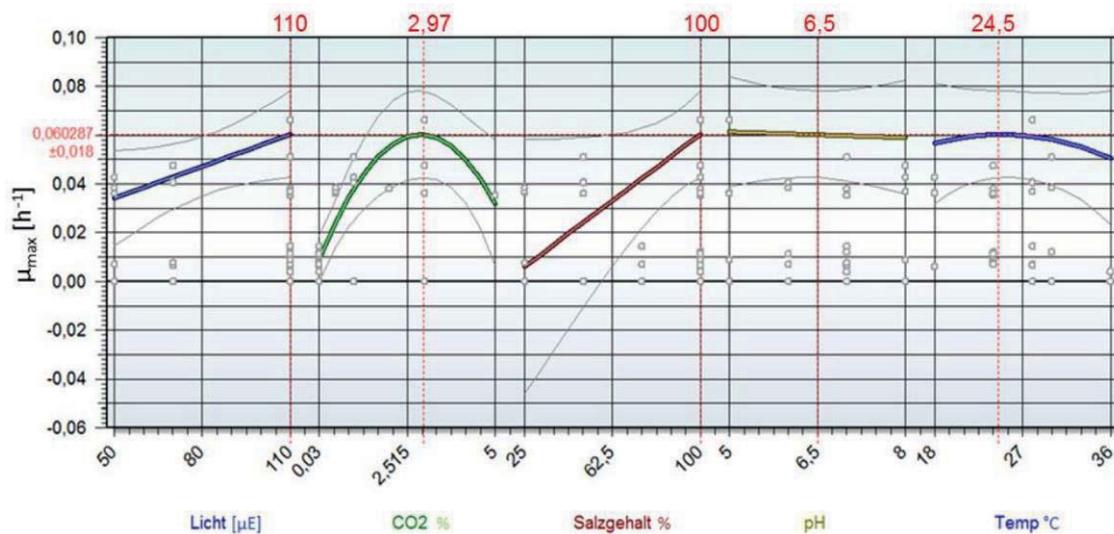


Abbildung 57: Ergebnisse des DoE am Beispiel von *Nostoc muscorum*. Dargestellt ist der Einfluss der einzelnen Versuchsparameter auf die maximale Wachstumsrate μ_{\max} [h^{-1}]. Die ermittelten Optima sind in roter Schrift über dem jeweiligen Parameter zu sehen, bzw. auf der Y-Achse.

Durch multiple Regression wurde ein Verlauf der Wachstumsraten, innerhalb der vorher definierten Grenzen des jeweiligen Parameters, ermittelt und als farbige Kurve dargestellt. Die Grenzen sind durch graue Linien im Diagramm gekennzeichnet, das jeweilige Optimum durch eine rote. Zusätzlich wird das Optimum als konkrete Zahl über den betreffenden Parametern genannt. Laut der Auswertung durch Visual-Xsel liegt die optimale Lichtstärke bei $110 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, die optimale CO_2 -Konzentration der Zuluft bei 2,97 %-Vol., der optimale Mineralsalzgehalt bei 100 %, der optimale pH-Wert bei 6,5 und die optimale Temperatur bei $24,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Sowohl die CO_2 -Konzentration als auch die Temperatur zeigen den Verlauf einer Glockenkurve. Die Verläufe der Lichtstärke und des Gehaltes an Mineralsalzen steigen linear bis zu dem Optimum an, während der Verlauf des pH-Wertes nahezu konstant bleibt. Zur Bewertung der Daten werden die Genauigkeit, mit der die berechneten Verläufe die experimentellen Daten beschreiben, als R^2 sowie die Einflussgröße der Parameter auf die Zielgröße (μ_{\max}) als p-Wert (p-value) angegeben. Ist der p-value kleiner als 0,05, hat er einen signifikanten Einfluss auf die Zielgröße (Kleppmann 2008). In Tabelle 12 sind die erhaltenen p-values für jeden Parameter dargestellt.



Tabelle 12: Signifikanzen (p-values) der betrachteten Parameter nach Analyse durch multiple-Regression in Visual-Xsel. Werte über 0,05 haben keinen signifikanten Einfluss.

Parameter	p-Value
Licht	0,036
CO ₂ -Gehalt	0,041
Medienverdünnung	0,046
pH-Wert	0,441
Temperatur	0,421

Sowohl die Lichtstärke, die CO₂-Konzentration der Zuluft als auch der Gehalt der Mineralsalze im Medium haben demnach einen signifikanten Einfluss auf die Zielgröße (μ_{\max}). Da der p-value des pH-Wertes und der Temperatur über 0,05 liegt, besitzen diese Parameter hingegen keinen signifikanten Einfluss. Dies spiegelt sich auch in der Betrachtung des absoluten Effektes (Y) der Parameter auf die Zielgröße wider, der in Abbildung 58 dargestellt ist. Je größer Y ist, desto größer ist der Effekt auf die Zielgröße. Den größten Effekt hat somit die CO₂-Konzentration der Zuluft, gefolgt von dem Gehalt der Mineralsalze und der Lichtstärke. Die Temperatur und der pH-Wert haben im Vergleich dazu nur einen geringen Effekt innerhalb des betrachteten Versuchsraumes.

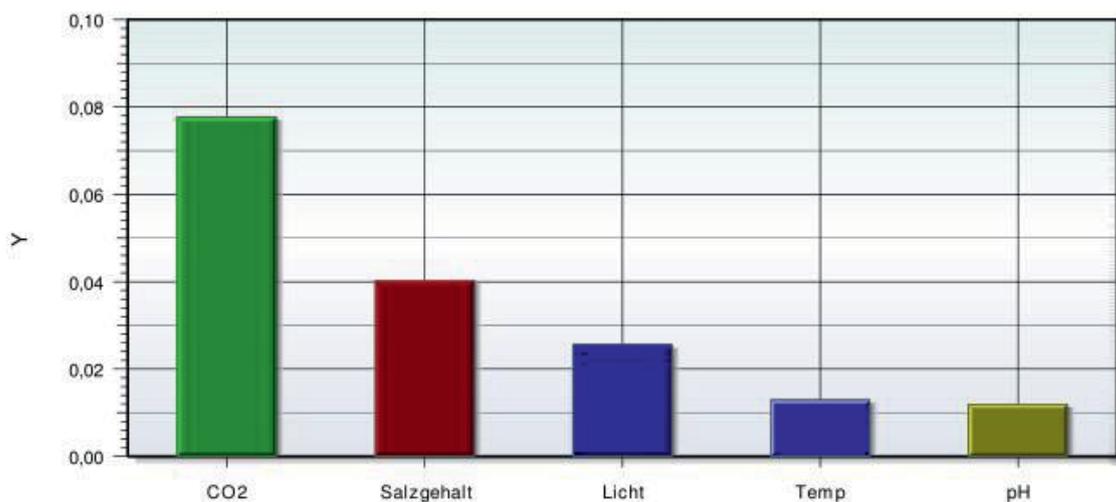


Abbildung 58: Absoluter Effekt (Y) der einzelnen Parameter auf die Zielgröße μ_{\max} , nach Analyse durch multiple-Regression in Visual-Xsel.

Die Genauigkeit des berechneten Modells zur Beschreibung des Einflusses der einzelnen Parameter auf die Zielgröße μ_{\max} liegt bei 79,5 % ($R^2 = 0,795$). Demnach können knapp 80 % der Werte durch das Modell beschrieben werden. Bei der Betrachtung eines 5-dimensionalen

Parameterraums wird ein Bestimmtheitsmaß von über 70 % üblicherweise als guter Zusammenhang zwischen Modell und experimentellen Daten angesehen. Ein weiterer Indikator für die Nähe des Modells zu den experimentellen Daten ist die Residuenverteilung (vgl. Abbildung 59).

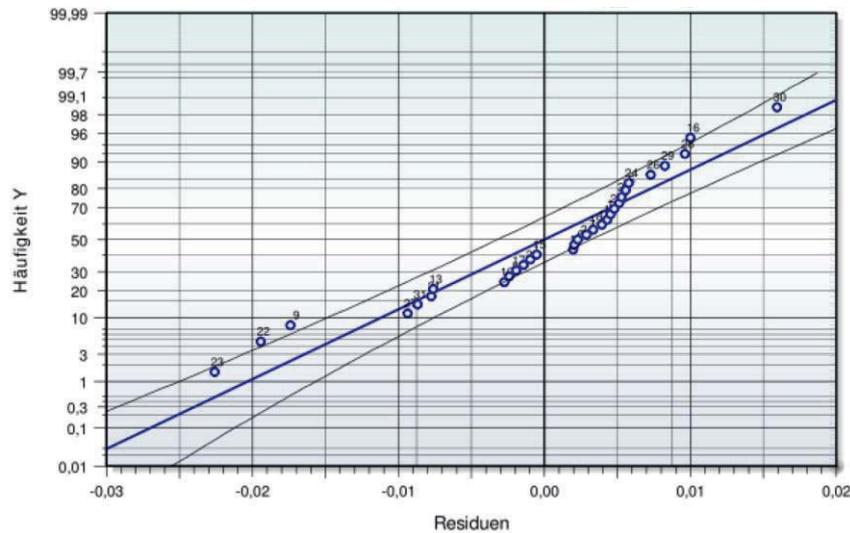


Abbildung 59: Residuen-Verteilung der multiplen Regression. Die Punkte stellen dabei die jeweiligen Versuche dar, je näher sie sich an der blauen Gerade befinden, desto näher liegen sie am erstellten Modell. Die beiden äußeren Linien stellen dabei die Grenzbereiche dar. Liegen die Punkte außerhalb des begrenzten Bereichs, können diese für das Modell in weiteren Betrachtungen ausgeschlossen werden.

Die Residuenverteilung spiegelt die Abweichung der einzelnen Versuchsergebnisse zu dem Modell graphisch wider. Je näher die Punkte, also die Versuche, an der blauen Geraden liegen, desto näher liegen diese am erstellten Modell. Zur weiteren Verdeutlichung der Ergebnisse ist die maximale Wachstumsrate μ_{\max} in Abhängigkeit der beiden größten Einflussfaktoren (CO_2 -Konzentration und Mineralsalzgehalt) dreidimensional in Abbildung 60 dargestellt.

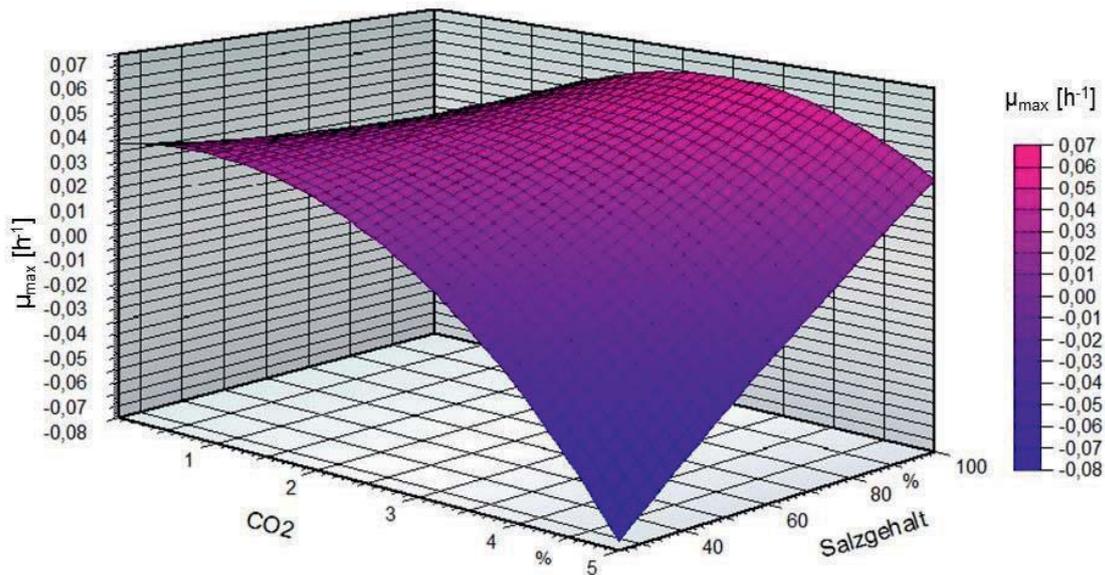


Abbildung 60: Auftragung der Zielgröße μ_{\max} über dem Mineralsalzgehalt und der CO_2 -Konzentration der Zuluft. Die anderen Faktoren entsprechen den jeweiligen Optima: $\text{pH} = 6,5$; Temperatur = $24,5\text{ }^\circ\text{C}$ und einer Lichtintensität von $110\text{ }\mu\text{E}$.

Bei einer phototrophen Kultivierung spielen hauptsächlich die CO_2 -Versorgung und die Lichtstärke eine Rolle, da die übrigen Nährstoffe üblicherweise im Überschuss vorgelegt werden. Der Einfluss dieser beiden Parameter auf die maximale Wachstumsrate ist daher in Abbildung 61 dargestellt. Die anderen Faktoren entsprechen in beiden Diagrammen den jeweiligen Optima ($\text{pH}=6,5$, 100 % des Mineralsalzgehaltes bzw. $110\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, $24,5\text{ }^\circ\text{C}$).

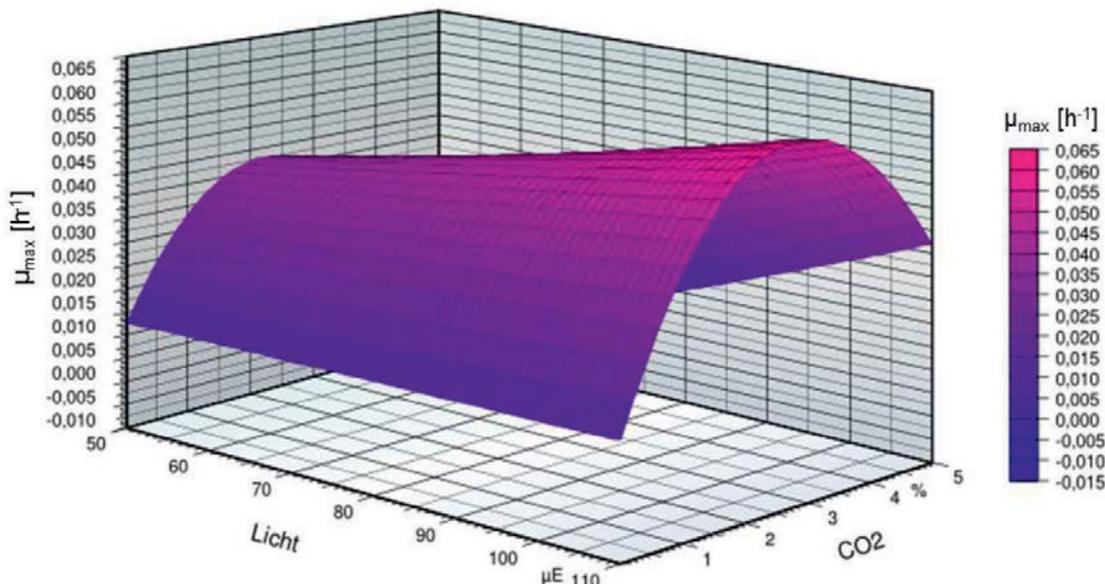


Abbildung 61: Auftragung der Zielgröße μ_{\max} über der Lichtstärke und der CO_2 -Konzentration der Zuluft. Die anderen Faktoren entsprechen den jeweiligen Optima: $\text{pH} = 6,5$; Temperatur = $24,5\text{ }^\circ\text{C}$ und einem Mineralsalzgehalt von 100 %.

Durch DoE konnte bei den jeweiligen Optima der untersuchten Einflussfaktoren eine maximale Wachstumsrate von $0,065\text{ h}^{-1}$ erreicht werden.

Es wurde erwartet, dass die Optima der einzelnen Einflussfaktoren grob den bereits ermittelten Optima aus Kapitel 3.5 entsprechen und Abweichungen dadurch zustande kommen, dass sich die Parameter untereinander beeinflussen. Demnach sollte das Optimum der Lichtstärke laut der Voruntersuchung bei ca. $700 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ liegen. Diese Lichtstärke konnte im Rührreaktor nicht verwendet werden, so dass die maximale verwendbare Lichtstärke von $110 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ als Optimum erwartet wurde und bestätigt werden konnte. Für CO_2 wurde ein Optimum für *N. muscorum* bei 5 %-Vol. gefunden. Die Wachstumsrate bei dieser Konzentration zeigte aber so große Schwankungen, dass nicht genau zu sagen war, ob die Wachstumsrate signifikant größer war als bei 2 %-Vol. Aufgrund der zitierten Veröffentlichungen für andere phototrophe Organismen lag daher ein Optimum bei 3 %-Vol. nahe. Dies konnte mit 2,97 %-Vol. ebenfalls bestätigt werden. Der Gehalt und damit die Verfügbarkeit von Mineralsalzen wurde zuvor nicht untersucht. Daher sollte durch DoE geprüft werden, ob der Gehalt an Mineralsalzen im Medium BG 11 einen Einfluss auf die maximale Wachstumsrate hat und ggfs. gesenkt werden kann. Nach Rippka und Kollegen liegen die Nährstoffe im Überschuss vor (Rippka et al. 1979), und zu hohe Konzentrationen von Nährstoffen können zu einer Hemmung des Wachstums führen (Cypionka 2010). Auch die Photosynthese kann durch einen Überschuss an Ionen negativ beeinflusst werden (Blumwald&Tel-Or 1982). Die Ergebnisse zeigen aber klar, dass der Gehalt von Mineralsalzen nach Rippka und Kollegen optimal für das Wachstum von *N. muscorum* ist. Durch eine Absenkung des Gehaltes wird die maximale Wachstumsrate signifikant beeinflusst und verschlechtert. Ein pH-Optimum wurde für *N. muscorum* durch die beschriebenen Versuche in Kapitel 3.5.2 bei 6 gefunden. Durch DoE wurde, davon abweichend, ein Optimum bei 6,5 bestimmt. Durch die Auswertung der multiplen Regression wurde ermittelt, dass der pH-Wert im Vergleich zu den anderen Parametern, innerhalb des betrachteten Versuchsraumes, keinen signifikanten Einfluss auf die maximale Wachstumsrate hat. Dies ist dadurch zu erklären, dass *N. muscorum* durch die Ausscheidung von kompatiblen Soluten den pH-Wert seiner Umgebung selber anpasst (He et al. 2013). Dies konnte durch eine Messung des pH-Wertes während der Kultivierung bestätigt werden (Abbildung 62). Obwohl der pH-Wert initial bei 5 lag, wurde er durch *N. muscorum* auf 8 angepasst.

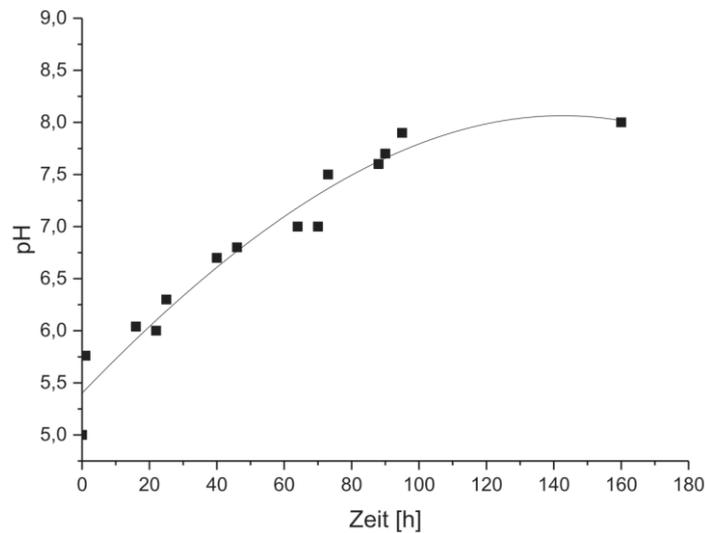


Abbildung 62: Verlauf des pH-Wertes eines beispielhaft gewählten Versuchs (V19, siehe Anhang A.3) mit *N. muscorum*. Initial-pH 5, T=28 °C, 3 % CO₂, 100 % Mineralsalzgehalt, Lichtintensität = 110 μE m⁻² s⁻¹.

Damit liegt der am Ende der Fermentation erreichte pH-Wert in dem von Allison und Kollegen beschriebenen Bereich für *N. muscorum* zwischen 7 und 8,5 (Allison et al. 1936). Bei einer submersen Kultivierung kann *N. muscorum* somit einen großen Bereich von initialen pH-Werten selbst beeinflussen, was dazu führt, dass der initiale pH-Wert kein signifikanter Einflussparameter auf das Wachstum ist. Ein Temperaturoptimum wurde in Kapitel 3.5.3 zwischen 24 °C und 30 °C ermittelt. Diese Versuche wurden im Gegensatz zu dem DoE auf Agarplatten emers durchgeführt. Unter emersen Bedingungen diffundiert CO₂ 10.000mal schneller als unter submersen Bedingungen. In Wasser nimmt die Löslichkeit von CO₂ darüber hinaus mit steigender Temperatur stark ab (Holleman et al. 1995). Durch beides kann erklärt werden, warum im DoE ein Temperaturoptimum von 24,5 °C ermittelt wurde, da CO₂ der Parameter mit dem größten Einfluss auf das Wachstum von *N. muscorum* ist. Obwohl enzymatische Reaktionen mit steigender Temperatur schneller ablaufen, hat die Verfügbarkeit von CO₂ für die Zelle einen größeren Einfluss auf das Wachstum, und damit sinkt das Temperaturoptimum. Die experimentellen Daten bestätigen die starke Korrelation zwischen Lichtintensität und dem CO₂-Gehalt. Da für die Photosynthese sowohl das Licht als Energiequelle als auch CO₂ als C-Quelle gebraucht wird, sind diese Parameter entscheidend für das Zellwachstum. Sobald alle anderen Parameter optimal sind, hängt das Wachstum allein von der CO₂-Konzentration und der Lichtintensität ab (Berg et al. 2007).

Durch DoE konnten die Wechselwirkungen der Parameter mit einer realisierbaren Anzahl von Versuchen (33 statt 5⁵= 3125) untersucht werden. Neben der Lichtstärke und der CO₂-Konzentration in der Zuluft hatte der Gehalt an Mineralsalzen den größten Einfluss auf die maximale Wachstumsrate von *N. muscorum*. Obwohl die CO₂-Konzentration der Zuluft direkt

den pH-Wert des Mediums beeinflusst, hatte der pH-Wert durch die vom Organismus verursachte Anpassung keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum. Das gleiche gilt für die Temperatur, die im Vergleich zu den zuvor genannten Parametern nur eine untergeordnete Rolle spielt.

3.6.3 Mathematische Beschreibung der experimentell bestimmten Daten mit Berücksichtigung von Interaktionen

Aufbauend auf dem ersten, grundlegenden Modell zur Beschreibung des Wachstums von *T. sociatus* und *N. muscorum* aus Kapitel 3.6.1 wurde Gleichung (9) um die Parameter CO₂, Lichtintensität und Gehalt an Mineralsalzen erweitert:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot f_{\text{Salzgehalt}} \cdot f_{\text{Temperatur}} \cdot f_{\text{pH}} \cdot f_{\text{CO}_2} \cdot f_{\text{Lichtintensität}} \quad (18)$$

$\mu =$ Wachstumsrate [h⁻¹]

$\mu_{\max} =$ maximale Wachstumsrate [h⁻¹]

$f =$ Einflussfaktoren auf das Wachstum

Ziel ist es, so alle wichtigen Einflussgrößen für das Wachstum der Cyanobakterien zu betrachten. In Kapitel 3.6.2 wurden zusätzlich die Wechselwirkungen der Parameter untereinander bestimmt. Als Grundmodell zur Beschreibung des Wachstums diente erneut die Monodkinetik (Schuler 2008) mit den bereits beschriebenen Werten für S und K_S. Durch Analyse der experimentellen Daten mit multivariater Regression ist der Einfluss der Parameter auf die Zielgröße μ_{\max} und die Wechselwirkungen untereinander bekannt. Diese Einflussgrößen wurden daher aus Kapitel 3.6.2 übernommen und entsprechend der oben dargestellten Formel in die Simulation implementiert. Da laut der Analyse die CO₂-Konzentration in der Zuluft mit Abstand den größten Einfluss auf das Wachstum hat (vgl. Abbildung 58), wurde dieser Parameter in der Simulation zusätzlich besonders gewichtet. Der finale Quelltext des Modells sowie die Übersicht über alle durchgeführten Einzelversuche, sind in Anhang A.3 dargestellt. Um die Genauigkeit des Modells zu testen, wurden die experimentell ermittelten Daten der entsprechenden Simulation vergleichend gegenüber gestellt. Dazu wurden gezielt Versuchsbedingungen ausgewählt, die sich sehr deutlich vor allem in den Parametern mit dem größten Einfluss (CO₂-Konzentration, Lichtstärke, Gehalt an Mineralsalzen) unterscheiden. Für den in Abbildung 63 dargestellten Versuch galten die in Tabelle 13 genannten Versuchsbedingungen.



Tabelle 13: Versuchsparemeter von Versuch 19 des DoE

CO ₂ [%-Vol.]	Temperatur [°C]	Licht [μE m ⁻² s ⁻¹]	Mineralsalzgehalt [%]	pH-Wert [-]
3	28	110	100	5,5

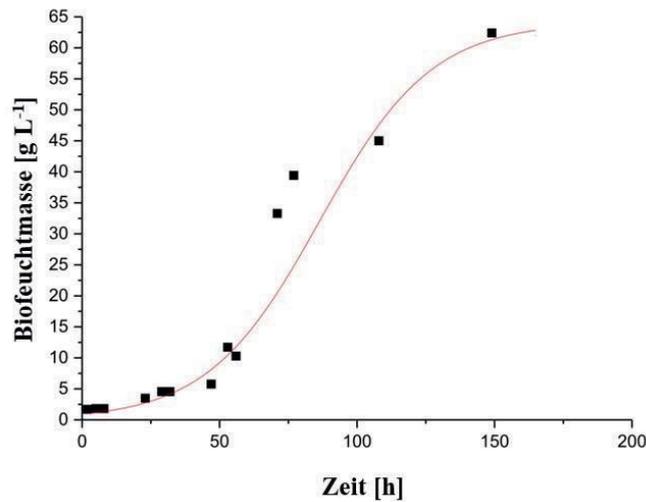


Abbildung 63: Vergleich der experimentell ermittelten Daten (■) aus Versuch 19 des DoE mit dem simulierten Verlauf des Wachstums (rote Linie). Die Versuchsparemeter sind in Tabelle 13 dargestellt. Das Modell beschreibt die experimentellen Daten mit einer Genauigkeit von 91 % ($R^2 = 0,91$).

Für den in Abbildung 64 dargestellten Versuch galten die in Tabelle 14 genannten Versuchsbedingungen.

Tabelle 14: Versuchsparemeter von Versuch 16 des DoE

CO ₂ [%-Vol.]	Temperatur [°C]	Licht [μE m ⁻² s ⁻¹]	Mineralsalzgehalt [%]	pH-Wert [-]
1	28	70	50	6

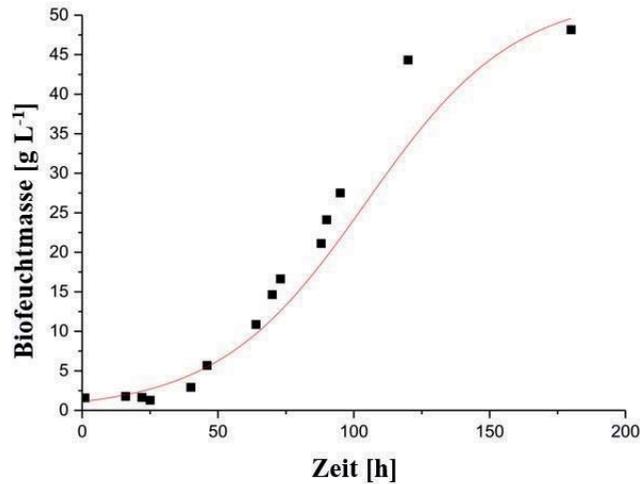


Abbildung 64: Vergleich der experimentell ermittelten Daten (■) aus Versuch 16 des DoE mit dem simulierten Verlauf des Wachstums (rote Linie). Die Versuchsparameter sind in Tabelle 14 dargestellt. Das Modell beschreibt die experimentellen Daten mit einer Genauigkeit von 92 % ($R^2 = 0,92$).

Für den in Abbildung 65 dargestellten Versuch galten die in Tabelle 15 genannten Versuchsbedingungen.

Tabelle 15: Versuchsparameter von Versuch 14 des DoE

CO ₂ [%-Vol.]	Temperatur [°C]	Licht [μE m ⁻² s ⁻¹]	Mineralsalzgehalt [%]	pH-Wert [-]
0,5	18	110	25	5

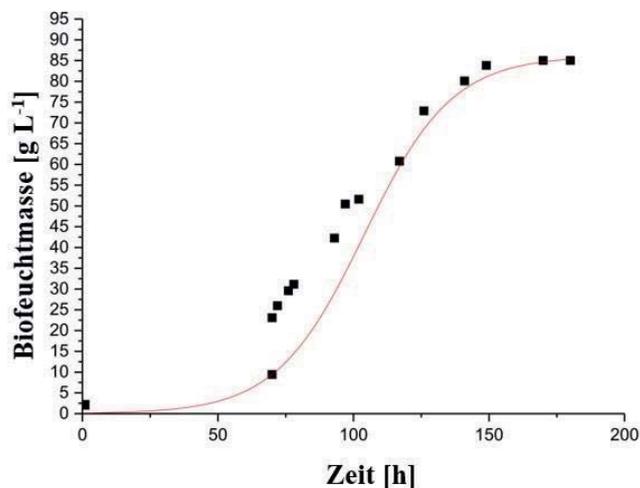


Abbildung 65: Vergleich der experimentell ermittelten Daten (■) aus Versuch 14 des DoE mit dem simulierten Verlauf des Wachstums (rote Linie). Die Versuchsparameter sind in Tabelle 15 dargestellt. Das Modell beschreibt die experimentellen Daten mit einer Genauigkeit von 83 % ($R^2 = 0,83$).



Es ist deutlich zu erkennen, dass die Simulation den Verlauf der experimentell ermittelten Daten sehr gut widerspiegelt. Selbst unter Bedingungen, die stark von dem Optimum abweichen (V14), kann eine Genauigkeit von 83 % erreicht werden. Bei beiden anderen Vergleichen lag die Genauigkeit jeweils über 90 %. Da neben dem Verlauf der Biomasse über die Zeit die maximale Wachstumsrate interessant ist, ist in Tabelle 16 eine Gegenüberstellung der experimentell ermittelten maximalen Wachstumsrate und der durch die Simulation erhaltenen dargestellt.

Tabelle 16: Gegenüberstellung der maximalen Wachstumsraten aus den experimentellen Daten und der Simulation.

Versuch	Modell	Experiment
	μ_{\max} [h ⁻¹]	μ_{\max} [h ⁻¹]
V19	0,061	0,066
V16	0,040	0,045
V14	0,032	0,036

Die Unterschiede zwischen der maximalen Wachstumsrate aus den experimentellen Daten und der aus der Simulation beträgt im Durchschnitt 10 %. Die maximale Wachstumsrate aus der Simulation ist grundsätzlich niedriger als die, die anhand der Versuchsdaten bestimmt wurde.

Die durch DoE erweiterte Simulation ist in ihrer Genauigkeit mit der grundlegenden Simulation aus Kapitel 3.6.1 vergleichbar, obwohl deutlich mehr Einflussparameter betrachtet werden. Um eine weitere Verbesserung erreichen zu können, müssen stammspezifische Kennwerte wie die Monod-Konstante oder der substratbezogene Ausbeutekoeffizient (Y_{XS}) ermittelt werden. Des Weiteren kann die Analyse der multiplen Regression durch die Durchführung weiterer Versuche verbessert werden. Die Genauigkeit liegt bislang bei 79,5 %, wodurch die Wechselwirkung der Parameter und deren Auswirkung auf μ_{\max} nicht akkurat unter allen Bedingungen dargestellt werden kann. Auch die Vorkultivierung der Cyanobakterien hat einen Einfluss, da bei dem Animpfen der Hauptkultur nicht davon ausgegangen werden kann, dass sich alle Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Um Abweichungen zwischen den Ergebnissen der einzelnen Versuche zu minimieren, muss somit auch die Vorkultivierung verbessert werden. Dennoch liefert das aktuelle Modell eine gute Beschreibung des Wachstums von *N. muscorum* und bezieht bereits alle für das Wachstum wichtigen Faktoren mit ein. Eine Übertragung auf die emerse Kultivierung von Cyanobakterien ist nicht ohne weitere Untersuchungen sinnvoll, da dort eine andere Ausgangssituation herrscht. Dies gilt vor allem

für Kohlenstoffdioxid, das den größten Einfluss auf das Wachstum hat und unter emersen Bedingungen viel leichter für die Zelle zugänglich ist.

3.7 Untersuchung und Optimierung des emersen Wachstums mit DoE

Analog zu Kapitel 3.6.2 wurde eine Optimierung des Wachstums unter emersen Bedingungen mittels DoE durchgeführt. Dafür wurden die Cyanobakterien *T. sociatus* und *N. muscorum* unter verschiedenen Bedingungen auf Agarplatten kultiviert und ihre maximale Wachstumsrate μ_{\max} mit einer Imaging-PAM bestimmt. Untersucht wurden die Parameter Lichtstärke, pH-Wert, Gehalt an Mineralsalzen und die Temperatur. Eine Übersicht der Parameterkombination der einzelnen DoE Versuche ist im Anhang A.3 dargestellt. Es wurden ein Temperaturbereich von 18-36 °C, pH-Werte zwischen 5 und 9, Lichtstärken zwischen 50 und 110 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sowie verschiedene Gehalte an Mineralsalzen zwischen 25 und 100 % der normalen Konzentration des BG 11-Mediums untersucht. Die CO_2 -Konzentration entsprach bei allen Versuchen der von Raumluft (0,03 %-Vol.).

Die erhaltenen Daten wurden mittels multipler Regression in Visual-Xsel ausgewertet und die maximale Wachstumsrate μ_{\max} als Zielfaktor definiert. Eine graphische Übersicht der Ergebnisse für *N. muscorum* ist in Abbildung 66 dargestellt. Laut Analyse liegen die Optima für die emerse Kultivierung von *N. muscorum* bei einer Temperatur von 30,4 °C, einem pH-Wert von 7,1, einer Lichtintensität von 110 μE und einem Mineralsalzgehalt von 100 %. pH-Wert und Temperatur zeigen deutlich den Verlauf einer Glockenkurve, während bei der Lichtstärke und dem Mineralsalzgehalt ein linearer Anstieg bis zu dem Optimum zu erkennen ist. Die Genauigkeit zur Beschreibung des Einflusses der einzelnen Parameter auf die Zielgröße μ_{\max} liegt bei 88 % ($R^2 = 0,88$).

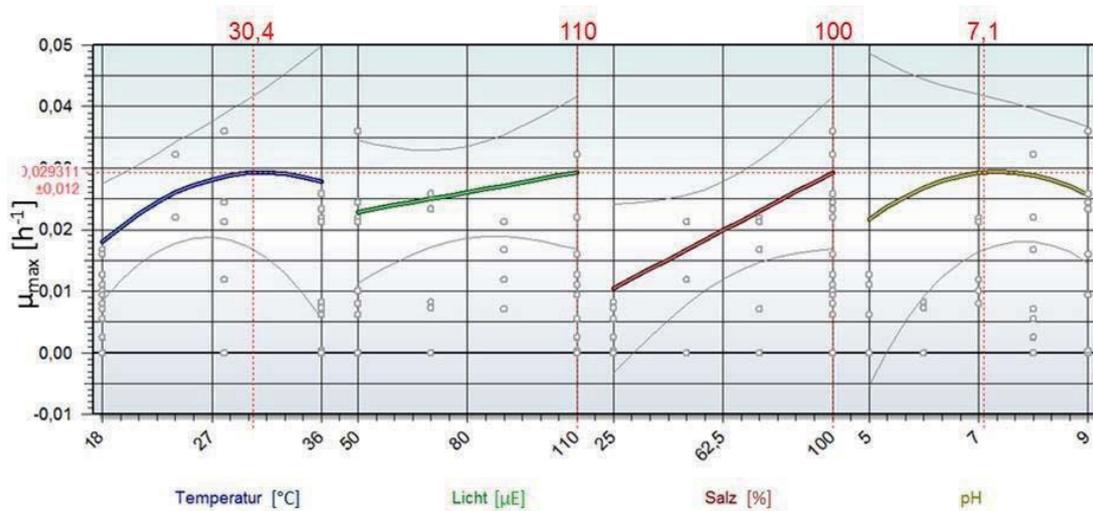


Abbildung 66: Ergebnisse des DoE zum emersen Wachstum von *N. muscorum*. Dargestellt ist der Einfluss der einzelnen Versuchparameter auf die maximale Wachstumsrate μ_{\max} [h^{-1}]. Die ermittelten Optima sind in roter Schrift über dem jeweiligen Parameter zu sehen.

Die p-values für *N. muscorum* sind in Tabelle 17 dargestellt. Von den insgesamt vier untersuchten Parametern haben demnach lediglich der Gehalt an Mineralsalzen und die Temperatur einen signifikanten Einfluss auf die maximale Wachstumsrate. Mit einem p-value von 0,884 hat die Lichtstärke den geringsten Einfluss.

Tabelle 17: Übersicht der p-values der Parameter des emersen Wachstums von *N. muscorum*. Werte über 0,05 haben keinen signifikanten Einfluss.

Parameter	p-Value
Lichtstärke	0,884
Mineralsalzgehalt	0,010
pH-Wert	0,097
Temperatur	0,009

Eine graphische Übersicht der Ergebnisse für *T. sociatus* ist in Abbildung 67 dargestellt. Laut Analyse liegen die Optima für die emerse Kultivierung von *T. sociatus* bei einer Temperatur von 27,5 °C, einem pH-Wert von 7,2, einer Lichtintensität von 110 μE und einem Mineralsalzgehalt von 100 %. Unterschiede zu *N. muscorum* liegen daher nur bei dem pH-Wert und der Temperatur vor.

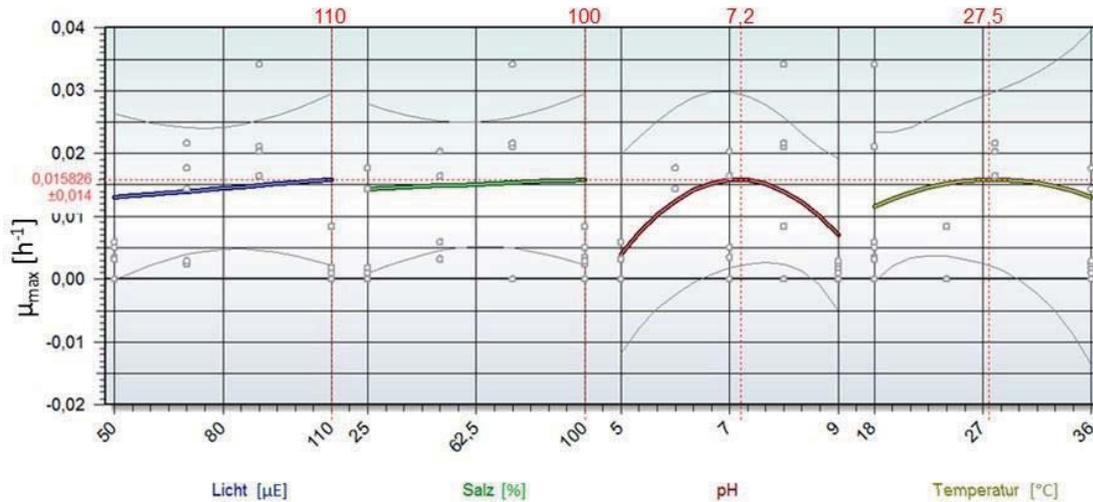


Abbildung 67: Ergebnisse des DoE zum emersen Wachstum von *T. sociatus*. Dargestellt ist der Einfluss der einzelnen Versuchsparameter auf die maximale Wachstumsrate μ_{\max} [h^{-1}]. Die ermittelten Optima sind in roter Schrift über dem jeweiligen Parameter zu sehen.

Die p-values für *T. sociatus* sind in Tabelle 18 dargestellt. Von den insgesamt vier untersuchten Parametern hat demnach keiner einen signifikanten Einfluss auf die maximale Wachstumsrate. Darüber hinaus liegt die Genauigkeit für diesen Stamm bei lediglich 34,6 % ($R^2 = 0,346$).

Tabelle 18: Übersicht der p-values der Parameter des emersen Wachstums von *T. sociatus*. Werte über 0,05 haben keinen signifikanten Einfluss.

Parameter	p-Value
Lichtstärke	0,983
Mineralsalzgehalt	0,733
pH-Wert	0,848
Temperatur	0,960

Ausgehend von den Vorversuchen aus Kapitel 3.5 und der submersen Optimierung mittels DoE wurden ähnliche Optima für beide Cyanobakterien auch unter emersen Bedingungen erwartet. Dies gilt vor allem für den Gehalt an Mineralsalzen und die Lichtstärke. Da die Lichtstärke nach den Ergebnissen aus Kapitel 3.5.4 bei ca. $700 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ optimal für das Wachstum ist, wurde erwartet, dass die optimale Lichtstärke für die Kultivierung auf Agarplatten durch die verwendete Obergrenze der untersuchten Lichtstärken von $110 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ repräsentiert wird. Diese Erwartung konnte für beide Stämme bestätigt werden. Bei dem Gehalt an Mineralsalzen im Medium konnte in Kapitel 3.6.2 bereits gezeigt werden, dass 100 % optimal für die maximale Wachstumsrate sind. Unter emersen Bedingungen ist zwar die Konzentration an Mineralsalzen im Medium gleich, aber aufgrund des geringeren Medienvolumens in der



Agarplatte die Gesamtmenge kleiner. Zusätzlich können die Zellen unter submersen Bedingungen durch eine aktive Durchmischung der Kultur gleichmäßiger und besser mit Nährstoffen versorgt werden. Bei einem Wachstum von Mikroorganismen auf Agarplatten erfolgt der Transport der Nährstoffe aus dem Medium rein diffusiv, was Zellen in räumlicher Nähe zur Medienoberfläche bevorteilt. Es wurde daher erwartet, dass der volle Gehalt an Mineralsalzen optimal ist, was bei beiden Stämmen erfüllt werden konnte. Temperaturoptima wurden bereits in Kapitel 3.5.3 emers auf Agarplatten untersucht. Es zeigte sich dabei ein Optimum von 30 °C für *T. sociatus*, während bei *N. muscorum* kein Unterschied zwischen 24 °C und 30 °C festgestellt werden konnte. Es wurden daher Optima in der Nähe von 30°C für beide Stämme erwartet, da dies auch im Fall von *T. sociatus* den Temperaturen des natürlichen Habitates entspricht. Dies wird durch die Publikation von Reynolds et al. unterstützt, die ein Temperaturoptimum für Cyanobakterien zwischen 25 °C und 40 °C veröffentlichten (Reynolds 1984). Diese Erwartungen konnten bei einem emersen Wachstum bestätigt werden (30,4 °C *N. muscorum*; 27,5 °C *T. sociatus*), allerdings besteht eine deutliche Abweichung zur optimalen Temperatur für die submerse Kultivierung von 24,5 °C. Dies ist hauptsächlich durch die Verfügbarkeit der primären C-Quelle in Form von CO₂ zu erklären. Die Löslichkeit von CO₂ in Wasser nimmt mit steigender Temperatur stark ab. Unter emersen Bedingungen ist der gleiche Effekt (die Abnahme des Partialdruckes von CO₂ mit steigender Temperatur) aufgrund der generell großen Verfügbarkeit während der luftexponierten Kultivierung (Diffusion 1000mal schneller), insgesamt weniger negativ für die Zelle. Somit stellt das Wachstum unter submersen Bedingungen einen Kompromiss aus optimaler Temperatur für den Ablauf von enzymatischen Reaktionen und der Verfügbarkeit von CO₂ für die Zelle dar. Unter emersen Bedingungen ist dies nicht der Fall, wodurch ein höheres Temperaturoptimum für beide Stämme ermittelt wurde. Bei dem pH-Wert wurde ein Optimum von 6,5 für *N. muscorum* und 8 für *T. sociatus* aufgrund von Kapitel 3.5.2 und 3.6.2 erwartet. Unter emersen Bedingungen lag der optimale pH-Wert für beide Stämme jeweils knapp über pH 7, was nicht den Erwartungen entsprach. Des Weiteren hatte der pH auf Agarplatten einen deutlich signifikanteren Einfluss auf das maximale Wachstum. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Cyanobakterien im Laufe der Kultivierung aktiv Substanzen ausscheiden, die Einfluss auf den pH-Wert nehmen. So konnte bereits am Beispiel von *N. muscorum* (vgl. Abbildung 62) gezeigt werden, dass der initiale pH-Wert von 5 auf 8 während der Fermentation angestiegen ist. Eine solche Einflussnahme kann auf Agarplatten im Vergleich nur langsam stattfinden, da die vorhandene Biomasse deutlich geringer ist und somit weniger kompatible Solute abgegeben werden können. Für die großen Schwankungen der Ergebnisse und die niedrige Genauigkeit

der Analyse durch multivariate Regression gibt es mehrere Gründe. Durch eine submerse Vorkultivierung der Cyanobakterien passen sich diese von ihrem Pigmentgehalt an die gegebenen Bedingungen an (Dai et al. 2013). So kann es zu Schwankungen der Wachstumsraten bei einer emersen Kultivierung nach vorangegangener submerser Kultivierung kommen, da die Mikroorganismen zunächst ihren Pigmentgehalt für eine effiziente Photosynthese anpassen müssen (siehe Kapitel 3.10.2). Des Weiteren kam es, bedingt durch das fädige Wachstum von *T. sociatus*, zu stark unterschiedlichen Inokulum-Mengen. Da der Zuwachs der Cyanobakterien über die Fluoreszenz mit Hilfe der Imaging-Pam bestimmt wurde, wirken sich unterschiedliche Biomassemengen und dreidimensionales Wachstum besonders auf die Ergebnisse aus. *T. sociatus* wächst stärker dreidimensional als *N. muscorum*, wodurch die geringe Genauigkeit der entsprechenden Analyse zu erklären ist.

3.8 Entwicklung eines emersen Photobioreaktors (ePBR)

Viele terrestrische Organismen, inklusive terrestrischer Cyanobakterien, wachsen unter submersen Bedingungen nur suboptimal, wodurch eine effiziente Kultivierung nicht möglich ist. Darüber hinaus wird die Bildung einer Vielzahl von biotechnologisch interessanten Produkten wie Scytonemin, Uronsäuren und EPS durch Trockenstress induziert (Potts 1999, Fleming&Castenholz 2007, Pereira et al. 2009). Dementsprechend ist auch die Produktion dieser Stoffe unter submersen Bedingungen sehr ineffizient. Deshalb wurde im Rahmen der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation ein neuartiger emerser Photobioreaktor entwickelt, der speziell auf die Anforderungen von terrestrischen Organismen und die Produktion von trockenstressinduzierten Produkten zugeschnitten ist. Sein Design wird nachfolgend dargestellt.

3.8.1 Konzept und Design des ePBR

Das Design des entwickelten emersen Photobioreaktors ePBR ist als 3D-Ansicht in Abbildung 69 und als detaillierte Explosionszeichnung in Abbildung 68 dargestellt. Grundsätzlich besteht der Reaktor aus einem Glaszylinder, der 240 mm hoch ist und einen Durchmesser von 40 mm hat. An dem Glaszylinder befinden sich 4 verschieden große Anschlüsse, die je nach Bedarf für unterschiedliche Zwecke genutzt werden können (siehe Kapitel 3.8.2). Von oben ist der Glaszylinder durch einen schraubbaren Deckel aus PET verschlossen und durch eine Flachdichtung abgedichtet. In dem Deckel befinden sich vier Bohrungen, durch die Glasstäbe reversibel in den Reaktor eingebracht werden können. Diese dienen gleichzeitig als Lichtwellenleiter und als Kultivierungsoberfläche für die Organismen. Jeder Glasstab hat eine Oberfläche von 25 cm², wodurch jeder Reaktor insgesamt 100 cm² Oberfläche für Kultivierung



aufweist (Kapitel 3.8.3). Die Beleuchtung der Glasstäbe erfolgt von oben durch Kaltlicht-LEDs mit regelbarer Lichtstärke (Kapitel 3.8.4). Die Nährstoffversorgung während der emersen Kultivierung wird durch Einbringung eines Aerosols gewährleistet, das aus dem jeweils benötigten Medium hergestellt wird (Kapitel 3.8.5).

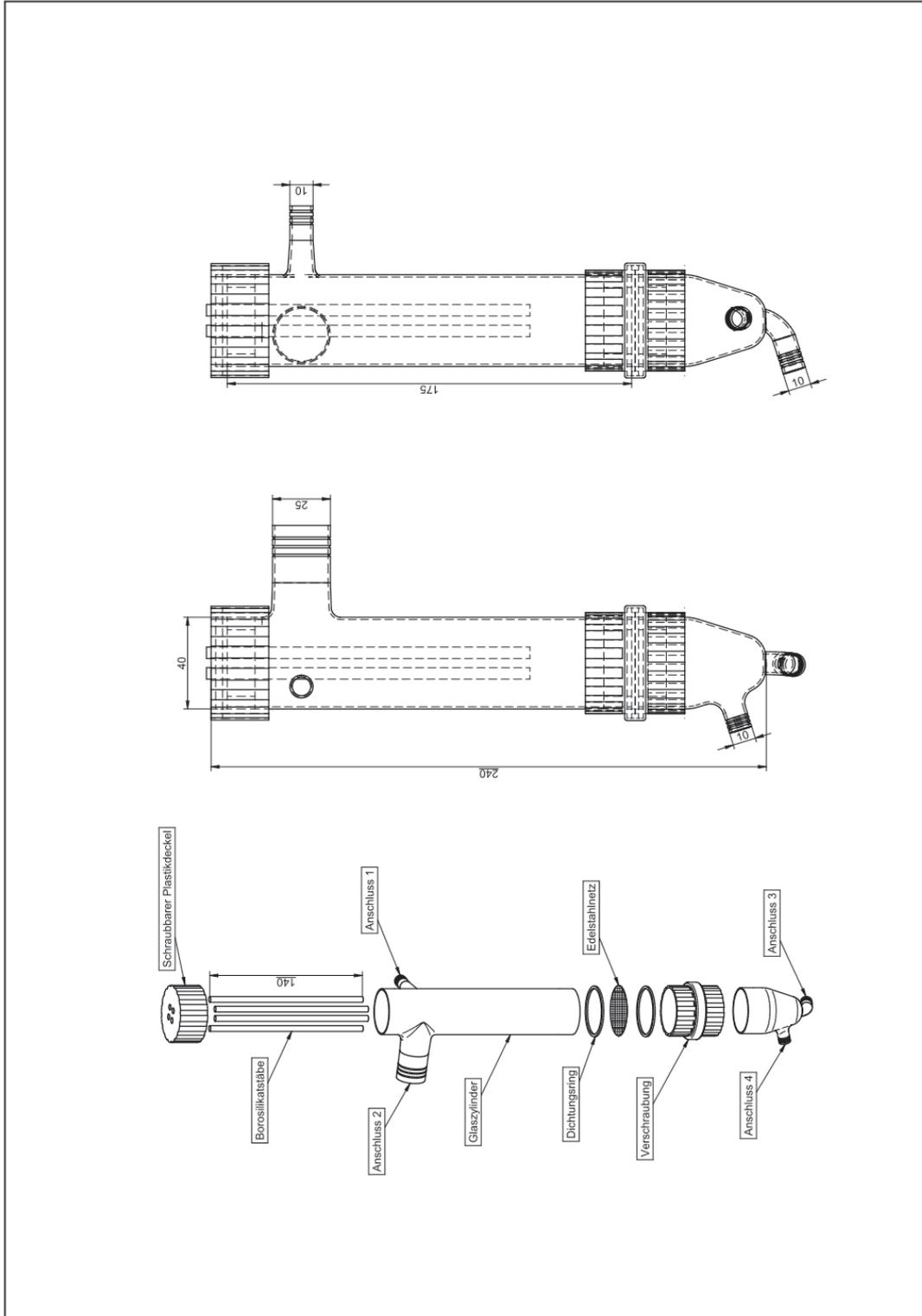
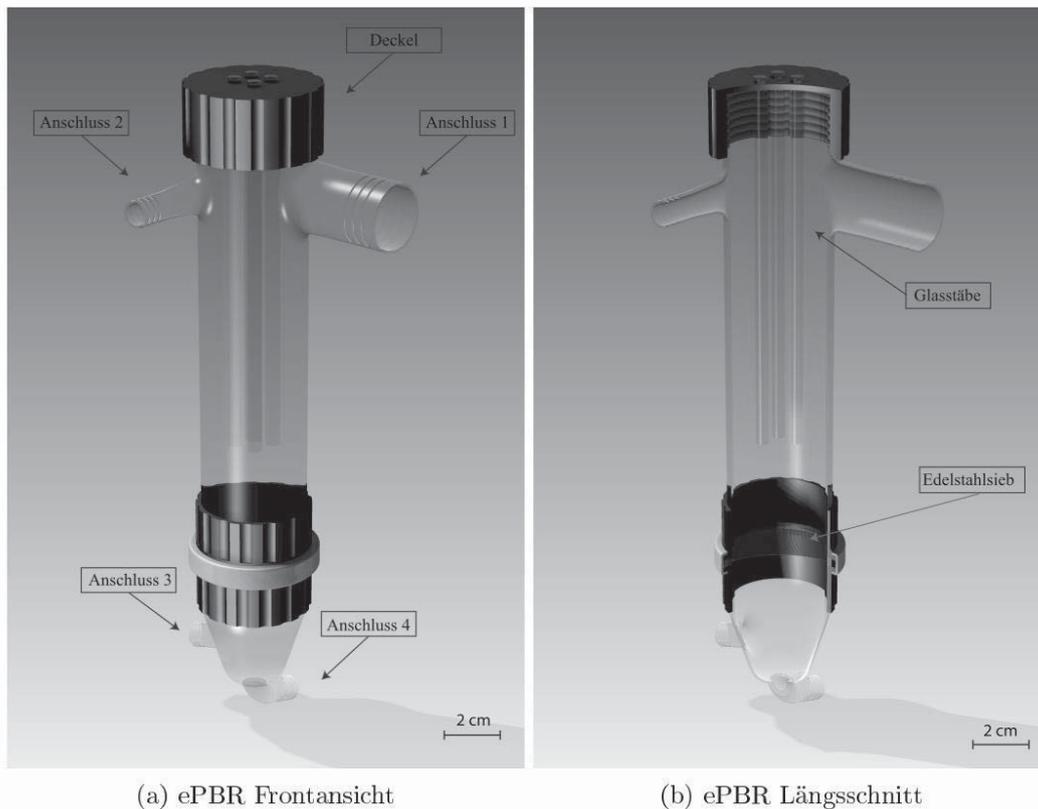


Abbildung 68: Explosionszeichnung des emersen Photobioreaktors inkl. Bemaßung.



(a) ePBR Frontansicht

(b) ePBR Längsschnitt

Abbildung 69: 3D-Darstellung des emersen Photobioreaktors in der Frontansicht (a) und als Längsschnitt (b).

Um evtl. durch die Applikation des Aerosols abgeschwemmte Zellen im Reaktor zurückzuhalten, wurde unter den Glasstäben ein Edelstahlnetz (Maschengröße 25 μm) in den Reaktor eingebaut. Nicht verbrauchtes, abgeschiedenes Medium kann so im unteren Teil des Reaktors aufgefangen und wiederverwendet werden. Alle Kultivierungen erfolgen in einem temperierbaren Inkubationsschrank, durch den die Temperatur in den Reaktoren eingestellt und konstant gehalten werden kann (Kapitel 3.8.6). Ein Schema des gesamten Prozesses ist in Kapitel 3.8.8 dargestellt.

3.8.2 Anschlüsse und Sensorik

Der emerse Photobioreaktor hat insgesamt 4 Anschlüsse. Einen großlumigen Anschluss (Durchmesser 25mm) oben am Reaktor für die Aerosolzugabe, sowie einen weiteren kleinen Anschluss oben am Reaktor und zwei kleine Anschlüsse am unteren Ende des Reaktors. Die kleinen Anschlüsse (Durchmesser 10 mm) können für Gaswechsellmessungen, die Medienrückgewinnung oder zur gezielten Begasung des Reaktors genutzt werden. Ohne eine kontinuierliche Begasung gelangt nur Luft bei der Aerosolapplikation in den Reaktorraum. Da für phototrophe Organismen die Versorgung mit CO_2 eine entscheidende Rolle spielt, wurde eine kontinuierliche Begasung realisiert. Das entsprechende Schema ist in Abbildung 70 dargestellt.

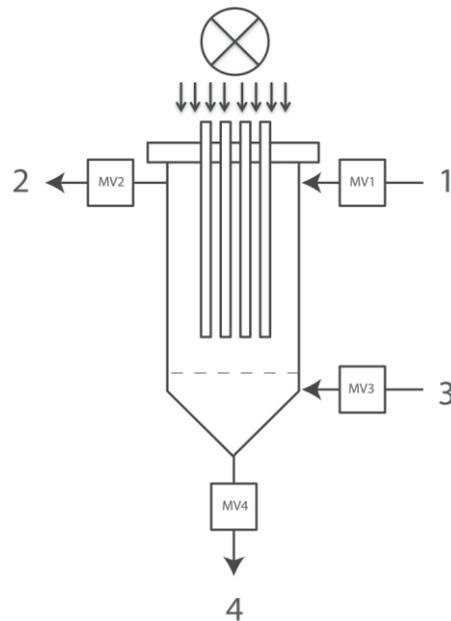


Abbildung 70: Schematische Darstellung der kontinuierlichen Begasung des emersen Photobioreaktors. Die Zahlen 1, 2, 3 und 4 kennzeichnen die vier Anschlüsse, MV steht für die Magnetventile, und die Lichtquelle ist über dem Reaktor angeordnet.

Jedem der vier Anschlüsse wurden Magnetventile (MV) vorgeschaltet, um die Anschlüsse je nach Bedarf automatisch öffnen und schließen zu können. Der großlumige Anschluss 1 wurde weiterhin für die Aerosolzugabe verwendet. Während der Aerosolapplikation waren die Magnetventile MV1 und MV4 geöffnet und die Ventile MV2 und MV3 geschlossen. Wurde kein Aerosol in den Reaktor eingetragen, waren MV 3 und MV2 für die kontinuierliche Begasung geöffnet und MV1 und MV4 geschlossen. Die Fließrichtung ist durch die Pfeile im Schema gekennzeichnet. Mit dieser Schaltung wurde jeweils das ganze Reaktorvolumen durchströmt, um eine optimale Versorgung der Organismen auf der Oberfläche der Glasstäbe mit den Nährstoffen aus dem Aerosol und CO₂ zu erreichen. Die Begasungsrate kann über ein Rotameter eingestellt werden. Über Anschluss 4 am Boden des Reaktors kann zusätzlich überschüssiges Medium, das im Reaktor abgeschieden wird, wiederverwertet werden, um die Kosten der Kultivierung zu reduzieren und die Effizienz zu erhöhen.

3.8.3 Charakterisierung der Oberflächen

Die Glasstäbe dienen bei dem hier vorgestellten Photobioreaktor nicht nur zur Beleuchtung, sondern auch als Aufwuchs-Fläche für die terrestrischen Organismen. Es muss daher ein Optimum aus der Abgabe von Licht aus den Stäben an die Organismen und der Anheftung von den Organismen auf der Oberfläche erreicht werden. Grundsätzlich gilt, dass je rauer die Oberfläche ist, desto besser ist die Anheftung der Organismen (Lampin et al. 1997, Hallab et al. 2001). Auf der anderen Seite wird der Austritt des Lichtes aus den Glasstäben durch die



Rauheit aufgrund des Auftretens von diffuser Streuung gefördert (Lühe 2013). Dadurch wird nicht die komplette Länge der Glasstäbe mit ausreichend Licht versorgt. In diesem Kapitel werden die Oberflächen hinsichtlich der Rauheit charakterisiert. Eine Betrachtung der Beleuchtung erfolgt in Kapitel 3.8.4. Die Aufrauung der Oberflächen wurde durch Anwendung einer chemischen Methode erreicht, da diese im Gegensatz zu mechanischen Methoden sehr viel reproduzierbarere Ergebnisse liefert. Die unbehandelten Glasstäbe wurden für unterschiedlich lange Zeit in einem Ultraschallbad bei 80°C in einer Lösung aus 5M NaOH und 0,5M CaCO₃ behandelt. Anschließend wurde die Rauheit R_a mit einem AFM (MFP3D, Asylum Research) bestimmt. Zum Vergleich wurden sowohl Borosilikatglasstäbe (Abbildung 71) als auch Quarzglasstäbe (Abbildung 72) auf die gleiche Weise behandelt und ausgewertet.

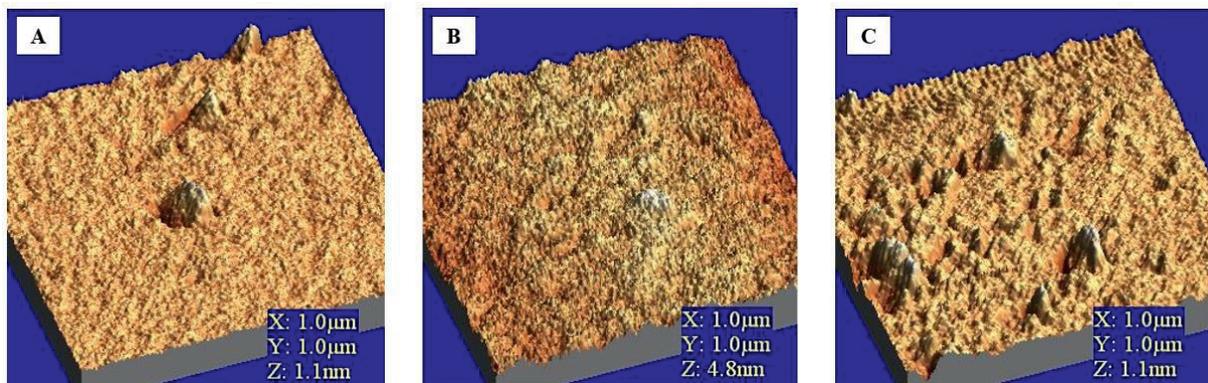


Abbildung 71: Charakterisierung der Oberflächen von Borosilikatglasstäben mit einem AFM nach 60 (A), 90 (B) und 120 (C) Minuten chemischer Behandlung. X,Y und Z stellen die Achsen des dreidimensionalen, gemessenen Raumes in µm bzw. Å dar.

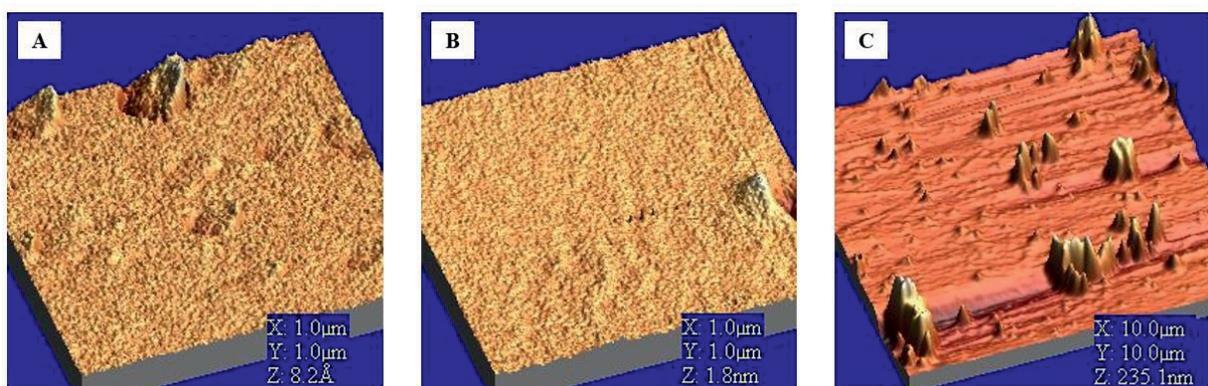


Abbildung 72: Charakterisierung der Oberflächen von Quarzglasstäben mit einem AFM nach 60 (A), 90 (B) und 120 (C) Minuten chemischer Behandlung. X,Y und Z stellen die Achsen des dreidimensionalen, gemessenen Raumes in µm bzw. Å dar.

Die Rauheit R_a der Borosilikatglasstäbe konnte durch die chemische Behandlung gesteigert werden. Sie lag nach 60 min bei 1,4 nm, nach 90 min bei 6,8 nm und nach 120 min bei 2,3 nm. Das Optimum lag demnach bei einer Behandlungszeit von 90 min. Warum die Rauheit wieder

abnimmt ist unklar, aber vermutlich durch initial verschiedene Rauheiten der eingesetzten Proben bedingt. Die Rauheit R_a der Quarzglasstäbe konnte ebenfalls durch die chemische Behandlung gesteigert werden. Sie lag nach 60 min bei 0,93 nm, nach 90 min bei 1,7 nm und nach 120 min bei 30 nm. Die Rauheit der unbehandelten Stäbe lag jeweils bei 1,4 nm. Es ist daher deutlich zu erkennen, dass die chemische Behandlung der Borosilikatglasstäbe im Vergleich zu den Quarzglasstäben einen deutlich geringeren Effekt hat. Dies war zu erwarten, da Borosilikatglas entwickelt wurde, um Chemikalien zu widerstehen. Zusätzlich hat Quarzglas die Eigenschaft, auch UV-Strahlung zu leiten, was als Induktor für die Synthese einiger biotechnologisch interessanter Wertstoffe (Scytonemin) nötig ist. Es wurde daher für alle Versuche Quarzglas verwendet, welches zuvor 120 min chemisch aufgeraut wurde und somit eine Rauheit R_a von 0,03 μm hat.

3.8.4 Lichtversorgung

Die Kultivierungsoberfläche im ePBR besteht aus vier Glasstäben, die gleichzeitig als Kultivierungsoberfläche und als Lichtwellenleiter dienen. Diese Glasstäbe werden von oben durch Hochleistungs-LEDs (25 W, kalt-weiß) beleuchtet (Abbildung 73).



Abbildung 73: Theoretische Beleuchtung des ePBRs. Von oben werden die Borosilikatstäbe über Kaltlicht-LED's bestrahlt. Sie dienen gleichzeitig als Lichtwellenleiter und als Kultivierungsoberfläche.

Eine gleichmäßige Abgabe des Lichts an die Umgebung ist für die Kultivierung von phototrophen Organismen essentiell. Aus diesem Grund wurde die Lichtverteilung von vier geometrisch verschiedenen Glasstäben untersucht (Abbildung 74). Neben der Form wurde zusätzlich der Effekt der Aufräuhung für die Lichtverteilung an einem Beispiel untersucht.



Abbildung 74: Schema der untersuchten Glasstabprototypen. Die Stäbe sind jeweils 140 mm lang und weisen an der Oberseite einen Durchmesser von 5 mm auf. (a) rund klar; (b) rund, matt; (c) rund, konisch, matt; (d) viereckig, konisch, matt.

Die vier verschiedenen Prototypen haben jeweils eine Länge von 140 mm und einen Durchmesser von 5 mm. Prototyp a war klar und rund mit einer glatten Oberfläche. Prototyp b war rund mit einer aufgerauten Oberfläche. Die Prototypen c und d wurden jeweils konisch, mit einer aufgerauten Oberfläche geschliffen, wobei Prototyp c rund und Prototyp d viereckig war. Zur Analyse der abgestrahlten Lichtstärke, in Abhängigkeit von der Entfernung zur Lichtquelle, wurde ein Quantumsensor der Firma Licor verwendet. Für die Charakterisierung der Stäbe wurden 9 unterschiedliche Ausgangslichtintensitäten gewählt 14000, 17500, 21000, 24500, 28000 und 31500 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, die direkt an der LED gemessen wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 75 dargestellt.

Die aufgerauten, konisch geschliffenen Stäbe (Prototyp c und d) strahlten das Licht gleichmäßiger als die anderen Stäbe an die Umgebung ab. Die nächstbeste Lichtverteilung wies der aufgeraute runde Stab (Prototyp b) auf. Die schlechteste Abstrahlung des Lichtes wurde bei dem runden Stab (Prototyp a) bestimmt, der ähnliche Charakteristika hat wie ein Lichtwellenleiter. Dies ist dadurch zu erklären, dass durch das Fehlen einer rauen Oberfläche das Licht innen totalreflektiert wird, wodurch die Lichtstrahlen am unteren Ende des Stabes austreten. Das Aufrauen führt zu einer Veränderung des Winkels, in dem die Lichtstrahlen auf die Grenzfläche auftreffen. So wird das Licht nach außen gebrochen und nicht reflektiert. Eine weitere Verstärkung der Lichtbrechung wurde durch die konische Form der Stäbe erreicht, durch die der Auftreffwinkel verkleinert und, damit verbunden, die Reflektion innerhalb des Stabes vermindert wird (Feynman et al. 2007). Durch die konische Form konnte die Abstrahlung des Lichtes im Vergleich zu dem runden Stab um den Faktor 6 erhöht werden.

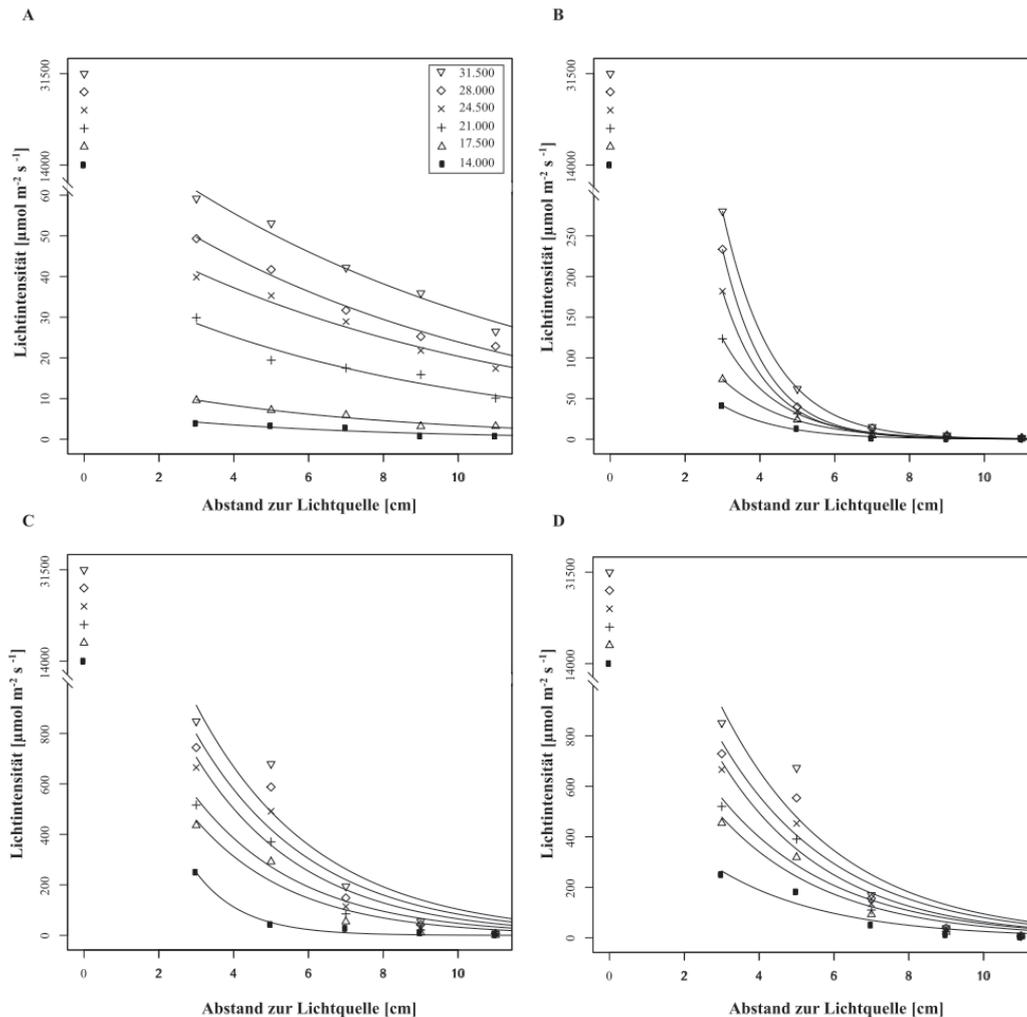


Abbildung 75: Abnahme der abgestrahlten Lichtstärke von vier Glasstab-Prototypen in Abhängigkeit von der Entfernung zur Lichtquelle. A = Prototyp a (rund, klar); B = Prototyp b (rund, matt); C = Prototyp c (konisch, rund, matt); D = Prototyp d (konisch, viereckig, matt). Die Differenz zwischen der Lichtquelle (0 cm) und dem nächsten Messpunkt (3cm) entspricht dem Abstand des Reaktors von der Lichtquelle plus der Dicke des Deckels, durch den die Glasstäbe von oben in den Reaktor hineinreichen.

Die konischen Glasstäbe wurden manuell hergestellt und unterscheiden sich somit deutlich in ihren Abmessungen. Um Unterschiede zu minimieren und eine gleichmäßige Verteilung des Lichtes zu erreichen, sollten die Stäbe in Zukunft möglichst maschinell hergestellt werden. Obwohl die Lichtverteilung der konischen Stäbe 6fach höher ist, wurde daher auf die industriell gefertigten runden Glasstäbe zurückgegriffen, die chemisch aufgeraut wurden (Prototyp b).

3.8.5 Erzeugung des Aerosols

Das Aerosol aus dem jeweiligen Nährmedium wird durch einen kommerziell erhältlichen Pariboy SX (Pari, Starnberg) Düsenvernebler erzeugt. Durch den verwendeten Zerstäuberkopf werden konstant $0,196 \pm 0,01 \text{ ml min}^{-1}$ des Mediums als Aerosol in den Reaktor bei einem Tropfendurchmesser von $0,2 \mu\text{m}$ und einer Strömungsgeschwindigkeit der Luft von 10 m s^{-1} eingetragen. Die Menge des eingebrachten Aerosols kann über die Dauer der Aerosolerzeugung



gesteuert werden. Um das Aerosol zu erzeugen, wird ein Druck von 1,6 bar durch einen Kompressor aufgebaut. Bevor die Luft aus dem Kompressor in den Vernebler gelangt, wird sie steril-filtriert, um die Sterilität der Kultivierung zu gewährleisten. Auf die Zusammensetzung des Mediums hat die Erzeugung des Aerosols keinen Einfluss.

3.8.6 Temperatur und Luftfeuchtigkeit

In einem Thermoinkubationsschrank (Mettler, IPS 749) können gleichzeitig bis zu 6 der emersen Photobioreaktoren betrieben und temperiert werden. Der Thermoinkubationsschrank regelt über 2 Peltier-Elemente automatisch eine eingestellte Temperatur im Bereich von 15-45 °C \pm 0,1 °C, zertifiziert nach DIN 12880: 2007-05. Die Umwälzung der Luft wird durch 2 Ventilatoren realisiert. Weitere Einflussfaktoren auf die Temperatur innerhalb der Photobioreaktoren sind die Beleuchtung sowie die Zugabe von Aerosol. Ihr Einfluss wurde durch die Nutzung von I-Buttons (Maxim, USA) ermittelt und in Abbildung 76 dargestellt.

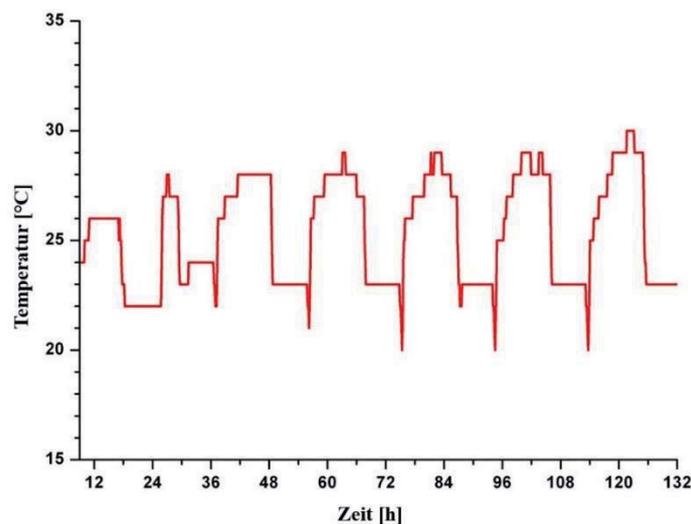


Abbildung 76: Beispielhafte Darstellung des Temperaturverlaufes im ePBR während einer Kultivierung, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen wird.

Der Verlauf der Temperatur innerhalb des emersen Photobioreaktors ist beispielhaft bei einer eingestellten Temperatur von 23 °C, einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h und einer Zugabe von Aerosol einmal täglich dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass gerade die Beleuchtung einen deutlichen Einfluss auf die Temperatur hat, da jeweils nach Abschaltung der Beleuchtung die Temperatur stark abfällt und bei Einschaltung wieder deutlich zunimmt. Durch die Zugabe von Aerosol fällt die Temperatur jeweils kurz um ca. 2 °C ab. Durch die Beleuchtung nimmt sie innerhalb von 12 h durchschnittlich um 5 °C zu. Insgesamt schwanken die Temperaturen daher zwischen 21 °C und 28 °C bei einer geregelten Außentemperatur von 23 °C. Durch eine Aerosolapplikation von 4mal pro Tag, konnten die Schwankungen jedoch auf \pm 2 °C eingeschränkt werden.

Da neben der Temperatur die Luftfeuchtigkeit für terrestrische Organismen ein weiterer wichtiger Faktor ist, wurde auch sie (unter den gleichen Bedingungen wie die Temperatur) durch die Verwendung von I-Buttons (Maxim, USA) im Laufe der Kultivierung protokolliert (Abbildung 77).

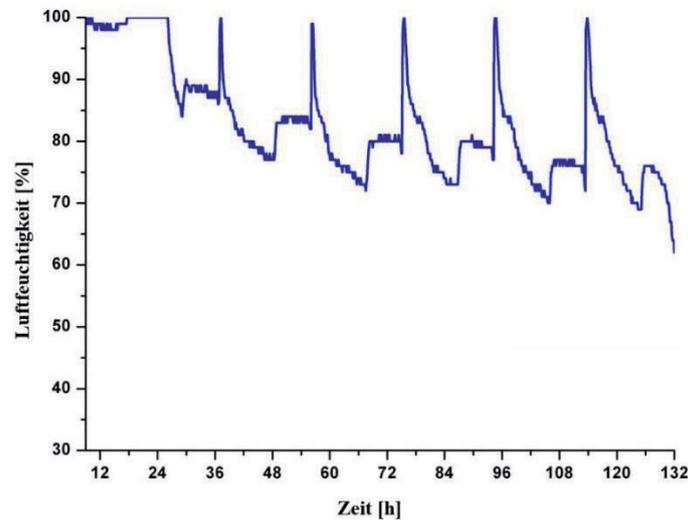


Abbildung 77: Beispielhafte Darstellung des Verlaufes der Luftfeuchtigkeit im ePBR während einer Kultivierung, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen wird.

Durch die Verwendung von Biofeuchtmasse zur Inokulation der Kultivierung liegt die Luftfeuchtigkeit zu Beginn bei ca. 100 %. Durch die Beleuchtung der Organismen nimmt die Luftfeuchtigkeit dann jeweils deutlich ab, bevor sie durch die Applikation des Aerosols sprunghaft jeweils wieder auf 100 % steigt. Während der Dunkelphasen bleibt die Luftfeuchtigkeit aufgrund der fehlenden Beleuchtung jeweils konstant. Insgesamt nimmt die Luftfeuchtigkeit jedoch stufenweise ab, wodurch es langsam zu einer Austrocknung der Organismen kommt. Nach dem aktuellem Stand der Forschung ist bekannt, dass höhere Pflanzen bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von mindestens 85% photosynthetisch aktiv sind (Lange 1969, Lange et al. 1994). Im Gegensatz zu Grünalgen und einigen Moosen, die in der Lage sind, ihre Photosynthese im Equilibrium mit Wasserdampf zu aktivieren (Lange 1969), sind Cyanobakterien nur bei Verfügbarkeit von flüssigem Wasser photosynthetisch aktiv (Lange et al. 1986, Lange et al. 1989). Cyanobakterien aus Wüstenregionen sind in der Lage, selbst bei einer Luftfeuchtigkeit von 6,5 % Photosynthese zu betreiben, optimaler Weise liegt diese aber um 75 % (Chen et al. 2012). Wie auch bei der Temperatur konnte durch die Applikation Aerosol 4mal pro Tag eine Austrocknung verhindert werden.



3.8.7 CFD-Simulation

Um die Durchströmung des ePBR mit Aerosol unter den bereits beschriebenen Bedingungen zu untersuchen, wurde eine entsprechende CFD-Simulation angefertigt (Abbildung 78).

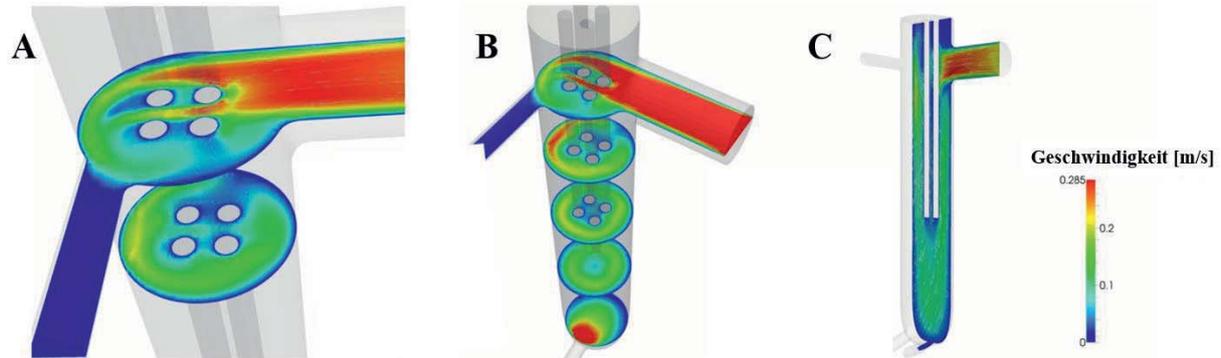


Abbildung 78: CFD-Simulation der Aerosolströmung im emersen Photobioreaktor, basierend auf den technischen Daten des Pariboy SX sowie den Abmessungen des Reaktors.

Für die Modellierung wurde die open source Software „Openfoam“ und „Paraview“ für die Visualisierung der erhaltenen Daten verwendet. Das Modell besteht aus 128206 einzelnen hexaedrischen Zellen und wurde mit dem ico-Foam Standard-Solver berechnet. Dieser Solver löst Navier-Stokes-Gleichungen für inkompressible, laminare Strömungen durch die Benutzung des PISO-Algorithmus. Bild (A) fokussiert in zwei Querschnitten auf die Aerosolströmung im Kopfbereich des emersen Photobioreaktors, wo deutlich der großlumige Anschluss (rechts), sowie der kleinere Anschluss (vorne) zu erkennen sind (siehe auch Kapitel 3.8.1). Des Weiteren ist die Umströmung der vier Quarzglasstäbe im Innenraum des ePBR zu sehen. In Bild (B) ist die Aerosolströmung im gesamten Reaktor durch 5 Querschnitte dargestellt, vom Einlass (rechts) bis zum Auslass (unten). Auch hier sind die vier Quarzglasstäbe im Innenraum, inkl. ihres Einflusses auf den Strömungsverlauf des Aerosols zu sehen. Bild (C) zeigt einen kompletten Längsschnitt durch den Reaktor und die Aerosolströmung im gesamten Innenraum. Auf allen drei Bildern (A, B und C) ist deutlich zu erkennen, dass die Strömungsgeschwindigkeit des Aerosols am Einlass und am Auslass am höchsten ist (etwa $0,3 \text{ m s}^{-1}$). Im Innenraum, rund um die Quarzglasstäbe, herrschen mittlere Strömungsgeschwindigkeiten ($0,1\text{-}0,2 \text{ m s}^{-1}$), während in den Toträumen (2 geschlossene Anschlüsse, jeweils einer oben und unten) und dem Kopfbereich, über dem Einlass des Reaktors, so gut wie keine Durchströmung stattfindet ($<0,02 \text{ m s}^{-1}$). Die Quarzglasstäbe können so optimal als Kulturfläche genutzt werden, ohne dass anheftende Mikroorganismen zu extremem Strömungsverhältnissen ausgesetzt- bzw. unterversorgt sind.

Durch die Auswertung der CFD-Simulation konnte eine Verweilzeit von 6 s sowie ein durchschnittlicher Verbleib von 12,5 % des eingebrachten Aerosols im Reaktor bestimmt werden. Diese Daten müssen zukünftig noch durch geeignete Methoden experimentell verifiziert werden.

3.8.8 Fließschema

Das Fließschema sowie der gesamte verwendete Prozess des emersen Photobioreaktors sind in Abbildung 79 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Reaktor, wie bereits in Kapitel 3.8.5 beschrieben, mit Aerosol versorgt bzw. gezielt begast wird. Die Gaszusammensetzung kann jeweils nach Bedarf aus normaler Raumluft bestehen oder durch Zumischung von 99 %igem CO₂ einen erhöhten CO₂-Gehalt aufweisen. Durch die Verwendung von Sterilfiltern an allen Anschlüssen ist der Reaktor steril von der Umwelt abgeschlossen. Das jeweilige Kulturmedium wird aus dem Reservoir mittels einer Dosierpumpe in das System zur Aerosolerzeugung gepumpt. Die Dosierpumpe ist dabei so programmiert, dass das System zur Aerosolerzeugung automatisch aufgefüllt wird, wenn das gesamte Medium vernebelt wurde.

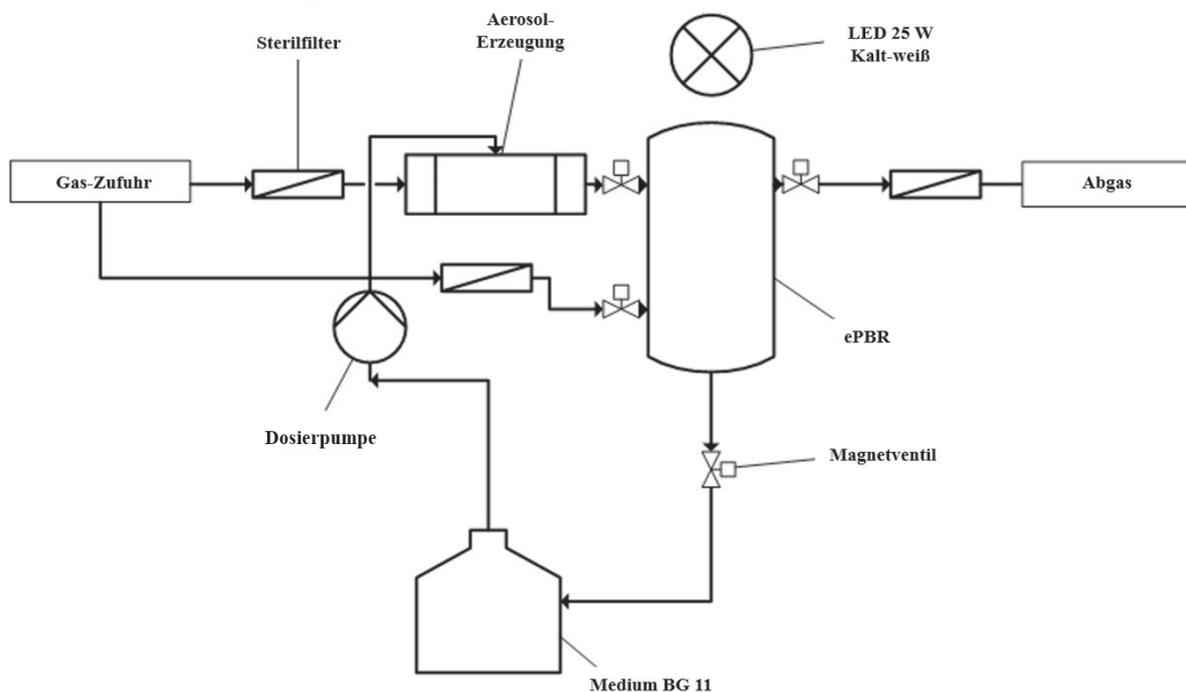


Abbildung 79: Aufbau und Fließschema des emersen Photobioreaktors. Inbegriffen sind die Aerosolerzeugung, die Begasung, Sterilfilter (0,2 µm Porenweite), das Medienreservoir und die Wiederverwertung, die Dosierpumpe und die Beleuchtung.

Überschüssiges Medium, das im Reaktorinnenraum auskondensiert, kann in das Reservoir zurückgeführt werden, um es dort wieder zu verwenden. So ist der Prozess in sich geschlossen



und bietet neben der erhöhten Effizienz auch einen ökonomischen Vorteil gegenüber submersen Prozessen.

3.9 Fermentation mit dem ePBR

Nachdem in Kapitel 3.8 ausführlich der Aufbau und der Kultivierungsprozess des emersen Photobioreaktors dargestellt wurden, werden in diesem Kapitel die erzielten Wachstumsraten, die Photopigmentsynthese sowie die EPS-Produktion gezeigt.

3.9.1 Methodik der Kultivierung mit dem emersen Photobioreaktor

Um die Versuche mit dem emersen Photobioreaktor durchführen zu können, wird zunächst submers eine Vorkultur angesetzt (A.3.2). Nach einer bestimmten Zeit werden 50 mL der Vorkultur in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und bei 4000g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend verworfen und die Glasstäbe in die Biofeuchtmasse eingetaucht und wieder entnommen (Abbildung 80). Die an der Oberfläche der Glasstäbe anhaftende Biomasse dient als Inokulum der Kultur. Die Haftung wird nicht nur von den mechanischen, sondern auch von den chemischen und physikalischen Gegebenheiten der Glasoberfläche beeinflusst. Je nach Organismus und Ausbildung der EPS unterscheidet sich die Haftung, da jedes Stoffsystem an der Grenzfläche andere zwischenmolekulare Wechselwirkungen aufweist (Habenicht 2008). Um das Inokulum exakt zu quantifizieren, wird das 50 mL Reaktionsgefäß jeweils vor und nach der Inokulation auf einer Feinwaage gewogen und die Differenz bestimmt.

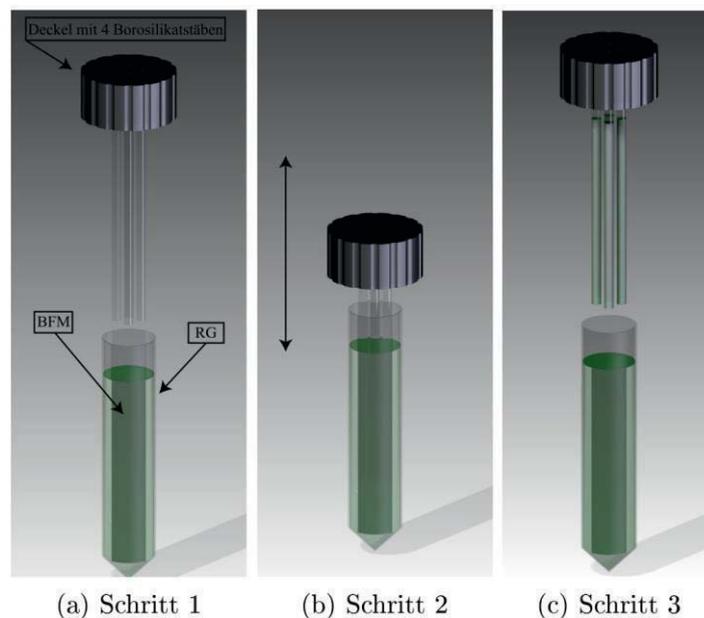


Abbildung 80: Schema der Inokulation des emersen Photobioreaktors in 3 Teilschritten; (RG) Reaktionsgefäß, (BFM) Biofeuchtmasse.

Nach der Kultivierung werden die Stäbe wieder aus dem Reaktor entnommen und in einem 50 mL Reaktionsgefäß in Medium eingetaucht. Die Organismen lösen sich dadurch nach einer

gewissen Zeit wieder von der Glasoberfläche ab und können durch erneute Zentrifugation für 30 min bei 4000g wieder von dem Medium abgetrennt werden. Die erhaltene Biofeuchtmasse kann nun quantifiziert- und für die Analyse des Gehaltes an Photopigmenten oder zur Extraktion der EPS verwendet werden. Alle Arbeiten werden steril unter einer cleanbench durchgeführt.

3.9.2 Untersuchung der Wachstumsraten

Die Wachstumsraten von *T. sociatus* und *N. muscorum* wurden durch Kultivierung im emersen Photobioreaktor bestimmt. Da eine Probennahme während der Fermentation nicht möglich ist, wurde die durchschnittliche Wachstumsrate μ [h^{-1}] aus der Zunahme der Biomasse während der Fermentationszeit berechnet. Alle Versuche wurden bei einer Lichtstärke von $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, einer Temperatur von $24 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Dauer von 7 Tagen auf runden, matten Quarzglasstäben (Prototyp b) durchgeführt.

Um zu ermitteln, welche Menge an Aerosol pro Tag eine Austrocknung der Organismen verhindert und optimal für das Wachstum ist, wurde zunächst die Wachstumsrate in Abhängigkeit von der Menge an Aerosol pro Tag untersucht. Die Ergebnisse am Beispiel von *T. sociatus* sind in Abbildung 81 dargestellt.

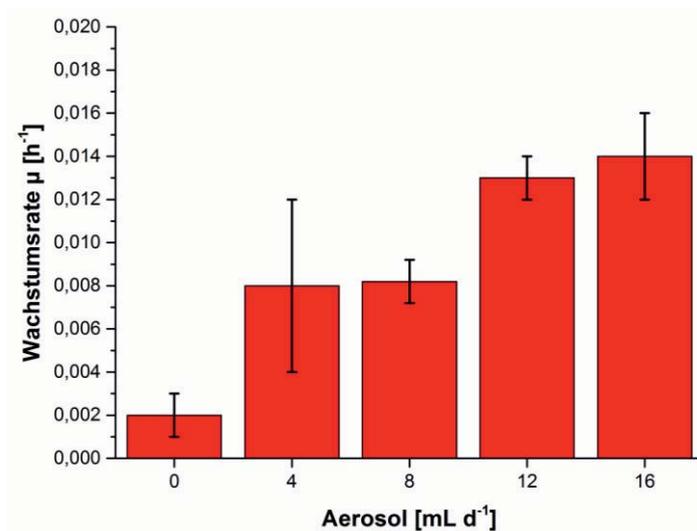


Abbildung 81: Vergleich der Wachstumsraten von *T. sociatus* bei verschiedenen Aerosolmengen pro Tag. Die Experimente wurden bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$, einer Lichtstärke von $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung eines Aerosols aus BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in dem emersen Photobioreaktor durchgeführt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Wachstumsrate mit steigender Menge an Aerosol pro Tag zunimmt. Die kleinste Wachstumsrate ($0,002 \text{ h}^{-1}$) wurde bei einer Zugabe von 0 mL Aerosol und die höchste ($0,014 \text{ h}^{-1}$) bei 16 mL ermittelt. Im Vergleich dazu resultierten die



Wachstumsraten bei 4 mL Aerosol in $0,008 \text{ h}^{-1}$, bei 8 mL Aerosol in $0,0082 \text{ h}^{-1}$ und bei 12 mL in $0,013 \text{ h}^{-1}$.

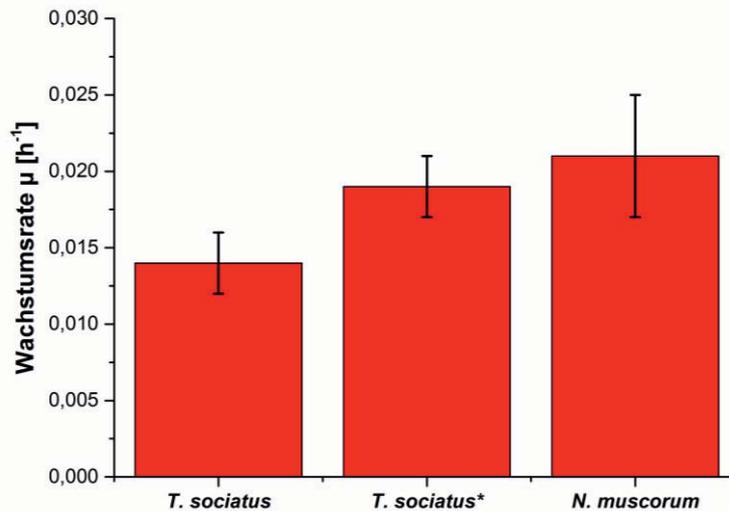


Abbildung 82: Vergleich der Wachstumsraten von *T. sociatus* und *N. muscorum* im ePBR. * markiert die Wachstumsrate unter optimierten Versuchsbedingungen mit einer kontinuierlichen Belüftung des Reaktors. Die Experimente wurden bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$, einer Lichtstärke von $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, unter Zugabe von 16 mL Aerosol aus BG 11-Medium pro Tag, über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt.

Da bei einer Aerosolzugabe von 16 mL am Tag die höchste Wachstumsrate für *T. sociatus* gemessen wurde, wurde bei diesen Bedingungen auch die Wachstumsrate von *N. muscorum* sowie die Auswirkung einer ständigen Durchlüftung des Reaktors am Beispiel von *T. sociatus* bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 82 dargestellt. *N. muscorum* hat im Vergleich zu *T. sociatus* unter gleichen Bedingungen eine höhere Wachstumsrate von $0,021 \text{ h}^{-1}$. Durch eine testweise durchgeführte kontinuierliche Belüftung des Reaktors konnte aber auch die Wachstumsrate von *T. sociatus* von $0,014$ um 35 % auf $0,019 \text{ h}^{-1}$ gesteigert werden.

Da im Medium gelöste Nährstoffe, wie z.B. Phosphat und Stickstoff, essentiell für das Wachstum der Zelle sind (Schopfer&Brennicke 2010) und Wasser grundsätzlich an zahlreichen Stoffwechselprozessen der Zelle beteiligt ist (Richter 1998), wurde erwartet, dass die applizierte Menge an Aerosol eine Auswirkung auf das Wachstum der Cyanobakterien hat. Diese Erwartung konnte bestätigt werden, da das Wachstum mit steigender Menge an Aerosol pro Tag zugenommen hat. Dass eine Wachstumsrate bei 0 mL Aerosol bestimmt wurde, lag zum einen an den gespeicherten Nährstoffen in der Zelle und zum anderen daran, dass Biofeuchtmasse zur Inokulation verwendet wurde. Da die quantifizierte Biofeuchtmasse die EPS mit einschließt, wird vermutet, dass statt eines Zuwachses von Zellmasse in Wirklichkeit ein Zuwachs an EPS gemessen wurde, der zur Zunahme des Gewichtes geführt hat. Cyanobakterien bilden verstärkt EPS, um sich vor Austrocknung zu schützen (Helm et al. 2000,

Shaw et al. 2003), was unter diesen Bedingungen der Fall ist. Ob eine weitere Steigerung der Wachstumsrate durch Erhöhung der Aerosolmenge über 16 mL Aerosol pro Tag erreicht werden kann, wurde bislang noch nicht untersucht. Die Schwankungen der Wachstumsraten resultieren aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen der Zellen bei Entnahme aus der Vorkultur sowie aus der nicht exakten Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Biofeuchtmasse. Hier kann es zu Fehlern bei der Entnahme des überschüssigen Mediums nach der Zentrifugation, sowie zu Wägefehlern bei der Quantifizierung kommen.

Da unter emersen Bedingungen die Photosynthese 6,6-mal schneller abläuft (Johnson et al. 1974) und eine emerse Kultivierung dem natürlichen Habitat der Organismen entspricht, wurde erwartet, dass die Wachstumsraten im ePBR höher sind als in submersen Systemen. Für *T. sociatus* wurde eine Wachstumsrate von $0,014 \text{ h}^{-1}$, bzw. $0,019 \text{ h}^{-1}$ unter bereits optimierten Bedingungen (kontinuierliche Belüftung des Reaktors) und für *N. muscorum* $0,021 \text{ h}^{-1}$ ermittelt. Im direkten Vergleich mit den gleichen Stämmen wurden im Schüttelkolben für *T. sociatus* eine maximale Wachstumsrate von $0,015 \text{ h}^{-1}$ und unter optimierten Bedingungen durch DoE im Rührreaktor für *N. muscorum* eine maximale Wachstumsrate von $0,06 \text{ h}^{-1}$ ermittelt. Bei *T. sociatus* konnte also bereits eine deutliche Steigerung der Wachstumsrate unter optimierten Bedingungen ermittelt werden, während bei *N. muscorum* lediglich ein Drittel der Wachstumsrate erreicht wird. Es ist davon auszugehen, dass bei *N. muscorum* durch die kontinuierliche Belüftung des Reaktors zukünftig mindestens die gleiche Steigerung der Wachstumsrate wie bei *T. sociatus* erreicht werden kann. Ein Vergleich mit bereits veröffentlichten Arbeiten ist schwer, da diese meistens marine Cyanobakterien thematisieren. Lediglich Abou-Waly veröffentlichte Wachstumsraten für *Nostoc muscorum* unter submersen Bedingungen von $0,01 \text{ h}^{-1}$ (Abou-Waly&Shabana 1993). Für *Microcoleus chthonoplastes*, der ein nah verwandtes marines Cyanobakterium von *T. sociatus* ist, veröffentlichten Karsten und Kollegen Wachstumsraten von $0,009$ bis $0,018 \text{ h}^{-1}$ im Schüttelkolben (Karsten et al. 1996). Für den gleichen Organismus fanden de Wit und Kollegen Wachstumsraten von $0,032 \text{ h}^{-1}$ in pulsed-batch Fermentationen mit geringen Sulfid-Konzentrationen (Dewit et al. 1988). In Bezug auf andere marine Cyanobakterien wurden bereits Wachstumsraten von $0,019 \text{ h}^{-1}$ für *Synechocystis* sp. (Anderson&McIntosh 1991), $0,032$ - $0,044 \text{ h}^{-1}$ für *Synechococcus* (Agawin&Agusti 1997) und $0,012$ - $0,026 \text{ h}^{-1}$ für *Cyanothece* (Feng et al. 2010) publiziert. Es wird deutlich, dass die Wachstumsraten von den untersuchten terrestrischen Cyanobakterien im gleichen Bereich liegen wie die Wachstumsraten von marinen Cyanobakterien, die bislang hauptsächlich in der Biotechnologie verwendet werden. Durch eine konsequente Optimierung auch der emersen Wachstumsbedingungen im ePBR, sollten diese noch weiter stark gesteigert werden können.



3.9.3 Untersuchung der Pigment-Synthese

Analog zu den Wachstumsraten in Kapitel 3.9.2 wurden die gebildeten Photopigmente Chlorophyll a und Carotinoide in Abhängigkeit von der applizierten Menge an Aerosol am Beispiel von *T. sociatus* untersucht. Die photometrische Methode zur Quantifizierung ist im Anhang A.3 dargestellt und die entsprechenden Ergebnisse in Abbildung 83.

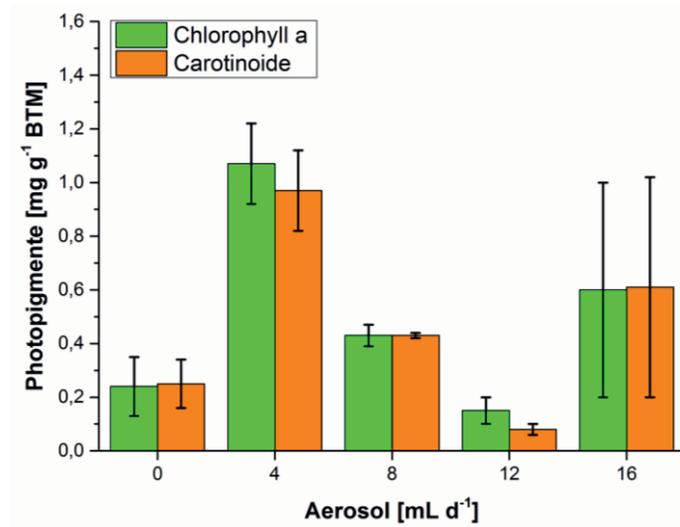


Abbildung 83: Verlauf der isolierten Photopigmente von *T. sociatus* in Abhängigkeit von der applizierten Menge an Aerosol pro Tag. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung eines Aerosols aus BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in dem emersen Photobioreaktor durchgeführt.

Bei der Menge der isolierten Photopigmente ist kein klarer Zusammenhang mit der Aerosolapplikation zu erkennen. Am meisten Photopigmente wurden bei 4 mL Aerosol pro Tag gebildet (1,07 mg g⁻¹ Chlorophyll a und 0,97 mg g⁻¹ BTM) und am wenigsten bei 12 mL Aerosol pro Tag (0,15 mg g⁻¹ Chlorophyll a und 0,08 mg g⁻¹ BTM Carotinoide). Unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 16 mL Aerosol pro Tag wurden 0,6 mg g⁻¹ Chlorophyll a und 0,61 mg g⁻¹ BTM Carotinoide isoliert und bei pessimalen Bedingungen von 0 mL Aerosol pro Tag 0,24 mg g⁻¹ Chlorophyll a und 0,25 mg g⁻¹ BTM Carotinoide respektive.

Der Vergleich der gebildeten Photopigmente von *T. sociatus* und *N. muscorum* bei 16 mL Aerosol pro Tag ist in Abbildung 84 dargestellt. Bei *N. muscorum* wurden 3,15 mg g⁻¹ BTM Chlorophyll a und 3,31 mg g⁻¹ BTM Carotinoide isoliert. Dies entspricht in etwa der fünffachen Menge der isolierten Photopigmente von *T. sociatus* unter gleichen Bedingungen.

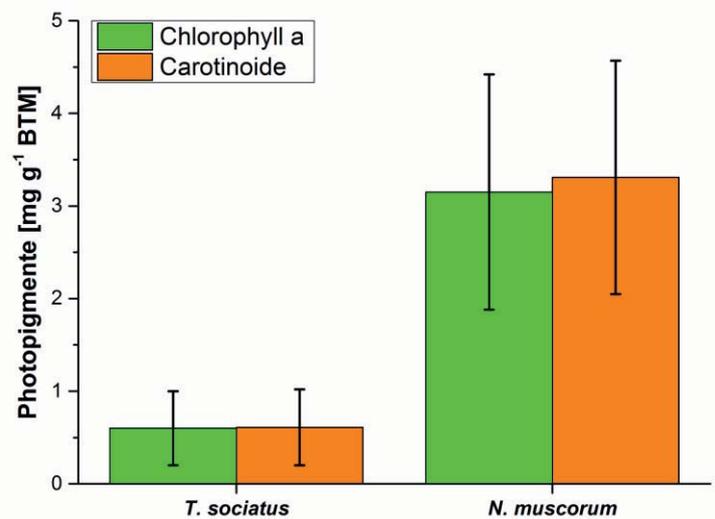


Abbildung 84: Vergleich der isolierten Photopigmente von *T. sociatus* und *N. muscorum* unter optimalen Wachstumsbedingungen (16 mL Aerosol pro Tag). Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Zugabe von 16 mL Aerosol aus BG 11-Medium pro Tag, über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt.

Es wurde erwartet, dass bei Bedingungen, die schlecht für das Wachstum der Organismen sind, mehr Chlorophyll a zur Erhöhung der Photosyntheserate und dadurch verbunden zu einer erhöhten ATP-Produktion gebildet wird. Das Gleiche gilt für die Bildung der Carotinoide zur Stabilisierung der Zellwand. Beide Prozesse sind sehr energieaufwendig und benötigen eine große Menge an Nährstoffen (Matile et al. 1996). Diese Erwartungen konnten am Beispiel von *T. sociatus* zum Teil bestätigt werden. Klammert man den geringen Gehalt an Photopigmenten bei 0 mL Aerosol pro Tag aus, werden die meisten Photopigmente bei den Bedingungen mit der geringsten Wachstumsrate gebildet. Je besser die Wachstumsbedingungen werden, desto geringer wird auch der Gehalt an Photopigmenten (vgl. Abbildung 81 und Abbildung 83). Die Zunahme des Gehaltes an Photopigmenten bei optimalen Wachstumsbedingungen (16 mL Aerosol) ist aufgrund der hohen Standardabweichung kritisch zu beurteilen. Aufgrund der anderen Daten ist davon auszugehen, dass die Bildung der Photopigmente durch Stress der Zelle zunimmt. Bei Bedingungen, wo kein Wachstum mehr möglich ist (0 mL Aerosol pro Tag), geht die Zelle in einen Überdauerungszustand über und baut vorher die letzten Reserven zur Energiegewinnung ab (Thompson et al. 1998). Dazu gehören auch die Photopigmente, wodurch der geringe Gehalt im Vergleich zu 4 mL Aerosol pro Tag erklärt werden kann.

Ein Vergleich mit anderen Publikationen ist nicht möglich, da die Angaben zu dem Gehalt an Photopigmenten meistens in $\mu\text{g L}^{-1}$ als alternative Beschreibung der Biomassezunahme gemacht werden. Für einen validen Vergleich fehlen daher die konkreten Angaben zur Biomasse. Um die Standardabweichungen der einzelnen Versuche zu minimieren, sollten sie zukünftig standardisiert in möglichst großer Anzahl wiederholt werden. Darüber hinaus könnte



eine andere Methode zur Bestimmung von Chlorophyll a und Carotinoiden verwendet werden. Die verwendete photometrische Methode ist in der Literatur etabliert und bietet Vorteile durch die leichte Durchführung, führt aber zu vergleichsweise ungenauen Ergebnissen. Als Alternative könnte eine Bestimmung des Photopigmentgehaltes mittels HPLC durchgeführt werden.

3.9.4 Untersuchung der EPS-Produktion

Die EPS wurde nach Kultivierung von *T. sociatus* (Kapitel 3.9.2) nach der modifizierten Methode von Staats und Kollegen isoliert (siehe Anhang A.3). Die Bildung in Abhängigkeit der applizierten Menge an Aerosol pro Tag ist am Beispiel von *T. sociatus* in Abbildung 85 dargestellt.

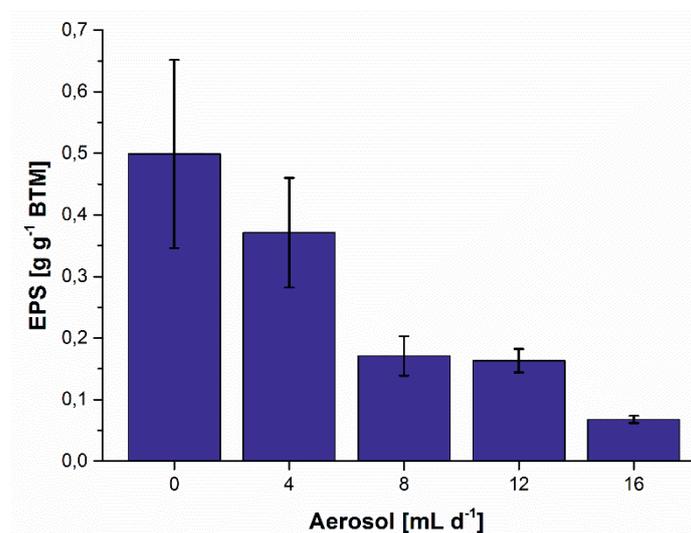


Abbildung 85: Isolierte Menge an EPS in Abhängigkeit von der applizierten Menge an Aerosol pro Tag am Beispiel von *T. sociatus*. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung eines Aerosols aus BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in dem emersen Photobioreaktor durchgeführt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Menge an gebildeter EPS umgekehrt proportional zu der Menge an appliziertem Aerosol ist. Je weniger Aerosol *T. sociatus* zum Wachstum zur Verfügung hat, desto mehr EPS wird ausgebildet. Demnach liegt das Maximum von 0,499 g g^{-1} BTM bei 0 mL Aerosol pro Tag und das Minimum von 0,068 g g^{-1} BTM bei 16 mL Aerosol pro Tag. Im Vergleich von *T. sociatus* und *N. muscorum*, bildet *N. muscorum* unter gleichen Bedingungen deutlich mehr EPS (Abbildung 86). Bei 16 mL Aerosol pro Tag wurden bei *N. muscorum* 0,38 g g^{-1} BTM EPS isoliert, was mehr als doppelt so viel ist als bei *T. sociatus* unter den gleichen Bedingungen.

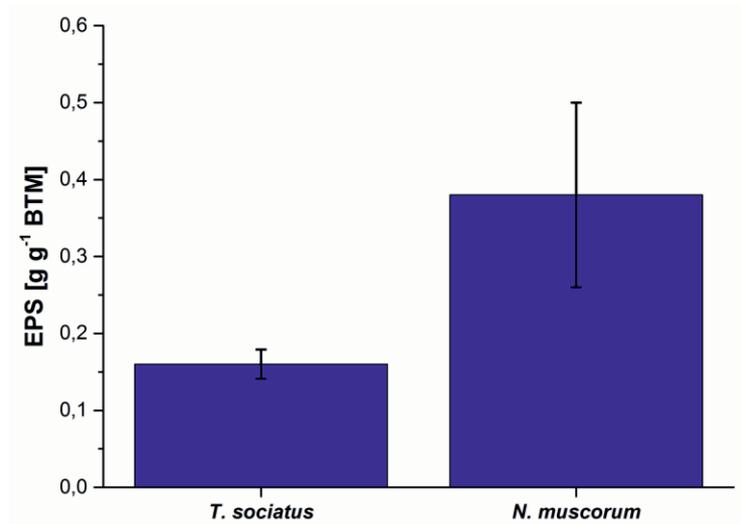


Abbildung 86: Vergleich der gebildeten Menge an EPS bei optimalen Wachstumsbedingungen (16 mL Aerosol pro Tag) im ePBR zwischen *T. sociatus* und *N. muscorum*. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Zugabe von 16 mL Aerosol aus BG 11-Medium pro Tag, über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt.

Zusätzlich zu der Bestimmung der gebildeten EPS pro Biomasse wurde die Produktivität der EPS-Synthese berechnet, da die Herstellung von EPS einer der Hauptvorteile des ePBR sein sollte. Berechnet wurde die Produktivität nach Formel (19):

$$\text{Produktivität } P_i = \frac{\text{EPS [g]}}{\text{Zeit [h]} \cdot \text{Volumen [L]}} \quad (19)$$

P_i	Produktivität	[EPS g L ⁻¹ h ⁻¹]
EPS	Absolute Menge an gebildeter EPS	[g]
Zeit	Dauer der Kultivierung	[h]
Volumen	Während der Kultivierung verbrauchtes Medium	[L]

Die Ergebnisse sind am Beispiel von *T. sociatus* in Abbildung 87 dargestellt.

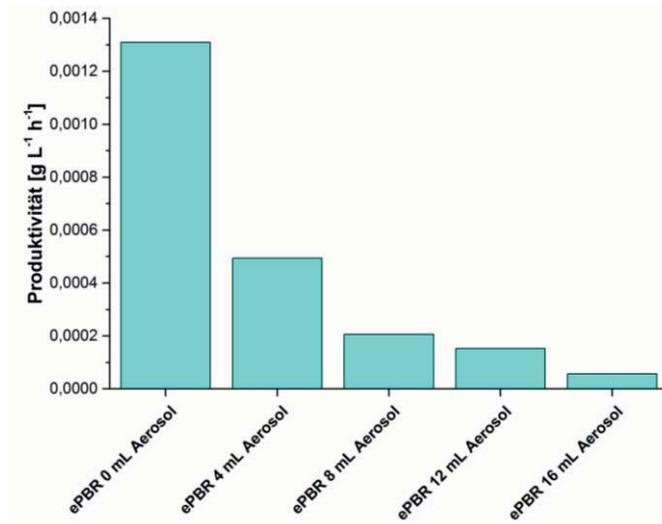


Abbildung 87: Vergleich der Produktivität der EPS-Produktion in Abhängigkeit von der applizierten Aerosolmenge pro Tag am Beispiel von *T. sociatus*. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung eines Aerosols aus BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in dem emersen Photobioreaktor durchgeführt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Produktivität genauso wie die gebildete Menge an EPS negativ mit der Menge des applizierten Aerosols korreliert. Daher wurde die höchste Produktivität von $1,31 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei 0 mL Aerosol und die geringste Produktivität von $5,65 \cdot 10^{-5} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei 16 mL Aerosol bestimmt. Bei 4 mL Aerosol wurde eine Produktivität von $4,94 \cdot 10^{-4} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ berechnet, bei 8 mL Aerosol $2,06 \cdot 10^{-4} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und bei 12 mL Aerosol $1,53 \cdot 10^{-4} \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Es wurde erwartet, dass terrestrische Cyanobakterien signifikant mehr EPS produzieren je größer der Trockenstress ist, da die Bildung von EPS zum Schutz der Zelle gegen Austrocknung dient (Helm et al. 2000, Shaw et al. 2003). Dies konnte, wie erwartet, am Beispiel von *T. sociatus* gezeigt werden, wo bei dem größten Trockenstress (0 mL Aerosol pro Tag) mehr als das sechsfache der EPS gebildet wurde als bei der Zugabe von 16 mL Aerosol pro Tag. Der gleiche Effekt konnte bei der Produktivität beobachtet werden, die durch den Trockenstress von 0,057 auf 1,31 mg EPS L⁻¹ h⁻¹ anstieg. Produktivitäten von 0,125 bis 3,33 mg EPS L⁻¹ h⁻¹ wurden bereits in einem Review von Philippis und Vincenzini am Beispiel von mehreren marinen Cyanobakterien veröffentlicht (De Philippis&Vincenzini 1998), sowie 0,416 mg EPS L⁻¹ h⁻¹ für ein verwandtes terrestrisches Cyanobakterium, das aus dem gleichen Habitat wie *T. sociatus* stammt (Mazor et al. 1996). Dementsprechend ist die erreichte Produktivität im ePBR bereits jetzt vergleichbar zu voll optimierten submersen Prozessen mit marinen Cyanobakterien.

3.9.5 Direkte EPS-Isolierung von der Kultivierungsoberfläche

Um die Möglichkeiten des emersen Photobioreaktors hinsichtlich der EPS-Produktion voll ausschöpfen zu können, wurde als erster Schritt hin zu einem möglichen kontinuierlichen Prozess die Extraktion der EPS direkt von den Glasstäben untersucht. Langfristiges Ziel ist die periodische Applikation des Extraktionsmittels als Aerosol nach einer bestimmten Zeit, um die EPS direkt im Prozess isolieren zu können. Die Lösung aus EPS und Extraktionsmittel kann dann am Boden des Reaktors aufgefangen und entnommen werden. Anschließend kann wieder normales Kultur-Medium als Aerosol verwendet werden für den nächsten Wachstumsprozess. So würde sich ein kontinuierlicher Prozess aus Zellwachstum, Induktion der EPS-Bildung durch Trockenstress und Extraktion der EPS ergeben. Grundlage hierfür bildet die Möglichkeit, ausreichend EPS direkt von den Glasstäben extrahieren zu können, ohne die Zellen dafür zu ernten. Aus diesem Grund wurde in einem Vorversuch bestimmt, wieviel EPS direkt von den Glasstäben isoliert werden kann im Vergleich zu der EPS-Extraktion nach der Zellernte. Die Ergebnisse am Beispiel von *T. sociatus* sind in Abbildung 88 dargestellt. Für die Extraktion beider Versuche wurde die in Anhang A.3 beschriebene Methode verwendet.

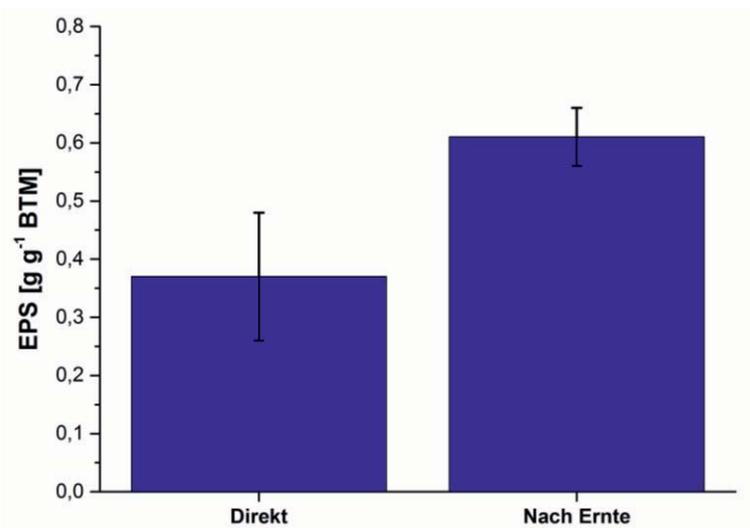


Abbildung 88: Vergleich der extrahierten EPS-Masse nach direkter Isolierung von den Glasstäben und nach Zellernte am Beispiel von *T. sociatus*.

Es ist deutlich zu erkennen, dass durch eine vorherige Zellernte mehr EPS gewonnen werden kann. Durch die Extraktion direkt von den Glasstäben kommt es zu einem Verlust von ca. einem Drittel der EPS und zu deutlich höheren Schwankungen der Gesamtmenge. Dies entspricht insofern den Erwartungen, als dass die Cyanobakterien auf den Glasstäben in mehreren Schichten übereinander wachsen. Durch die Extraktion direkt von den Glasstäben, ohne Suspendierung der Zellen, kann das Extraktionsmittel nicht alle Zellen erreichen. Dadurch wird insgesamt weniger EPS isoliert und es kommt zu den beobachteten Schwankungen. Dennoch



können zwei Drittel der Gesamtmasse gewonnen werden, ohne die Zellen dafür ernten zu müssen. Des Weiteren konnte in Folgeversuchen gezeigt werden, dass die Zellen durch die Extraktion nicht nur nicht geschädigt werden (mikroskopische Kontrolle), sondern sogar ohne Probleme im ePBR weiter wachsen können. Somit müsste nach der Etablierung eines kontinuierlichen Prozesses die Produktivität bestimmt werden, um eine Aussage hinsichtlich einer möglichen Effizienzsteigerung treffen zu können. Prinzipiell ist ein kontinuierlicher Prozess möglich.

3.10 Produktion von biotechnologischen Wertstoffen

Ziel dieser Arbeit war unter anderem, die Produktion von biotechnologischen Wertstoffen mit terrestrischen Cyanobakterien zu untersuchen. Bislang wurden diese Organismen in dem Zusammenhang sowohl in üblichen submersen Systemen als auch in einem neuen emersen Photobioreaktor daraufhin gescreent. Ein abschließender Vergleich hinsichtlich der Produktion von reiner Biomasse, den Photopigmenten Chlorophyll a und Carotinoiden sowie der pharmazeutisch relevanten EPS ist nachfolgend dargestellt.

3.10.1 Biomasse

Die Produktivität der Biomassebildung wurde in den submersen Systemen Schüttelkolben, Blasensäule und Rührreaktor sowie dem neuen emersen Photobioreaktor verglichen. Die Ergebnisse für *T. sociatus* sind in Abbildung 89 und für *N. muscorum* in Abbildung 90 dargestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass für *T. sociatus* im Schüttelkolben die höchste Produktivität von $0,14 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ erreicht wird. Im Rührreaktor lag sie bei $0,05 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$, in der Blasensäule bei $0,04 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$, und im emersen Photobioreaktor betrug die Produktivität $0,11 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Dies ist zwar weniger als im Schüttelkolben, aber insgesamt mehr als das Doppelte im Vergleich zu der Produktivität im Rührreaktor bzw. in der Blasensäule.

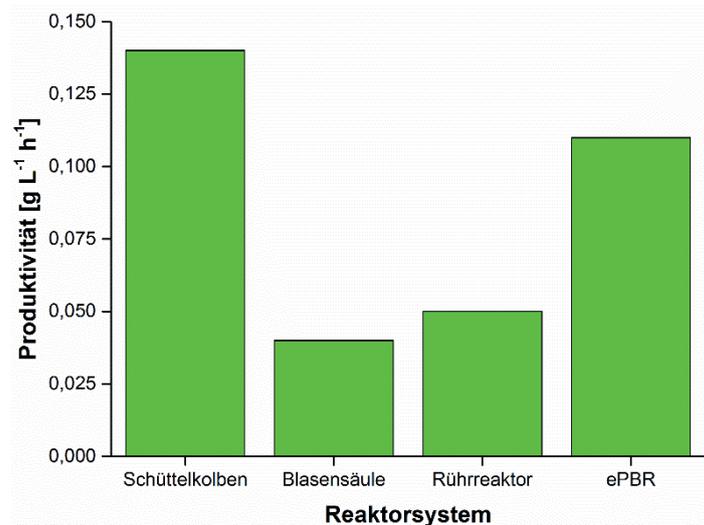


Abbildung 89: Übersicht der Produktivität der Biomassebildung von *Trichocoleus sociatus* in verschiedenen Bioreaktorsystemen. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in verschiedenen Bioreaktorsystemen durchgeführt (vgl. Kapitel 3.5.1).

Bei *N. muscorum* wurden andere Ergebnisse ermittelt. Bei diesen Cyanobakterien wird submers deutlich mehr Biomasse gebildet. Im Schüttelkolben liegt die Produktivität bei 0,24 $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$, in der Blasensäule bei 0,06 $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ und im Rührreaktor bei 0,03 $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Im Vergleich dazu betrug die Produktivität im emersen Photobioreaktor 0,03 $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$, was nur 1/8 der maximalen Produktivität des Schüttelkolbens ist.

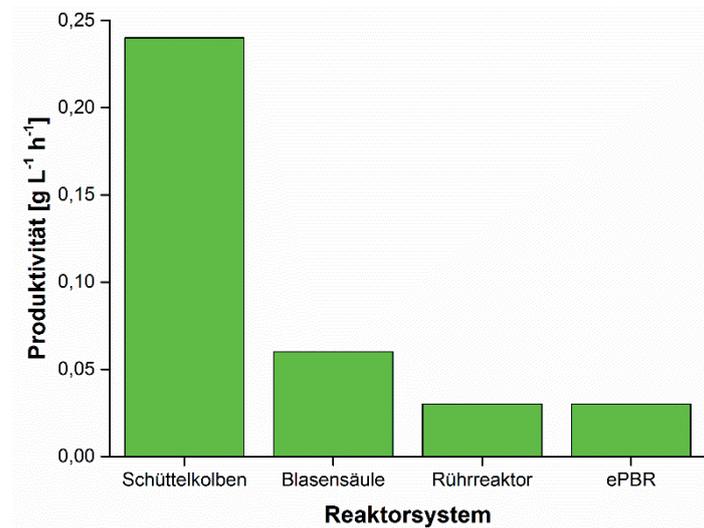


Abbildung 90: Übersicht der Produktivität der Biomassebildung von *Nostoc muscorum* in verschiedenen Bioreaktorsystemen. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in verschiedenen Bioreaktorsystemen durchgeführt (Vgl. Kapitel 3.5.1).

Neben der Photosynthese und der Versorgung der Zellen mit CO_2 spielt für das Wachstum der Zellen auch die Versorgung mit Nährstoffen, wie z. B: Stickstoff, Phosphat, eine große Rolle (Schopfer&Brennicke 2010). Dazu kommt die während der Kultivierung verfügbare



Lichtmenge der Zellen (Pulz&Scheibenbogen 1998). Während unter emersen Bedingungen die Photosynthese deutlich schneller ablaufen kann (Johnson et al. 1974) und die Versorgung mit CO₂ erheblich besser ist, sind die anderen Faktoren direkt von der Durchmischung der Kultur abhängig. Bei einer emersen Kultivierung wachsen die Cyanobakterien zwangsläufig nach einer bestimmten Zeit nicht nur zweidimensional auf der Oberfläche, sondern auch in mehreren Schichten übereinander. Da keine Durchmischung stattfindet, werden diejenigen Zellen, die räumlich weiter von den Nährstoffen entfernt wachsen, in dieser Beziehung im Wachstum limitiert. Das gleiche gilt für die Beleuchtung der Zellen. Während die Zellen, die direkt auf der Kultivierungsoberfläche des ePBR wachsen, optimal mit Licht versorgt werden, ist dies bei räumlich weiter entfernten Zellen nicht der Fall. Bei einer submersen Kultivierung erfolgt dagegen aufgrund der Durchmischung eine gleichmäßige Beleuchtung aller Zellen. So ist es zu erklären, dass zwar die Wachstumsraten im ePBR vergleichbar oder sogar höher sind als in submersen Systemen, aber die Produktivität der Biomassebildung trotzdem geringer. Zur industriellen Produktion von Biomasse aus Cyanobakterien ist keines der untersuchten Systeme geeignet. Üblicherweise wird die reine Biomasse in Open Ponds oder offenen Gewässern produziert (siehe Kapitel 3.2.1) (Milledge 2011), da die hier untersuchten Bioreaktoren für die weltweite Produktion von mehreren Hundert Tonnen pro Jahr zu teuer sind.

3.10.2 Photopigmente

Die Photopigmente Chlorophyll a und Carotinoide gehören zu den weiteren biotechnologischen Wertstoffen, die mit Cyanobakterien hergestellt werden können. Nachfolgend sollen daher die maximalen Gehalte an Photopigmenten von *T. sociatus* und *N. muscorum* bei einer submersen und emersen Kultivierung verglichen werden. Verglichen wird jeweils die Pigmentsynthese bei optimalen Wachstumsbedingungen. Die submersen Ergebnisse wurden im Schüttelkolben bei einem organismusspezifischen optimalen pH-Wert ermittelt (Kapitel 3.5.2) und sind in Abbildung 91 dargestellt.

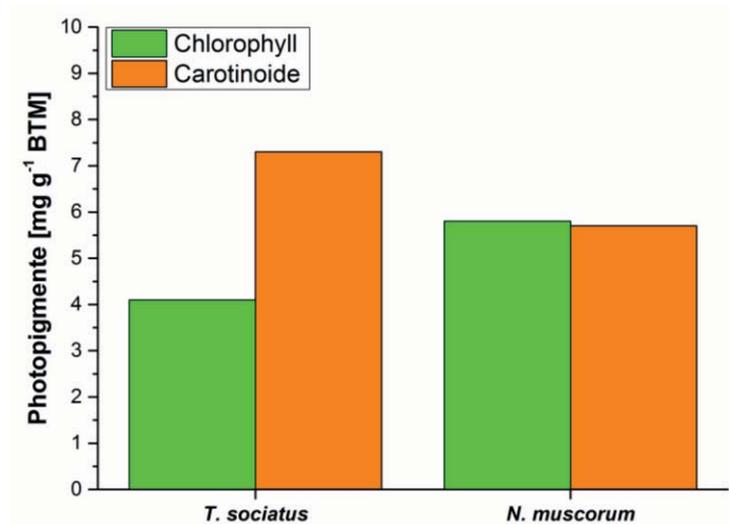


Abbildung 91: Übersicht der gebildeten Photopigmente Chlorophyll a und Carotinoide bei einer submersen Kultivierung. Die Experimente wurden bei 24 °C, 120 rpm, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 50 mL durchgeführt. Für *N. muscorum* wurde ein pH-Wert von 6 verwendet und für *T. sociatus* ein pH-Wert von 8.

T. sociatus bildete submers maximal 4,1 mg g⁻¹ Chlorophyll a und 7,3 mg g⁻¹ Carotinoide. *N. muscorum* bildete von beiden Photopigmenten in etwa gleich viel, mit 5,8 mg g⁻¹ Chlorophyll a und 5,7 mg g⁻¹ Carotinoiden.

Die Ergebnisse der emersen Kultivierung repräsentieren den Gehalt an Photopigmenten bei einer Zugabe von 16 mL Aerosol pro Tag (Kapitel 3.9.3) und sind in Abbildung 92 dargestellt. Unter emersen Bedingungen bildete *T. sociatus* 0,77 mg g⁻¹ Chlorophyll a und 0,61 mg g⁻¹ Carotinoide. Bei *N. muscorum* wurden maximal 1,79 mg g⁻¹ Chlorophyll a und 1,55 mg g⁻¹ Carotinoide ermittelt.

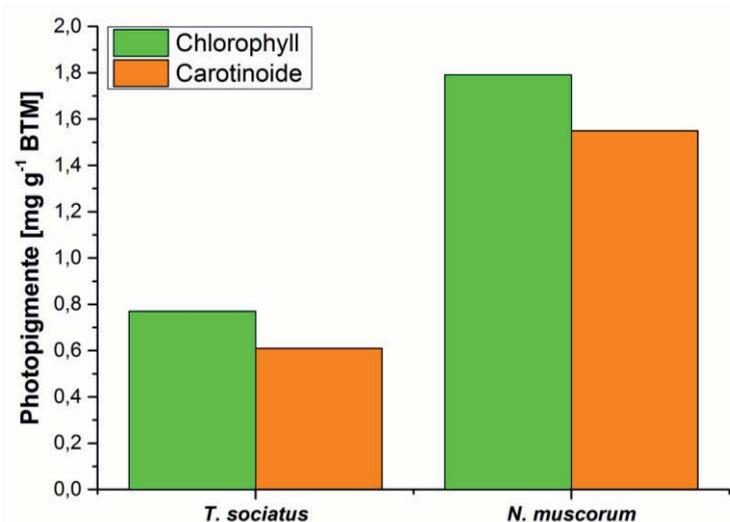


Abbildung 92: Übersicht der gebildeten Photopigmente Chlorophyll a und Carotinoide bei einer emersen Kultivierung. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Zugabe von 16 mL Aerosol aus BG 11-Medium pro Tag, über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt.

Submers werden demnach deutlich mehr Photopigmente gebildet. Bei *T. sociatus* wurde submers die 5fache Menge an Chlorophyll a und die 12fache Menge Carotinoide gebildet, bei *N. muscorum* wurde submers von beiden Photopigmenten die 3,5fache Menge gebildet.

Wie bereits in Kapitel 3.9.3 beschrieben, wurde grundsätzlich erwartet, dass bei Bedingungen, die schlecht für das Wachstum sind, mehr Photopigmente gebildet werden. Laut Campbel und Stokes stehen die Chlorophyll a- und Carotinoidsynthese, sowie die damit verbundene Erhöhung der photosynthetischen Aktivität und ATP-Produktion in engem Zusammenhang mit abiotischen und biotischen Stressfaktoren (Campbel&Stokes 1985). Dies konnte bereits am Beispiel des Trockenstresses gezeigt werden (Kapitel 3.9.3), wodurch die Pigmentsynthese im ePBR nahezu verdoppelt werden konnte. Der gleiche Effekt konnte anhand eines pessimalen pH-Wertes im Schüttelkolben beobachtet werden. Die Pigmentsynthese bei *T. sociatus* war bei Chlorophyll a 3mal so hoch und konnte auch bei den Carotinoiden um 50 % gesteigert werden. Bei *N. muscorum* wurde bei einem pessimalen pH-Wert die doppelte Menge an Chlorophyll a und Carotinoiden gebildet. Whitton und Sinclair zeigten eine Veränderung der Zellstruktur von *N. muscorum* unter extremen Wachstumsbedingungen (Whitton&Sinclair 1975). Sie wiesen eine Reorganisation des Photosyntheseapparates und eine Umverteilung der Photopigmente nach (Blumwald&Tel-Or 1982). So wurde beispielsweise die Phycobilisomsynthese verringert und die Synthese von Chlorophyll a und Carotinoiden verstärkt (Blumwald&Tel-Or 1982), was in dieser Arbeit anhand von Kapitel 3.9.3 gezeigt werden konnte. Des Weiteren können Cyanobakterien compatible Solute bilden, um den pH-Wert der Umgebung gezielt zu verändern (siehe Kapitel 3.5.2). Diese bestehen meistens aus Aminosäuren oder Zuckern wie

Trehalose oder Saccharose (Antranikian 2005). Eine Akkumulierung von Zuckern wurde von Blumwald und Mitarbeitern bei Untersuchungen mit *N. muscorum* unter Einfluss von unterschiedlichen Salinitäten nachgewiesen (Blumwald&Tel-Or 1982). Das bei allen Versuchen nahezu identische Verhältnis von Chlorophyll a und Carotinoiden ist nötig, um eine optimale Photosyntheseleistung zu gewährleisten (Vogel et al. 2010). Auch diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (siehe Abbildung 91 und Abbildung 92, sowie Kapitel 3.9.3).

Generell können also Stressfaktoren genutzt werden, um die Synthese der Photopigmente gezielt zu erhöhen. Ob sich dies durchsetzt, ist allerdings fraglich, da die Photopigmente üblicherweise aus kommerziellen Gründen aus Biomasse gewonnen werden, die in Open Ponds oder offenen Gewässern gebildet wurden. Bei diesen Arten der Kultivierung ist eine Regelung des pH-Wertes oder die Induzierung eines Trockenstress nicht möglich.

3.10.3 EPS

Neben der Biomasse und den Photopigmenten stellt die EPS das interessanteste biotechnologische Produkt aus Cyanobakterien dar. Da die erstgenannten Produkte nicht wirtschaftlich konkurrenzfähig in den untersuchten Bioreaktoren hergestellt werden können, liegt das Augenmerk besonders auf der EPS. Diese ist vor allem durch die breiten pharmazeutischen Anwendungsmöglichkeiten interessant (Patterson et al. 1993). Daher muss die Herstellung von EPS gewissen Standards genügen, die in Massenkultursystemen wie den Open Ponds nicht zu realisieren sind. Aufgrund dessen und des hohen Verkaufspreises lohnen sich auch Produktionen in kleinerem Maßstab. Da die Bildung von EPS darüber hinaus durch einen Trockenstress induziert werden kann, was in submersen Systemen unmöglich ist, wurde im Bezug zu dem neuen Photobioreaktor in dieser Arbeit vor allem auf dieses Produkt der Fokus gerichtet. Daher wird in den nachfolgenden Abschnitten besonders auf die Optimierung der EPS-Produktion eingegangen.

3.10.3.1 Einfluss des pH-Wertes auf die EPS-Produktion

Da EPS grundsätzlich zum Schutz der Zelle vor biotischem oder abiotischem Stress gebildet werden (Moreno et al. 1998), wurde neben dem Trockenstress (Kapitel 3.9.4) auch der Einfluss des pH-Wertes auf die EPS-Produktion untersucht. Singh und Kollegen konnten diesen Effekt bereits für verschiedene Organismen belegen (Singh&Das 2011). Daher wurden *T. sociatus* und *N. muscorum* bei verschiedenen pH-Werten im Schüttelkolben kultiviert und am Ende der Kultivierung jeweils die gebildete EPS untersucht. Die Versuchsbedingungen entsprechen den



Versuchen aus Kapitel 3.5.2. Die Ergebnisse sind für *T. sociatus* in Abbildung 93 und für *N. muscorum* in Abbildung 94 dargestellt.

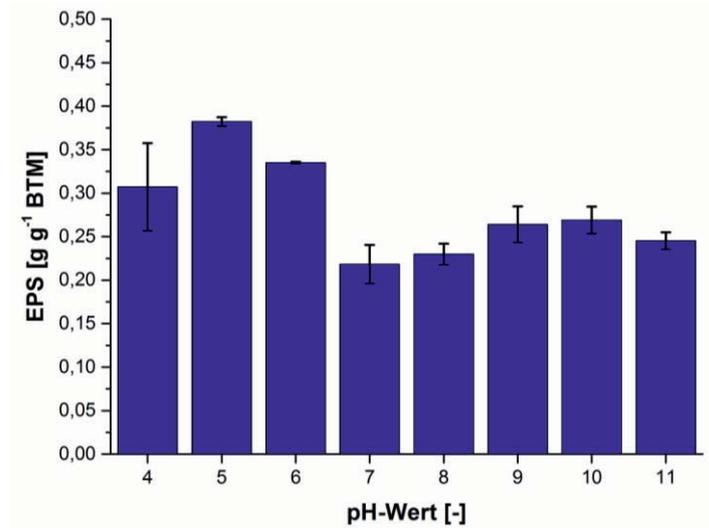


Abbildung 93: EPS-Produktion in Abhängigkeit von dem pH-Wert am Beispiel von *T. sociatus*. Die Experimente wurden bei 24 °C, 120 rpm, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 50 mL durchgeführt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der pH-Wert einen Einfluss auf die Bildung der EPS hat. Unter optimalen Wachstumsbedingungen (pH 8 *T. sociatus*) wird am wenigsten EPS gebildet (0,22 g g⁻¹ BTM). Bei pessimalen pH-Werten nimmt die Bildung der EPS bis zu einem Maximum von 0,38 g g⁻¹ BTM bei pH 5 zu. Auch bei alkalischen pH-Werten kann eine Zunahme der EPS-Produktion beobachtet werden, welche allerdings geringer als bei sauren pH-Werten ist und maximal 0,26 g g⁻¹ BTM bei pH 10 erreicht.

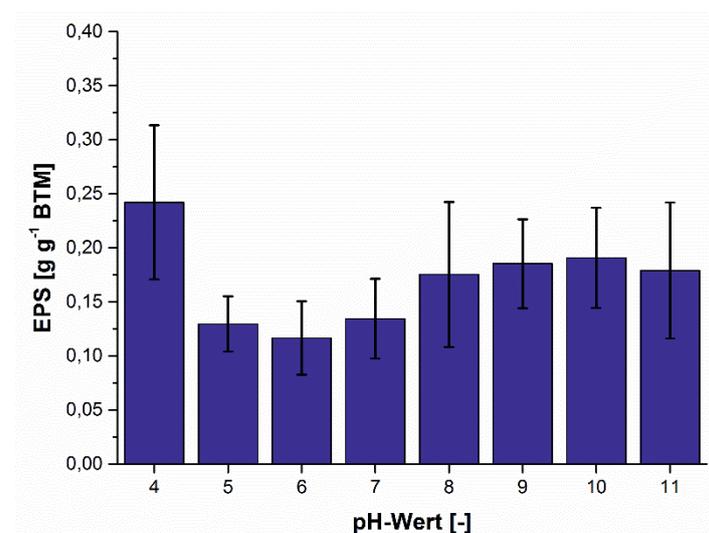


Abbildung 94: EPS-Produktion in Abhängigkeit von dem pH-Wert am Beispiel von *N. muscorum*. Die Experimente wurden bei 24 °C, 120 rpm, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 50 mL durchgeführt.

Bei *N. muscorum* kann der gleiche Effekt beobachtet werden. Unter optimalen Bedingungen für das Wachstum (pH 6) wird die geringste Menge an EPS gebildet ($0,11 \text{ g g}^{-1} \text{ BTM}$). Die maximale Produktion wurde auch bei diesem Stamm im sauren pH-Bereich bei pH 4 mit $0,24 \text{ g g}^{-1} \text{ BTM}$ erreicht. Im alkalischen Bereich liegt das Maximum mit $0,19 \text{ g g}^{-1} \text{ BTM}$ ebenfalls bei pH 10. Durch die Verwendung eines suboptimalen pH-Wertes für die Kultivierung kann die Produktion von EPS demnach bei *T. sociatus* um 73 % und um 118 % bei *N. muscorum* gesteigert werden.

Die Ergebnisse entsprechen bei beiden Cyanobakterien den Erwartungen, da die EPS-Produktion durch einen pessimalen pH-Wert gesteigert werden konnte und jeweils bei den optimalen pH-Werten für das Wachstum am niedrigsten war. Die höchste EPS-Produktion von *T. sociatus* konnte bei pH 5 festgestellt werden. Bei pH 4 nahm diese wieder deutlich ab, was vermutlich daran liegt, dass pH 4 außerhalb des Toleranzbereichs liegt und eine längere Inkubationszeit zum Zelltod geführt hätte. Diese Theorie wird sowohl durch die hohen Standardabweichungen bei den Wachstumsraten als auch durch die niedrigen Gehalte an Chlorophyll a und Carotinoiden unterstützt. Den gleichen Unterschied zwischen pH 4 und 5 zeigten bereits Singh und Kollegen für verschiedene Organismen, allerdings wurden keine Angaben zu der genauen Menge an produzierter EPS gemacht (Singh&Das 2011). Bei *N. muscorum* war die EPS-Produktion bei pH 6 am niedrigsten und nahm von dort aus mit steigendem und fallendem pH zu. Singh und Kollegen publizierten für *N. muscorum* unter Laborbedingungen einen EPS-Gehalt von 26 mg L^{-1} nach einer Inkubationszeit von 44 Tagen (Singh&Das 2011). Da keine Angaben über die zugrunde liegenden Biomassen gemacht werden, ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Des Weiteren fehlen die genauen Werte der EPS-Produktionen bei verschiedenen pH-Werten und eine organismusspezifische Auswertung.

Die Cyanobakterien bildeten jeweils dann am meisten EPS, wenn das Wachstum am geringsten war. Dies zeigt, dass die Konzentration an OH^- - bzw. H^+ -Ionen und der damit zusammenhängende Mangel an Nährstoffen und osmotischem Druck einen Stressfaktor darstellten, wodurch die EPS-Produktion angeregt wurde.

Da submers jedoch wenig EPS gebildet bzw. diese im umgebenden Medium gelöst werden, kann keine Schutzschicht ausgebildet werden.

3.10.3.2 Optimierung der submersen EPS-Produktion mit DoE

Da es neben dem pH-Wert noch weitere Faktoren gibt, die potentiell einen Stressfaktor darstellen können, wurde erweiternd zu dem vorherigen Kapitel der Einfluss der Temperatur,



des Gehaltes an Mineralsalzen, der Lichtstärke, der CO₂-Konzentration der Begasung und des pH-Wertes mittels DoE untersucht. Die Ergebnisse des D-optimalen Versuchsplanes (Anhang A3) wurden mittels multipler Regression hinsichtlich der gebildeten EPS ausgewertet. Die Versuchsbedingungen waren identisch zu dem DoE aus Kapitel 3.6.2. Die Ergebnisse sind am Beispiel von *N. muscorum* in Abbildung 95 dargestellt.

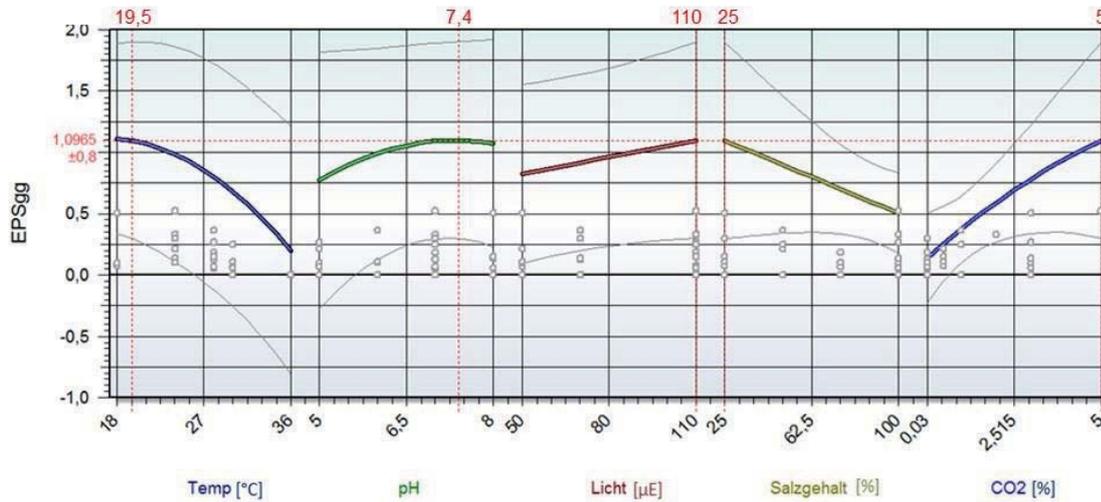


Abbildung 95: Ergebnisse des DoE zur Optimierung der submersen EPS-Produktion von *N. muscorum*. Die jeweiligen ermittelten Optima sind in „rot“ über dem betreffenden Faktor markiert.

Für *N. muscorum* konnten hinsichtlich der submersen EPS-Produktion Optima bei einer Temperatur von 19,5 °C, einem pH-Wert von 7,4, einer Lichtstärke von 110 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, einem Gehalt an Mineralsalzen von 25 % und einer CO₂-Konzentration von 5 %-Vol. ermittelt werden. Bei diesen Bedingungen würde sich laut dem Modell ($R^2 = 0,887$) theoretisch ein EPS-Gehalt von 1,09 g g^{-1} BTM erreichen lassen. Die einzelnen p-values der Einflussparameter sind in Tabelle 19 dargestellt. Demnach hat außer der Temperatur keiner der Parameter einen signifikanten Einfluss auf die Bildung von EPS.

Tabelle 19: p-Values der Einflussparameter auf die submersen EPS-Produktion von *N. muscorum*. Werte über 0,05 sind nicht signifikant.

Parameter	p-Value
Lichtstärke	0,436
Gehalt an Mineralsalzen	0,097
pH-Wert	0,679
Temperatur	0,011

Es wurde aufgrund eigener Vorversuche und den Veröffentlichungen von Singh (Singh&Das 2011) und Moreno (Moreno et al. 1998) erwartet, dass die EPS-Produktion bei Bedingungen, die negativ für das Wachstum sind, gesteigert werden kann. Anhand des pH-Wertes konnte dies bereits gezeigt werden. Diese Erwartungen konnten erfüllt werden, da sich die Optima für das Wachstum von *N. muscorum* (Kapitel 3.6.2) deutlich von den Optima der EPS-Produktion unterscheiden. Dies wird insbesondere bei dem pH-Wert, der Temperatur und dem Gehalt an Mineralsalzen deutlich. Hier lagen die Optima für das Wachstum bei einem pH-Wert von 6,5 einer Temperatur von 24,5 °C und ein Mineralsalzgehalt von 100 %. Dass niedrige Temperaturen die Bildung von EPS induzieren, wurde bereits von Hu und Kollegen beobachtet (Hu et al. 2003). Die EPS bilden eine Schutzhülle um die Zelle, so dass die Temperaturen im Inneren länger aufrechterhalten werden können. Der gleiche Effekt wurde auch bei erhöhten Temperaturen erwartet, konnte allerdings nicht beobachtet werden. Dies liegt vermutlich daran, dass sich die EPS grundsätzlich auch zu einem Teil im umgebenden Medium lösen (Dai et al. 2013). Die Löslichkeit ist abhängig von der Beschaffenheit des Mediums im Hinblick auf die Salz- und Ionenkonzentration, den pH-Wert und die Temperatur. Mit steigender Temperatur nimmt die Löslichkeit der EPS im Medium zu, wodurch bei der Extraktion weniger EPS bestimmt werden konnte als bei niedrigen Temperaturen. EPS wirkt des Weiteren als Speicher von Nährstoffen. So können unter natürlichen Bedingungen Nährstoffe bei Verfügbarkeit gespeichert- und bei Mangel wieder aus der Reserve bezogen werden (Allison et al. 1936, Sinha et al. 2002). Das gleiche Prinzip tritt bei einem hohen CO₂-Gehalt in Kraft, bei dem Cyanobakterien Kohlenstoff für den CCM gezielt anreichern (Badger&Price 2003). So ist zu erklären, warum eine geringe Verfügbarkeit von Mineralsalzen und eine hohe Konzentration von CO₂ in der Begasung die Bildung von EPS fördern. Der positive Einfluss eines pessimalen pH-Wertes auf die Produktion von EPS wurde bereits in dem vorherigen Abschnitt erläutert und konnte durch die Ergebnisse des DoE bestätigt werden. Dass das Optimum nicht im sauren pH-Bereich liegt, liegt vermutlich an den Wechselwirkungen mit den anderen Einflussgrößen wie der Temperatur, der CO₂-Konzentration und den Mineralsalzen. Die Lichtstärke kann einen großen Einfluss auf die EPS-Bildung haben, da die EPS bei hohen Lichtstärken Zellschäden entgegen wirkt (Dai et al. 2013) und unter natürlichen Bedingungen Schutz vor UV-B- und UV-C Strahlungen liefert (Lan et al. 2010). Dass die Lichtstärke in den betrachteten Versuchen so gut wie keinen Einfluss auf die EPS Bildung hat, liegt daran, dass die verwendete Lichtstärke viel zu gering ist, um die Bildung von EPS zu induzieren. Ein Optimum der Lichtstärke für das Wachstum von *N. muscorum* liegt vermutlich bei ca. 700 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Kapitel 3.5.4), was gut sechsmal so hoch ist wie die verwendete Lichtstärke. Unter natürlichen Bedingungen treten bei



vielen terrestrischen Cyanobakterien maximale Lichtstärken von bis zu $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf (Lakatos et al. 2001). Um einen Einfluss der Lichtstärke auf die EPS-Bildung zu erkennen, müssten demnach sehr viel höhere Lichtstärken getestet werden, was während dieser Arbeit technisch nicht möglich war. Der größte Einflussfaktor auf die Bildung von EPS ist der Trockenstress (Moreno et al. 1998, Lan et al. 2010, Rajeev et al. 2013), der submers nicht untersucht werden kann. Daher werden in dem folgenden Abschnitt die Produktivitäten der submersen Kultivierungen mit der emersen Kultivierung verglichen.

3.10.3.3 Vergleich der submersen und emersen EPS-Produktion

Da laut diversen Publikationen der Trockenstress als Hauptauslöser der EPS-Bildung gilt, wird in diesem Abschnitt die Produktivität der submersen, der optimierten submersen und der emersen Kultivierung vergleichend gegenübergestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 96 dargestellt. Die Produktivitäten im ePBR beziehen sich auf die Versuche mit *T. sociatus* aus Kapitel 3.9.4, die Produktivitäten im Schüttelkolben beziehen sich auf die Versuche mit *N. muscorum* aus Kapitel 3.10.3.1 und die Produktivitäten im Rührreaktor auf die Versuche mit *N. muscorum* aus Kapitel 3.10.3.2. Das * kennzeichnet jeweils die optimale EPS-Produktion im Schüttelkolben bei pH 4 und im Rührreaktor die theoretisch maximal mögliche EPS-Produktion, die durch das Modell errechnet wurde. Produktivitäten ohne * wurden bei den Bedingungen des optimalen Wachstums des Organismus berechnet. Als weiterer Vergleich ist die Produktivität von *N. muscorum* im ePBR unter optimalen Versuchsbedingungen dargestellt.

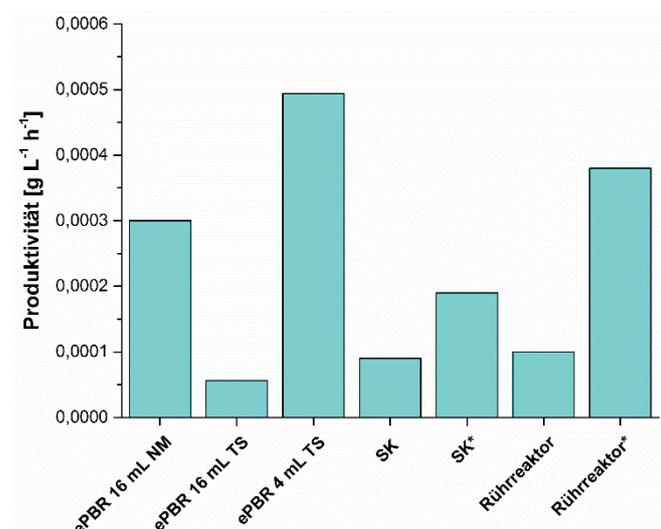


Abbildung 96: Vergleich der Produktivitäten der verschiedenen Kultivierungssysteme unter optimalen Bedingungen für das Wachstum und die EPS-Produktion. Die Experimente wurden bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$, einer Lichtstärke von $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in verschiedenen Bioreaktorsystemen durchgeführt (vgl. Kapitel 3.9.4 für die Versuche im ePBR, Kapitel 3.10.3.1 für die Versuche im Schüttelkolben und Kapitel 3.10.3.2 für die Versuche im Rührreaktor).

Anhand von Abbildung 96 kann man mehrere Rückschlüsse ziehen. Anhand der Ergebnisse der Kapitel 3.10.3.1 und 3.10.3.2 wurde erwartet, dass neben dem eigentlichen Gehalt an EPS pro g BTM auch die Produktivität gesteigert werden kann. Diese Erwartung konnte erfüllt werden, da durch die Veränderung des pH-Wertes im Schüttelkolben die Produktivität ca. verdoppelt werden konnte. Durch DoE kann die Produktivität theoretisch um das 4fache gesteigert werden durch Einbeziehung von weiteren Einflussfaktoren wie Temperatur, Gehalt an Mineralsalzen und die CO₂-Konzentration der Begasung. Ob diese Ergebnisse tatsächlich in der Praxis erreicht werden können, muss noch ermittelt werden. Interessant ist dabei, dass die Produktivität von *N. muscorum* bei optimalen Wachstumsbedingungen submers im Schüttelkolben und Rührreaktor nahezu identisch sind. Dieses Ergebnis wurde insofern erwartet, als dass die sonstigen Bedingungen für das Wachstum identisch waren bzw. in einem Bereich, wo kein Stress auf das Cyanobakterium ausgeübt wird. Selbst wenn die Bedingungen nicht dem globalen Optimum für Zellwachstum entsprechen, wird EPS nur dann gebildet, wenn der Organismus biotischem oder abiotischem Stress ausgesetzt ist. Da dies nicht der Fall war, wurde demnach auch die gleiche Produktivität hinsichtlich EPS erwartet. Wie zuvor erwähnt, ist Trockenstress hauptverantwortlich für die Produktion von EPS. Daher wurde erwartet, dass selbst nach einer Optimierung der submersen EPS –Produktion in dem emersen Photobioreaktor eine höhere Produktivität erreicht werden kann. Diese Erwartungen wurden erfüllt, da *N. muscorum* selbst unter bis dato optimalen Wachstumsbedingungen nahezu genauso produktiv ist wie das theoretische submerse Maximum. Obwohl *T. sociatus* unter den gleichen Bedingungen wie *N. muscorum* nur 1/5 der Produktivität ausweist, kann durch die gezielte Induzierung von Trockenstress die Produktivität fast um das 10fache erhöht werden. Wenn man für *N. muscorum* eine Zunahme in der gleichen Größenordnung annimmt, müsste eine Produktivität von 0,003 g L⁻¹ h⁻¹ erreicht werden können. Dies würde dann nicht nur deutlich besser sein als das Maximum der submersen Produktivität, sondern bislang höchsten publizierten EPS-Produktivitäten von marinen Cyanobakterien entsprechen (De Philippis & Vincenzini 1998). Wenn es gelingt, diesen Wert durch DoE für die Kultivierung im ePBR noch weiter zu steigern, würden auch die Erwartungen hinsichtlich der EPS-Produktion von terrestrischen Cyanobakterien erfüllt. Hier wird davon ausgegangen, dass gerade diese Cyanobakterien durch ihre Herkunft aus ariden Habitaten dazu in der Lage sind, mehr EPS zu bilden als marine Cyanobakterien.



3.10.3.4 Vergleich der Zusammensetzung der unter submersen und emersen Bedingungen gebildeten EPS

Da neben der eigentlichen Menge an EPS vor allem die Inhaltsstoffe von Interesse sind, wurde die Zusammensetzung der isolierten EPS aus einer submersen und einer emersen verglichen. Die Ergebnisse sind für *T. sociatus* in Abbildung 97 dargestellt und für *N. muscorum* in Abbildung 98. Die zur Analyse verwendeten photometrischen Methoden sind im Anhang A.3 beschrieben. Es ist in beiden Abbildungen deutlich zu erkennen, dass eine genaue Bestimmung der Bestandteile anhand der verwendeten Methoden nicht möglich ist. Die Standardabweichungen sind so groß, dass das Ergebnis teilweise Schwankungen von bis zu 100 % hat.

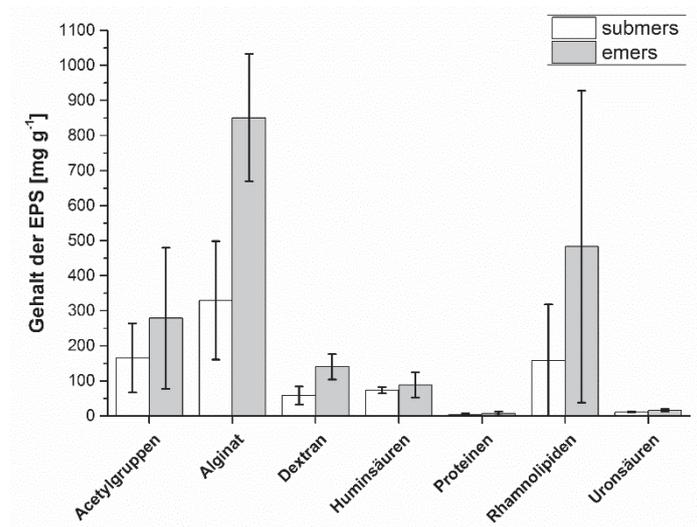


Abbildung 97: Vergleich der EPS-Zusammensetzung nach submerser und emerser Kultivierung von *T. sociatus*. Wenn man aufgrund der großen Schwankungen den absoluten Gehalt außer Acht lässt und nur den relativen Gehalt betrachtet, sind die Hauptbestandteile von *T. sociatus* Polysaccharide und Lipide. Durch eine emerse Kultivierung nimmt der Gehalt an Alginat und Lipiden stark zu. Bei allen anderen Bestandteilen kann kein Effekt dieser Größenordnung beobachtet werden.

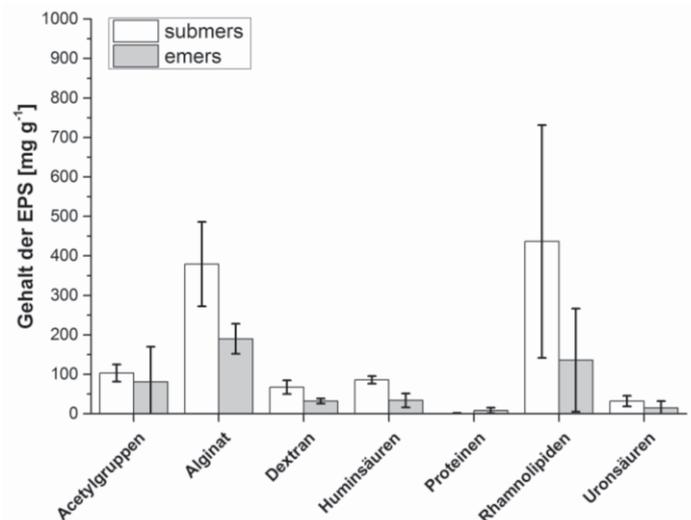


Abbildung 98: Vergleich der EPS-Zusammensetzung nach submerser und emerser Kultivierung von *N. muscorum*.

Wie bei *T. sociatus* sind bei *N. muscorum* die Hauptbestandteile Polysaccharide und Lipide. Durch eine emerse Kultivierung scheint hier der Gehalt aller Bestandteile eher zurück zu gehen, bzw. unverändert zu bleiben. Nach Flemming und Wingender (Flemming&Wingender 2003) wird in etwa folgende Zusammensetzung der submersen EPS erwartet:

Polysaccharide	40-95 %
Proteine	< 1-60 %
Nukleinsäuren	< 1-10 %
Lipide	< 1-40 %

Diese Erwartungen konnten bei der submersen EPS der Cyanobakterien in etwa erfüllt werden. So lag der Gehalt an Polysacchariden bei *T. sociatus* zwischen 40 und 95 % und bei *N. muscorum* zwischen 20 und 40 %. Auch der Proteingehalt lag bei beiden Cyanobakterien unter 1 %. Ebenso lag der Gehalt an Lipiden bei *T. sociatus* um die 20 % und bei *N. muscorum* bei etwa 40 %, was den Erwartungen entspricht. Die potentielle Zunahme von Alginat und Lipiden bei einer emersen Kultivierung wäre insofern erwartet, als dass Alginat zur Speicherung von Wasser dient. Durch den größeren Trockenstress einer emersen Kultivierung wäre also die Synthese von Alginat sinnvoll. Das gleiche gilt für die Lipide, die bei Trockenheit in größerer Menge gebraucht werden. Wie bereits in Kapitel 3.9.3 beschrieben, sind die photometrischen Methoden aber relativ ungenau und sollten bei weiteren Versuchen durch Methoden mit einer höheren Genauigkeit ersetzt werden, um genauere Aussagen treffen zu können. Aufgrund der vorliegenden Daten muss davon ausgegangen werden, dass die EPS-



Zusammensetzung aus submerser und emerser Kultivierung nahezu identisch ist. Geringe Abweichungen wurden nur bei *T. sociatus* beobachtet.

3.11 Zusammenfassung

Bislang waren die verfahrenstechnischen Kultivierungsoptima der verwendeten Stämme von *T. sociatus* und *N. muscorum* nicht bekannt. Einige wenige Anhaltspunkte basierten größtenteils auf Messungen in dem natürlichen Habitat. Darauf aufbauend wurde zunächst eine One-factor-at-a-time-Optimierung des Leistungseintrages, des pH-Wertes, der Temperatur, der Lichtstärke und der CO₂-Konzentration der Begasung durchgeführt. Bei dem Leistungseintrag konnte kein klares Optimum bestimmt werden, da die beobachteten Unterschiede der Wachstumsraten eher auf die Versorgung mit CO₂ zurück zu führen waren als auf den eingebrachten Leistungseintrag. Trotzdem konnte bei dem höchsten Leistungseintrag (1,5 kW m⁻³) im Rührreaktor auch die größte Wachstumsrate ermittelt werden. Auch das Optimum der Lichtstärke konnte nicht abschließend bestimmt werden, die Ergebnisse der gemessenen Lichtkurve deuten allerdings auf ein Optimum bei ca. 700 μE m⁻² s⁻¹ hin. Bei den anderen Parametern ergab sich organismusspezifisch pH 8, 30 °C und 2 %-Vol. CO₂ für *T. sociatus* sowie pH 6, 24-30 °C und 5 %-Vol. CO₂ für *N. muscorum*. Da man diese Parameter aufgrund der auftretenden Wechselwirkungen nicht gesondert betrachten kann, wurden sie zusätzlich anhand eines DoE am Beispiel von *N. muscorum* submers überprüft. Zusätzlich wurde der Einfluss des Gehaltes an Mineralsalzen im Medium bestimmt. Durch eine Analyse der Daten mit multipler-Regression ergaben sich Optima für *N. muscorum* bei einer Lichtstärke von 110 μE m⁻² s⁻¹, einem CO₂-Gehalt von 2,97 %-Vol., einem Mineralsalzgehalt von 100 %, einem pH-Wert von 6,5 und einer Temperatur von 24,5 °C. Höhere Lichtstärken als 110 μE m⁻² s⁻¹ waren technisch nicht realisierbar, so dass das aus der Lichtkurve ermittelte globale Optimum von 700 μE m⁻² s⁻¹ nicht getestet werden konnte. Auf diesen Daten aufbauend wurde ein mathematisches Modell des Wachstums von *N. muscorum* entwickelt, das die experimentell bestimmten Daten bei verschiedenen Versuchen mit einer Genauigkeit von mindestens 83 % beschreibt. Für das emerse Wachstum von *N. muscorum* wurde durch DoE Optima bei einem pH-Wert von 7,1, einem Mineralsalzgehalt von 100 %, einer Lichtstärke von 110 μE m⁻² s⁻¹ und einer Temperatur von 30 °C ermittelt. Für die Lichtstärke gilt hier das Gleiche wie unter submersen Bedingungen. Eine Überprüfung der CO₂-Konzentration war technisch nicht möglich. Zu den biotechnologisch interessanten Produkten von Cyanobakterien zählen die Biomasse, die Photopigmente sowie die gebildete EPS. Unter submersen Bedingungen bildete *T. sociatus* maximal 8g Biomasse, 4,1 mg g⁻¹ BTM Chlorophyll a, 7,3 mg g⁻¹ BTM Carotinoide und 0,38 g g⁻¹ BTM EPS. Für *N. muscorum* wurden unter den

gleichen Bedingungen maximal 7 g Biomasse, 5,8 mg g⁻¹ BTM Chlorophyll a, 5,7 mg g⁻¹ BTM Carotinoide und 0,24 g g⁻¹ BTM EPS ermittelt. Die höchsten gemessenen Wachstumsraten lagen bei 0,14 h⁻¹ für *T. sociatus* sowie bei 0,12 h⁻¹ für *N. muscorum*. Um die terrestrischen Cyanobakterien unter natürlichen Bedingungen kultivieren und die Bildung von EPS als biotechnologisches Produkt gezielt steuern zu können, wurde als Highlight der Arbeit ein völlig neuartiger emerger Photobioreaktor entwickelt. Durch die Kultivierung der Cyanobakterien in diesem Reaktor konnten Wachstumsraten von 0,019 h⁻¹ bei *T. sociatus* und 0,021 h⁻¹ bei *N. muscorum* erzielt werden. Des Weiteren wurden maximal 1,07 mg g⁻¹ BTM Chlorophyll a und 0,97 mg g⁻¹ BTM Carotinoide bei *T. sociatus* und 3,15 mg g⁻¹ BTM Chlorophyll a sowie 3,31 mg g⁻¹ BTM Carotinoide bei *N. muscorum* gebildet. Hinsichtlich der EPS Produktion wurden maximal 0,499 g g⁻¹ BTM EPS und eine Produktivität von $4,94 \cdot 10^{-4}$ g L⁻¹ h⁻¹ bei *T. sociatus* und 0,38 g g⁻¹ BTM EPS sowie eine Produktivität von $3,0 \cdot 10^{-4}$ g L⁻¹ h⁻¹ bei *N. muscorum* ermittelt. Die höchste submersive Produktivität lag im Vergleich dazu bei $1,9 \cdot 10^{-4}$ g L⁻¹ h⁻¹ (*N. muscorum*). Nach den Ergebnissen des DoE sind submers bei *N. muscorum* theoretisch maximal $3,8 \cdot 10^{-4}$ g L⁻¹ h⁻¹ zu erreichen, dieses Ergebnis konnte aber bislang aufgrund der zeitlichen Beschränkung nicht experimentell bestätigt werden. Während submers aktuell mit beiden Cyanobakterien mehr Biomasse und Photopigmente hergestellt werden können, hat der emerger Photobioreaktor bei der Produktion der EPS ganz klare Vorteile. Obwohl dieser Prozess bislang kaum optimiert wurde, können hier durch die Auslösung eines Trockenstresses bereits deutlich höhere Produktivitäten im Vergleich zu dem submersen System erreicht werden.



4. Diskussion und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die phototrophe Kultivierung zur Produktion von biotechnologischen Wertstoffen am Beispiel von *Salvia officinalis* auf der einen Seite sowie den terrestrischen Cyanobakterien *T. sociatus* und *N. muscorum* auf der anderen Seite. *Salvia officinalis* kann zur Herstellung von Triterpenen verwendet werden, die einen pharmazeutisch interessanten Wirkstoff darstellen. Das Gleiche gilt für die Inhaltsstoffe der EPS von Cyanobakterien.

Bislang wurde *Salvia officinalis* entweder ausschließlich heterotroph oder mixotroph kultiviert. Eine Einordnung, welche Kultivierungsart welchen Einfluss auf die Triterpenbildung hat, erfolgte bislang nicht. Durch die vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass bei einer mixotrophen Kultivierung und einer Lichtstärke von $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ die höchste Produktivität erzielt werden kann. Durch Verwendung von Pektinase als Elicitor kann die Produktivität deutlich gesteigert werden und der aktuell größten Fehlerquelle (Schwankungen der Biomassebestimmung durch Wachstum in Zellagglomeraten) entgegengewirkt werden, was zu besseren und eindeutigeren Ergebnissen führt. Negative Auswirkungen von Pektinase auf die Zellvitalität konnten bei den untersuchten Gehalten nicht erkannt werden. Eine rein phototrophe Kultivierung konnte durch Vorversuche ausgeschlossen werden, nachdem es nach einer Fermentationszeit von 21 Tagen wiederholt zu keiner erkennbaren Zunahme der Biomasse gekommen war. Aufbauend auf den hier gezeigten Daten und der Veröffentlichung von Alkhamis und Kollegen sollten noch weitere Untersuchungen bei $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einem Pektinasegehalt von 0,1 % gemacht werden, da Suc 4 bei dieser Lichtstärke in anderen Versuchen am produktivsten war (Alkhamis&Qin 2013). Damit ließe sich auch eine weitere Verbesserung in Bezug auf die publizierte Arbeit von Bolta und Kollegen erreichen (Bolta et al. 2000). Weiteres Verbesserungspotential bietet die gezielte Optimierung des Kulturmediums, was bereits in der Literatur für den Wildtyp von *Salvia officinalis* gezeigt wurde, aber nicht Gegenstand dieser Arbeit war (Haas et al. 2014). Für zukünftige Arbeiten sollte zunächst der Genotyp der verwendeten Klone überprüft werden und die Inokulation der Hauptkulturen verbessert werden. Durch die Verwendung von Zellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen kommt es zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen in Bezug auf die Wachstumsraten. Dies kann durch eine Synchronisation der Zellzyklen und eine entsprechende Vorkultivierung verbessert werden. Trotz allem konnte die Produktivität der Triterpenproduktion durch eine mixotrophe Kultivierung im Vergleich zu publizierten Ergebnissen für den gleichen Stamm um das Dreifache und im direkten Vergleich zu einer heterotrophen Kultivierung sogar um das Zehnfache gesteigert werden.



Durch das Screening der Cyanobakterien und die Entwicklung eines neuen emersen Photobioreaktors sollte die Eignung dieser Organismen zur Produktion von biotechnologischen Wertstoffen demonstriert werden. Dabei zeigte sich, dass zur Produktion von Biomasse und Photopigmenten andere Stämme und vor allem andere Kultivierungstechniken geeigneter sind. Für beide Anwendungen werden üblicherweise Open Ponds verwendet, die große Massen an Cyanobakterien sehr günstig herstellen können. Damit auch Kultivierungen in kleineren Maßstäben konkurrenzfähig werden, müssen also bestimmte Anforderungen an das Produkt gegeben sein, die eine Kultivierung in offenen Systemen ausschließt. Dazu gehören z.B. die Sterilität und andere Anforderungen bei der Produktion von pharmazeutischen Wirkstoffen. Des Weiteren kann technisch in keinem submersen System ein Trockenstress ausgelöst werden, was der Hauptauslöser der EPS-Bildung bei terrestrischen Cyanobakterien ist. Beide Anforderungen werden in dem entwickelten Bioreaktor realisiert, wodurch bereits EPS-Produktivitäten in einem wenig optimierten Prozess erreicht wurden, die vergleichbar zu publizierten Werten sind. Durch Vorversuche und eine konsequente Optimierung wird davon ausgegangen, diese noch deutlich erhöhen zu können. Ansatzpunkte liefern hier die Verwendung von erhöhten CO₂-Konzentrationen in der Begasung des emersen Photobioreaktors, die Etablierung einer kontinuierlichen Prozessführung sowie die Verringerung des benötigten Kulturmediums. Je weniger Medium zur Herstellung des Produktes gebraucht wird, desto effizienter wird der Prozess. Bislang wurde das nicht verbrauchte Medium während der emersen Kultivierung zwar am Boden des Reaktors aufgefangen, eine Wiederverwertung fand jedoch noch nicht statt. In submersen batch-Prozessen ist die Menge an Medium jedoch konstant und eine Wiederverwertung nicht möglich. Auch ein Medienwechsel während der Kultivierung ist denkbar, um weitere Stoffwechselprozesse (durch versch. Inhaltsstoffe) gezielt steuern zu können. Es ist demnach gelungen, einen Photobioreaktor zu entwickeln, mit dem bestimmte Stoffwechselprozesse gezielt ausgelöst werden können, was bislang besonders bei der Produktion von EPS zum Tragen kommt. Durch die bereits erreichten Produktivitäten und die gegebenen Prozessmöglichkeiten (Sterilität, Effizienz, etc.) sollte als nächstes ein Scale-up durchgeführt werden, um produktionstechnisch den nächsten Schritt zu gehen. Gleichzeitig muss eine konsequente Optimierung der Kulturbedingungen erfolgen, um bereits publizierte Werte nicht nur einzustellen, sondern zu übertreffen. Das dafür nötige Potential ist vorhanden.

5. Literaturverzeichnis

(2006). *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, Wiley.

Abou-Waly, H. and E. Shabana (1993). "Recovery of *Nostoc muscorum* previously exposed to some triazine and phenylurea herbicides." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 50(5): 665-673.

Agawin, N. S. R. and S. Agusti (1997). "Abundance, frequency of dividing cells and growth rates of *Synechococcus* sp. (cyanobacteria) in the stratified Northwest Mediterranean Sea." *Journal of Plankton Research* 19(11): 1599-1615.

Ali, M. S., M. Jahangir, S. S. Hussan and M. I. Choudhary (2002). "Inhibition of alpha-glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives." *Phytochemistry* 60(3): 295-299.

Alkhamis, Y. and J. G. Qin (2013). "Cultivation of *Isochrysis galbana* in Phototrophic, Heterotrophic, and Mixotrophic Conditions." *Biomed Research International*.

Allison, F. E., S. R. Hoover and H. J. Morris (1936). "Physiological studies with the nitrogen fixing alga, *Nostoc muscorum*." *Botanical Gazette* 98: 433-463.

Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*, Elsevier/Academic Press.

Anderson, S. L. and L. McIntosh (1991). "Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process." *J Bacteriol* 173(9): 2761-2767.

Antranikian, G. (2005). *Angewandte Mikrobiologie*, Springer.

Ashley, J., S. R. Rushforth and J. R. Johansen (1985). "Soil algae of cryptogamic crusts from the Uintah Basin, Utah, U.S.A." *Great Basin Naturalist* 45(3): 432-442.

Avenidaño, M. d. C. and E. F. Valiente (1994). "Effect of Sodium on Phosphate Uptake in Unicellular and Filamentous Cyanobacteria." *Plant and Cell Physiology* 35(7): 1097-1101.

Azevedo, M. T. d. P. (1991). "Edaphic blue-green algae from the São Paulo Botanical Garden, Brazil." *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 64: 503-526.

Bäcker, W., H. J. Bart, F. Bischoff, S. Grabley, R. Goedecke, W. Johannisbauer, V. Jordan, R. Stockfleth, J. Strube and V. Wiesmet. (2015). "Phytoextrakte – Produkte und Prozesse." Retrieved 13.04.15, 2015, from http://www.processnet.org/processnet_media/Phytoextrakte-p-86.pdf.

Badger, M. R. and G. D. Price (2003). "CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution." *Journal of Experimental Botany* 54(383): 609-622.

Bahadur, A., M. Zubair and M. B. Khan (2013). "Design, construction and evaluation of solarized airlift tubular photobioreactor." 6th Vacuum and Surface Sciences Conference of Asia and Australia (Vasscaa-6) 439.

Balch, P. A. (2006). *Prescription for Nutritional Healing*, Avery.

Bald, D., J. Kruip and M. Rögner (1996). "Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: How is the phycobilisome connected with the photosystems?" *Photosynthesis Research* 49(2): 103-118.

Ballica, R. and D. D. Ryu (1993). "Effects of rheological properties and mass transfer on plant cell bioreactor performance: production of tropane alkaloids." *Biotechnol Bioeng* 42(10): 1181-1189.



- Banthorpe, D. V., H. J. Bilyard and G. D. Brown** (1989). "Enol Esters of Caffeic Acid in Several Genera of the Labiatae." *Phytochemistry* 28(8): 2109-2113.
- Barbaroux, M. and A. Sette** (2006). Properties of materials used in single-use flexible containers : Requirements and analysis. Duluth, MN, ETATS-UNIS, BioPharm International.
- Barz, W., S. Daniel, W. Hinderer, U. Jaques, H. Kessmann, J. Köster and K. Tiemann** (1988). Elicitation and Metabolism of Phytoalexins in Plant Cell Cultures. *Plant Cell Biotechnology*. M. S. Pais, F. Mavituna and J. M. Novais, Springer Berlin Heidelberg. 18: 211-230.
- Becker, W.** (2007). Microalgae in Human and Animal Nutrition. *Handbook of Microalgal Culture*, Blackwell Publishing Ltd: 312-351.
- Belnap, J.** (2002). "Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Utah, USA." *Biology and Fertility of Soils* 35(2): 128-135.
- Belnap, J. and J. S. Gardner** (1993). "Soil microstructure in soils of the Colorado Plateau: the role of the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*." *Great Basin Naturalist* 53(1): 40-47.
- Benedetti, S., F. Benvenuti, S. Scoglio and F. Canestrari** (2010). "Oxygen Radical Absorbance Capacity of Phycocyanin and Phycocyanobilin from the Food Supplement *Aphanizomenon flos-aquae*." *Journal of Medicinal Food* 13(1): 223-227.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, L. Stryer, B. Häcker and A. Held** (2007). *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Berlin, J. and F. Sasse** (1985). Selection and screening techniques for plant cell cultures. *Plant Cell Culture*, Springer Berlin Heidelberg. 31: 99-132.
- Bewley, C. A., K. R. Gustafson, M. R. Boyd, D. G. Covell, A. Bax, G. M. Clore and A. M. Gronenborn** (1998). "Solution structure of cyanovirin-N, a potent HIV-inactivating protein." *Nature Structural Biology* 5(7): 571-578.
- Bewley, C. A., K. R. Gustafson, M. R. Boyd, D. G. Covell, A. Bax, G. M. Clore and A. M. Gronenborn** (1998). "Solution structure of cyanovirin-N, a potent HIV-inactivating protein." *Nat Struct Biol* 5(7): 571-578.
- Bishayee, A., S. Ahmed, N. Brankov and M. Perloff** (2011). "Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer." *Front Biosci (Landmark Ed)* 16: 980-996.
- Blumenkrantz, N. and G. Asboe-Hansen** (1973). "New method for quantitative determination of uronic acids." *Analytical Biochemistry* 54(2): 484-489.
- Blumwald, E. and E. Tel-Or** (1982). "Osmoregulation and cell composition in salt-adaptation of *Nostoc muscorum*." *Archives of Microbiology* 132(2): 168-172.
- Böhme, K.** (2002). Regulation der Xanthophyllbiosynthese in *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae).
- Bolta, Z., D. Baricevic, B. Bohanec and S. Andrensek** (2000). "A preliminary investigation of ursolic acid in cell suspension culture of *Salvia officinalis*." *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 62(1): 57-63.
- Bolta, Z., D. Baricevic and P. Raspor** (2003). "Biomass segregation in sage cell suspension culture." *Biotechnol Lett* 25(1): 61-65.

- Bonarius, H. P., C. D. de Gooijer, J. Tramper and G. Schmid** (1995). "Determination of the respiration quotient in mammalian cell culture in bicarbonate buffered media." *Biotechnol Bioeng* 45(6): 524-535.
- Bond, P. A., M. W. Fowler and A. H. Scragg** (1988). "Growth of *Catharanthus roseus* cell suspensions in bioreactors: On-line analysis of oxygen and carbon dioxide levels in inlet and outlet gas streams." *Biotechnology Letters* 10(10): 713-718.
- Booth, W. E.** (1941). "Algae As Pioneers in Plant Succession and Their Importance in Erosion Control." *Ecology* 22(1): 38-46.
- Borowitzka, M. A. and L. J. Borowitzka** (1988). *Micro-algal Biotechnology*, Cambridge University Press.
- Bosca, C., A. Dauta and O. Marvalin** (1991). "Intensive outdoor algal cultures: How mixing enhances the photosynthetic production rate." *Bioresource Technology* 38(2-3): 185-188.
- Boyd, M. R., K. R. Gustafson, J. B. McMahon, R. H. Shoemaker, B. R. O'Keefe, T. Mori, R. J. Gulakowski, L. Wu, M. I. Rivera, C. M. Laurencot, M. J. Currens, J. H. Cardellina, R. W. Buckheit, P. L. Nara, L. K. Pannell, R. C. Sowder and L. E. Henderson** (1997). "Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: Potential applications to microbicide development." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(7): 1521-1530.
- Breckle, S. W., A. Yair and M. Veste** (2008). *Arid Dune Ecosystems: The Nizzana Sands in the Negev Desert*, Springer.
- Britton, N. F.** (2003). *Essential Mathematical Biology*, Springer London.
- Brock, T. D.** (1967). "Life at High Temperatures: Evolutionary, ecological, and biochemical significance of organisms living in hot springs is discussed." *Science* 158(3804): 1012-1019.
- Brock, T. D.** (1973). "Lower Ph Limit for Existence of Blue-Green-Algae - Evolutionary and Ecological Implications." *Science* 179(4072): 480-483.
- Brock, T. D.** (1975). "EFFECT OF WATER POTENTIAL ON A MICROCOLEUS (CYANOPHYCEAE) FROM A DESERT CRUST1." *Journal of Phycology* 11(3): 316-320.
- Broneske, J., K. Döbel, H. Franke, H. U. Oehlmann, O. Pulz and R. Uphoff** (2002). *Anlage zur durchführung von photochemischen und photokatalytischen reaktionen und photoinduzierbaren prozessen*, Google Patents.
- Broneske, J., K. Döbel, H. Franke, H. U. Oehlmann, O. Pulz and R. Uphoff** (2005). *Method for producing biomass by photosynthesis*, Google Patents.
- Bronnenmeier, R. and H. Markl** (1982). "Hydrodynamic stress capacity of microorganisms." *Biotechnol Bioeng* 24(3): 553-578.
- Brotherson, J. D. and S. R. Rushforth** (1983). "Influence of cryptogamic crusts on moisture relationships of soils in Navajo National Monument, Arizona." *Great Basin Naturalist* 43(1): 73-78.
- Brucker, F., A. Retze, U. Schmid-Staiger, W. Trösch and A. Zastrow** (2005). *Photobioreactor with improved supply of light by surface enlargement, wavelength shifter bars or light transport*, Google Patents.
- Buchs, J.** (2001). "Introduction to advantages and problems of shaken cultures." *Biochemical Engineering Journal* 7: 91 - 98.
- Burja, A. M., B. Banaigs, E. Abou-Mansour, J. Grant Burgess and P. C. Wright** (2001). "Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products." *Tetrahedron* 57(46): 9347-9377.



- Cadogan, S. P., G. C. Maitland and J. P. M. Trusler** (2014). "Diffusion Coefficients of CO₂ and N₂ in Water at Temperatures between 298.15 K and 423.15 K at Pressures up to 45 MPa." *Journal of Chemical & Engineering Data* 59(2): 519-525.
- Campbel, P. G. C. and P. M. Stokes** (1985). "Acidification and Toxicity of Metals to Aquatic Biota." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42(12): 2034-2049.
- Campbell, N. A., J. B. Reece and J. Markl** (2006). *Biologie*, Pearson Education Deutschland.
- Campbell, S. E.** (1980). *Soil Stabilization by a Prokaryotic Desert Crust: Implications for Precambrian Land Biota. Limits of Life.* C. Ponnamperuma and L. Margulis, Springer Netherlands. 4: 85-98.
- Canter, P. H., H. Thomas and E. Ernst** (2005). "Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology." *Trends Biotechnol* 23(4): 180-185.
- Castenholz, R. W.** (1969). "Thermophilic Blue-Green Algae and Thermal Environment." *Bacteriological Reviews* 33(4): 476-&.
- CCRES.** (2015). "Cultivation of Algae." Retrieved 12.04.2015, 2015, from <http://ccres-aquaponics.blogspot.de/2012/04/cultivation-of-algae.html>.
- Chakdar, H., S. D. Jadhav, D. W. Dhar and S. Pabbi** (2012). "Potential applications of blue green algae." *Journal of Scientific & Industrial Research* 71(1): 13-20.
- Chamovitz, D., N. Misawa, G. Sandmann and J. Hirschberg** (1992). "Molecular-Cloning and Expression in Escherichia-Coli of a Cyanobacterial Gene Coding for Phytoene Synthase, a Carotenoid Biosynthesis Enzyme." *Febs Letters* 296(3): 305-310.
- Chandrasekaran, E. V. and J. N. BeMiller** (1980). Constituent analysis of glycosaminoglycans. *Methods in Carbohydrate Chemistry.* R. Whistler and J. N. BeMiller. New York, Academic Press. 8: 89-96.
- Chattopadhyay, S., A. K. Srivastava, S. S. Bhojwani and V. S. Bisaria** (2001). "Development of suspension culture of *Podophyllum hexandrum* for production of podophyllotoxin." *Biotechnology Letters* 23(24): 2063-2066.
- Cheirsilp, B. and S. Torpee** (2012). "Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation." *Bioresource Technology* 110: 510-516.
- Chen, I. H., M. C. Lu, Y. C. Du, M. H. Yen, C. C. Wu, Y. H. Chen, C. S. Hung, S. L. Chen, F. R. Chang and Y. C. Wu** (2009). "Cytotoxic Triterpenoids from the Stems of *Microtropis japonica*." *Journal of Natural Products* 72(7): 1231-1236.
- Chen, L., D. Li and Y. Liu** (2003). "Salt tolerance of *Microcoleus vaginatus* Gom., a cyanobacterium isolated from desert algal crust, was enhanced by exogenous carbohydrates." *Journal of Arid Environments* 55(4): 645-656.
- Chen, L., Y. Yang, S. Deng, Y. Xu, G. Wang and Y. Liu** (2012). "The response of carbohydrate metabolism to the fluctuation of relative humidity (RH) in the desert soil cyanobacterium *Phormidium tenue*." *European Journal of Soil Biology* 48(0): 11-16.
- Chen, M., M. Schliep, R. D. Willows, Z. L. Cai, B. A. Neilan and H. Scheer** (2010). "A Red-Shifted Chlorophyll." *Science* 329(5997): 1318-1319.
- Chen, X., S. Jia, Y. Wang and N. Wang** (2011). "Biological crust of *Nostoc* flagelliforme (cyanobacteria) on sand bed materials." *Journal of Applied Phycology* 23(1): 67-71.

- Chmiel, H.** (2006). *Bioprozesstechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik*, Elsevier, Spektrum, Akad. Verlag.
- Choi, H. J., J. M. Lee and S. M. Lee** (2013). "A novel optical panel photobioreactor for cultivation of microalgae." *Water Science and Technology* 67(11): 2543-2548.
- Choi, K. T., I. O. Ahn and J. C. Park** (1994). "Production of ginseng saponin in tissue culture of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Mayer)." *Russian Journal of Plant Physiology* 41: 784-788.
- Cole, M. B., M. V. Jones and C. Holyoak** (1990). "The Effect of Ph, Salt Concentration and Temperature on the Survival and Growth of *Listeria-Monocytogenes*." *Journal of Applied Bacteriology* 69(1): 63-72.
- Coles, J. F. and R. C. Jones** (2000). "Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river." *Journal of Phycology* 36(1): 7-16.
- Collin, H. A.** (2001). "Secondary product formation in plant tissue cultures." *Plant Growth Regulation* 34(1): 119-134.
- Cooper, C. M., G. A. Fernstrom and S. A. Miller** (1944). "Performance of Agitated Gas-Liquid Contactors." *Industrial & Engineering Chemistry* 36(6): 504-509.
- Cordes, R.** (2013). "Novagreen - Projektmanagement GmbH."
- Crowe, L. M. and J. H. Crowe** (1992). "Stabilization of Dry Liposomes by Carbohydrates." *International Symposium on Biological Product Freeze-Drying and Formulation* 74: 285-294.
- Csogor, Z., M. Herrenbauer, K. Schmidt and C. Posten** (2001). "Light distribution in a novel photobioreactor - modelling for optimization." *Journal of Applied Phycology* 13(4): 325-333.
- Cypionka, H.** (2010). *Grundlagen Der Mikrobiologie*, Springer.
- Dai, Y. J., J. Li, S. M. Wei, N. Chen, Y. P. Xiao, Z. L. Tan, S. R. Jia, N. N. Yuan, N. Tan and Y. J. Song** (2013). "Effect of light with different wavelengths on *Nostoc* flagelliforme cells in liquid culture." *J Microbiol Biotechnol* 23(4): 534-538.
- Danin, A., Y. Bar-Or, I. Dor and T. Yisraeli** (1989). "The role of cyanobacteria in stabilization of sand dunes in southern Israel." *Ecologia Mediterranea* 15(1/2): 55-64.
- De Philippis, R., A. Ena, R. Paperi, C. Sili and M. Vincenzini** (2000). "Assessment of the potential of *Nostoc* strains from the Pasteur Culture Collection for the production of polysaccharides of applied interest." *Journal of Applied Phycology* 12(3-5): 401-407.
- De Philippis, R., M. C. Margheri, R. Materassi and M. Vincenzini** (1998). "Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers." *Applied and Environmental Microbiology* 64(3): 1130-1132.
- De Philippis, R., C. Sili, R. Paperi and M. Vincenzini** (2001). "Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review." *Journal of Applied Phycology* 13(4): 293-299.
- De Philippis, R. and M. Vincenzini** (1998). "Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications." *Fems Microbiology Reviews* 22(3): 151-175.
- Degen, J., A. Uebele, A. Retze, U. Schmid-Staiger and W. Trosch** (2001). "A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect." *Journal of Biotechnology* 92(2): 89-94.



- Dewit, R., W. H. M. Vanboekel and H. Vangemerden** (1988). "Growth of the Cyanobacterium *Microcoleus-Chthonoplastes* on Sulfide." *Fems Microbiology Ecology* 53(3-4): 203-209.
- DiCosmo, F. and M. Misawa** (1995). "Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production." *Biotechnology Advances* 13(3): 425-453.
- DiCosmo, F. and S. G. Tallevi** (1985). "Plant cell cultures and microbial insult: Interactions with biotechnological potential." *Trends in Biotechnology* 3(5): 110-111.
- Dodds, W. K., D. A. Gudder and D. Mollenhauer** (1995). "THE ECOLOGY OF NOSTOC." *Journal of Phycology* 31(1): 2-18.
- Dojani, S., M. Lakatos, U. Rascher, W. Wanek, U. Luttge and B. Budel** (2007). "Nitrogen input by cyanobacterial biofilms of an inselberg into a tropical rainforest in French Guiana." *Flora* 202(7): 521-529.
- Dor, I. and A. Danin** (1996). "Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley, Israel." *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 83: 197-206.
- Doran, P. M.** (1995). *Bioprocess Engineering Principles*, Elsevier Science.
- Doran, P. M.** (2013). *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press.
- Downham, A. and P. Collins** (2000). "Colouring our foods in the last and next millennium." *International Journal of Food Science & Technology* 35(1): 5-22.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith** (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356.
- Dubuis, B., O. Kut and J. Prenosil** (1995). "Pilot-scale culture of *Coffea arabica* in a novel loop fluidised bed reactor." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43(2): 171-183.
- Dunlop, E. H. and P. K. Namdev** (1993). Effect of fluid forces on plant cell suspensions. *Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics*. A. W. Nienow. London, MEP: 447-455.
- Eibl, R., S. Werner and D. Eibl** (2009). "Bag bioreactor based on wave-induced motion: characteristics and applications." *Adv Biochem Eng Biotechnol* 115: 55-87.
- Eilert, U.** (1987). Elicitation: methodology and aspects of application. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. F. Constabel and I. Vasil. San Diego, Academic Press: 153-196.
- Ellis, B. E. and G. H. N. Towers** (1970). "Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*." *Biochemical Journal* 118(2): 291-297.
- Eriksen, M. and I. Umana** (2004). Hanging garden planter, Google Patents.
- Eriksen, N. T.** (2008). "The technology of microalgal culturing." *Biotechnology Letters* 30(9): 1525-1536.
- Ernst, A., W. Kerfin, H. Spiller and P. Boger** (1979). "External Factors Influencing Light-Induced Hydrogen Evolution by the Blue-Green-Alga, *Nostoc-Muscorum*." *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 34(9-10): 820-825.
- Evans, D. E., J. O. D. Coleman and A. Kearns** (2003). *Plant Cell Culture*, BIOS Scientific.
- Falch, B.** (1996). "Was steckt in Cyanobakterien?" *Pharmazie in unserer Zeit* 25(6): 311-321.

- Feng, X., A. Bandyopadhyay, B. Berla, L. Page, B. Wu, H. B. Pakrasi and Y. J. Tang** (2010). "Mixotrophic and photoheterotrophic metabolism in *Cyanothece* sp. ATCC 51142 under continuous light." *Microbiology* 156(8): 2566-2574.
- Fett-Neto, A. G., S. J. Melanson, S. A. Nicholson, J. J. Pennington and F. DiCosmo** (1994). "Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *taxus cuspidata*." *Biotechnol Bioeng* 44(8): 967-971.
- Fett-Neto, A. G., S. J. Melanson, K. Sakata and F. DiCosmo** (1993). "Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification." *Biotechnology (N Y)* 11(6): 731-734.
- Fett-Neto, A. G., J. J. Pennington and F. DiCosmo** (1995). "Effect of white light on taxol and baccatin III Accumulation in cell cultures of *Taxus cuspidata* Sieb and Zucc." *Journal of Plant Physiology* 146: 584-590.
- Feynman, R. P., R. B. Leighton and M. Sands** (2007). *The Feynman: Mechanik, Strahlung, Wärme : mit 28 Tabellen / [dt. Übers.: Kap. 1 - 25 Heinz Köhler ; Kap. 26 - 52 Eckhard Schröder]*. Bd. 1, Oldenbourg.
- Fleming, E. D. and R. W. Castenholz** (2007). "Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria." *Environmental Microbiology* 9(6): 1448-1455.
- Flemming, H. C. and J. Wingender** (2003). *Extracellular Polymeric Substances (EPS): Structural, Ecological and Technical Aspects. Encyclopedia of Environmental Microbiology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Flores-Sanchez, I. J., J. Ortega-Lopez, M. D. Montes-Horcasitas and A. C. Ramos-Valdivia** (2002). "Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*." *Plant and Cell Physiology* 43(12): 1502-1509.
- Fontanel, A. and M. Tabata** (1987). "Production of secondary metabolites from plant tissue and cell cultures." *Nestle research news*: 92-103.
- Franklin, C. I. and R. A. Dixon** (1994). *Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. Plant Cell Culture - A Practical Approach*. R. A. Dixon and R. A. Gonzales. Oxford, IRL Press: 1-25.
- Frémy, P.** (1930). "Les Myxophyceae de l'Afrique Equatoriale Francaise." *Arch. Bot.*: 508.
- Frølund, B., R. Palmgren, K. Keiding and P. H. Nielsen** (1996). "Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin." *Water Research* 30(8): 1749-1758.
- Furuya, T.** (1988). *Saponins (ginseng saponins). Cell Cultures and Somatic Cell Genetics of Plants*. I. K. Vasil. San Diego, CA, Academic Press. 5: 213-234.
- Furuya, T., T. Yoshikawa, Y. Orihara and H. Oda** (1984). "Studies of the culture conditions for *Panax ginseng* cells in jar fermentors." *Journal of Natural Products* 47: 70-75.
- GalmÉS, J., M. V. Kapralov, P. J. Andralojc, M. À. Conesa, A. J. Keys, M. A. J. Parry and J. Flexas** (2014). "Expanding knowledge of the Rubisco kinetics variability in plant species: environmental and evolutionary trends." *Plant, Cell & Environment* 37(9): 1989-2001.
- Garciapichel, F., N. D. Sherry and R. W. Castenholz** (1992). "Evidence for an Ultraviolet Sunscreen Role of the Extracellular Pigment Scytonemin in the Terrestrial Cyanobacterium *Chlorogloeopsis* Sp." *Photochemistry and Photobiology* 56(1): 17-23.



- Geier, S.** (2011). Photobiologische Wasserstoffproduktion mit der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* unter verfahrenstechnischen Aspekten.
- Gerber, M. and R. Span** (2008). An analysis of available mathematical models for anaerobic digestion of organic substances for production of biogas. International Gas Union Research Conference, Paris.
- Gerbsch, N.** (1997). Grundlegende Untersuchungen zur Entwicklung eines Photobioreaktors auf Basis seitabstrahlender Lichtwellenleiter, Technische Universität Berlin.
- Gibbs, R. D.** (1974). Chemotaxonomy of Flowering Plants, McGill-Queen's University Press.
- Glazer, A.** (1977). "Structure and molecular organization of the photosynthetic accessory pigments of cyanobacteria and red algae." *Molecular and Cellular Biochemistry* 18(2-3): 125-140.
- Goedecke, R.** (2006). Fluidverfahrenstechnik: Grundlagen, Methodik, Technik, Praxis, Wiley.
- Goleniowski, M. and V. S. Trippi** (1999). "Effect of growth medium composition on psilostachyinolides and altamisine production." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56(3): 215-218.
- Govindjee and D. Shevela** (2011). "Adventures with cyanobacteria: a personal perspective." *Frontiers in Plant Science* 2.
- Grote, K. H.** (2011). *Dubbel Taschenbuch für den Maschinenbau*, Springer.
- Gustafson, K. R., R. C. Sowder, 2nd, L. E. Henderson, J. H. Cardellina, 2nd, J. B. McMahon, U. Rajamani, L. K. Pannell and M. R. Boyd** (1997). "Isolation, primary sequence determination, and disulfide bond structure of cyanovirin-N, an anti-HIV (human immunodeficiency virus) protein from the cyanobacterium *Nostoc ellipsosporum*." *Biochem Biophys Res Commun* 238(1): 223-228.
- Haas, C., K.-C. Hengelhaupt, S. Kümritz, T. Bley, A. Pavlov and J. Steingroewer** (2014). "Salvia suspension cultures as production systems for oleanolic and ursolic acid." *Acta Physiologiae Plantarum* 36(8): 2137-2147.
- Habenicht, G.** (2008). *Kleben: Grundlagen, Technologien, Anwendungen*, Springer.
- Hallab, N. J., K. J. Bundy, K. O'Connor, R. L. Moses and J. J. Jacobs** (2001). "Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion." *Tissue Eng* 7(1): 55-71.
- Hansen, S., I. Hariskos, B. Luchterhand and J. Buchs** (2012). "Development of a modified Respiration Activity Monitoring System for accurate and highly resolved measurement of respiration activity in shake flask fermentations." *Journal of Biological Engineering* 6(1): 11.
- Harper, K. T. and R. L. Pendleton** (1993). "Cyanobacteria and cyanolichens: Can they enhance availability of essential minerals for higher plants?" *Great Basin Naturalist* 53(1): 59-72.
- Harris, E. H.** (1989). *The Chlamydomonas sourcebook : a comprehensive guide to biology and laboratory use*. San Diego, Academic Press.
- Harris, E. H.** (2009). *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use*, Elsevier Science.
- Hass, V. C. and R. Pörtner** (2009). *Praxis der Bioprozesstechnik: mit virtuellem Praktikum*, Spektrum, Akad. Verlag.

- Havelka, P., T. Moucha, J. Sinkule and V. Linek** (1998). "CHEMICAL DYNAMIC METHOD FOR MEASURING k_{La} IN GAS-LIQUID DISPERSIONS." *Chemical Engineering Communications* 168(1): 97-110.
- He, H., Y. Li, T. Chen, X. Huang, Q. Guo, S. Li, T. Yu and H. Li** (2013). "Butachlor induces some physiological and biochemical changes in a rice field biofertilizer cyanobacterium." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105(3): 224-230.
- Hegglin, M., J. E. Prenosil and J. R. Bourne** (1990). "Reaktorsystem zur Massenkultivation von pflanzlichen Zellkulturen bei niedrigem hydrodynamischen Stress." *Chimia* 44: 26-32.
- Heining, M., A. Sutor, S. C. Stute, C. P. Lindenberger and R. Buchholz** (2015). "Internal illumination of photobioreactors via wireless light emitters: a proof of concept." *Journal of Applied Phycology* 27(1): 59-66.
- Helm, R. F., Z. Huang, D. Edwards, H. Leeson, W. Peery and M. Potts** (2000). "Structural characterization of the released polysaccharide of desiccation-tolerant *Nostoc commune* DRH-1." *Journal of Bacteriology* 182(4): 974-982.
- Henzler, H.-J.** (1982). "Verfahrenstechnische Auslegungsunterlagen für Rührbehälter als Fermenter." *Chemie Ingenieur Technik* 54(5): 461-476.
- Heß, D.** (1992). *Biotechnologie der Pflanzen: eine Einführung ; 18 Tabellen*, Ulmer.
- Hestrin, S.** (1949). "THE REACTION OF ACETYLCHOLINE AND OTHER CARBOXYLIC ACID DERIVATIVES WITH HYDROXYLAMINE, AND ITS ANALYTICAL APPLICATION." *Journal of Biological Chemistry* 180(1): 249-261.
- Hill, D. R., T. W. Keenan, R. F. Helm, M. Potts, L. M. Crowe and J. H. Crowe** (1997). "Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation." *Journal of Applied Phycology* 9(3): 237-248.
- Hippolyte, I., B. Marin, J. C. Baccou and R. Jonard** (1992). "Growth and Rosmarinic Acid Production in Cell-Suspension Cultures of *Salvia-Officinalis* L." *Plant Cell Reports* 11(3): 109-112.
- Ho, C.-H., K. A. Henderson and G. L. Rorrer** (1995). "Cell damage and oxygen mass transfer during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor." *Biotechnology Progress* 11(2): 140-145.
- Hofbauer, J. and K. Sigmund** (1984). *Evolutionstheorie und dynamische Systeme: mathematische Aspekte der Selektion*, Verlag P. Parey.
- Hoffmann, L.** (1989). "Algae of terrestrial habitats." *The Botanical Review* 55(2): 77-105.
- Hoiczky, E. and A. Hansel** (2000). "Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope." *Journal of Bacteriology* 182(5): 1191-1199.
- Höll, K. and A. Grohmann** (2002). *Wasser: Nutzung im Kreislauf, Hygiene, Analyse und Bewertung*, De Gruyter.
- Holleman, A. F., E. Wiberg and N. Wiberg** (1995). *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, de Gruyter.
- Hooker, B. S., J. M. Lee and G. An** (1989). "Response of plant tissue culture to a high shear environment." *Enzyme and Microbial Technology* 11(8): 484-490.
- Hooker, B. S., J. M. Lee and G. An** (1990). "Cultivation of plant cells in a stirred vessel: effect of impeller design." *Biotechnol Bioeng* 35(3): 296-304.



- Housman, D. C., H. H. Powers, A. D. Collins and J. Belnap** (2006). "Carbon and nitrogen fixation differ between successional stages of biological soil crusts in the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert." *Journal of Arid Environments* 66(4): 620-634.
- Hsieh, C. H. and W. T. Wu** (2009). "A novel photobioreactor with transparent rectangular chambers for cultivation of microalgae." *Biochemical Engineering Journal* 46(3): 300-305.
- Hu, C., Y. Liu, B. S. Paulsen, D. Petersen and D. Klaveness** (2003). "Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain." *Carbohydrate Polymers* 54(1): 33-42.
- Hua, J., L. E. Erickson, T. Y. Yiin and L. A. Glasgow** (1993). "A review of the effects of shear and interfacial phenomena on cell viability." *Crit Rev Biotechnol* 13(4): 305-328.
- Huang, C. Y., C. Y. Lin, C. W. Tsai and M. C. Yin** (2011). "Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by ursolic acid in human lung cancer cell lines." *Toxicol In Vitro* 25(7): 1274-1280.
- Huang, S. W. and L. P. Lin** (1981). "Nutrient requirements on the growth of cultivated edible microalgae for mass production *Chlorella pyrenoidosa*." *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society* 19(3-4): 208-217.
- Huner, N. P. A., G. Oquist and F. Sarhan** (1998). "Energy balance and acclimation to light and cold." *Trends in Plant Science* 3(6): 224-230.
- IJDDHR** (2011). "Classification of Elicitors." *International Journal of Drug Discovery and Herbal Research (IJDDHR)* 1(2): 84-90.
- Ikuta, A., H. Tomiyasu, Y. Morita and K. Yoshimura** (2003). "Ursane- and oleanane-type triterpenes from *Ternstroemia gymnanthera* callus tissues." *Journal of Natural Products* 66(8): 1051-1054.
- Janicsák, G., Veres, Kállai and Máthé** (2003). "Gas Chromatographic Method for Routine Determination of Oleanolic and Ursolic Acids in Medicinal Plants." *Chromatographia* 58(5-6): 295-299.
- Janicsák, G., K. Veres, A. Zoltán Kakasy and I. Máthé** (2006). "Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae." *Biochemical Systematics and Ecology* 34(5): 392-396.
- Jedinak, A., M. Muckova, D. Kost'alo, T. Maliar and I. Masterova** (2006). "Antiprotease and antimetastatic activity of ursolic acid isolated from *Salvia officinalis*." *Z Naturforsch C* 61(11-12): 777-782.
- Johnson, W. S., A. Gigon, S. L. Gulmon and H. A. Mooney** (1974). "Comparative Photosynthetic Capacities of Intertidal Algae under Exposed and Submerged Conditions." *Ecology* 55(2): 450-453.
- Joshi, J. B., C. B. Elias and M. S. Patole** (1996). "Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells." *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal* 62(2): 121-141.
- Kaidi, F., R. Rihani, A. Ounnar, L. Benhabyles and M. W. Naceur** (2012). "Photobioreactor Design for Hydrogen Production." *Iswee'11* 33: 492-498.
- Karam, N. S., F. M. Jawad, N. A. Arikat and R. A. Shibli** (2003). "Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*." *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 73(2): 117-121.

- Karsten, U., I. Klimant and G. Holst** (1996). "A new in vivo fluorimetric technique to measure growth of adhering phototrophic microorganisms." *Applied and Environmental Microbiology* 62(1): 237-243.
- Kato, A., Y. Shimizu and S. Nagai** (1975). "Effect of initial kLa on the growth of tobacco cells in batch culture." *Journal of Fermentation Technology* 53: 744-751.
- Kauff, F. and B. Büdel** (2011). *Phylogeny of Cyanobacteria: An Overview*. *Progress in Botany* 72. U. E. Lüttge, W. Beyschlag, B. Büdel and D. Francis, Springer Berlin Heidelberg. 72: 209-224.
- Kay, R. A.** (1991). "Microalgae as food and supplement." *Crit Rev Food Sci Nutr* 30(6): 555-573.
- Ketseoglou, I. and G. Bouwer** (2013). "Optimization of photobioreactor growth conditions for a cyanobacterium expressing mosquitoicidal *Bacillus thuringiensis* Cry proteins." *Journal of Biotechnology* 167(1): 64-71.
- Kieran, P. M., H. J. O'Donnell, D. M. Malone and P. F. MacLoughlin** (1995). "Fluid shear effects on suspension cultures of *Morinda citrifolia*." *Biotechnol Bioeng* 45(5): 415-425.
- Kintzios, S., A. Nikolaou and M. Skoula** (1999). "Somatic embryogenesis and in vitro rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and *S-fruticosa* leaf callus cultures." *Plant Cell Reports* 18(6): 462-466.
- Kleppmann, W.** (2008). *Taschenbuch Versuchsplanung: Produkte und Prozesse optimieren ; [CD inside]*, Hanser.
- Kowalewski, Z., M. Kortus, W. Kedzia and H. Koniar** (1976). "Antibiotic action of beta-ursolic acid." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 24(1): 115-119.
- Kowalski, R.** (2007). "Studies of Selected Plant Raw Materials as Alternative Sources of Triterpenes of Oleanolic and Ursolic Acid Types." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(3): 656-662.
- Krook, J., D. Vreugdenhil and L. H. W. van der Plas** (2000). "Uptake and phosphorylation of glucose and fructose in *Daucus carota* cell suspensions are differently regulated." *Plant Physiology and Biochemistry* 38(7-8): 603-612.
- Kumar, A., S. Ergas, X. Yuan, A. Sahu, Q. O. Zhang, J. Dewulf, F. X. Malcata and H. van Langenhove** (2010). "Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions." *Trends in Biotechnology* 28(7): 371-380.
- Kunkel, S. D., M. Suneja, S. M. Ebert, K. S. Bongers, D. K. Fox, S. E. Malmberg, F. Alipour, R. K. Shields and C. M. Adams** (2011). "mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass." *Cell Metab* 13(6): 627-638.
- Kupper, H., E. Andresen, S. Wiegert, M. Simek, B. Leitenmaier and I. Setlik** (2009). "Reversible coupling of individual phycobiliprotein isoforms during state transitions in the cyanobacterium *Trichodesmium* analysed by single-cell fluorescence kinetic measurements." *Biochim Biophys Acta* 1787(3): 155-167.
- Kuriakose, G. C. and M. G. Kurup** (2008). "Evaluation of renoprotective effect of *Aphanizomenon flos-aquae* on cisplatin-induced renal dysfunction in rats." *Renal Failure* 30(7): 717-725.
- Kuriakose, G. C. and M. G. Kurup** (2010). "Antioxidant and hepatoprotective activity of *Aphanizomenon flos-aquae* Linn against paracetamol intoxication in rats." *Indian Journal of Experimental Biology* 48(11): 1123-1130.



- Laing, I. and E. Jones** (1988). "A turbidostat vessel for the continuous culture of marine microalgae." *Aquacultural Engineering* 7(2): 89-96.
- Lakatos, M., W. Bilger and B. Budel** (2001). "Carotenoid composition of terrestrial Cyanobacteria: response to natural light conditions in open rock habitats in Venezuela." *European Journal of Phycology* 36(4): 367-375.
- Lampin, M., C. Warocquier, C. Legris, M. Degrange and M. F. Sigot-Luizard** (1997). "Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration." *J Biomed Mater Res* 36(1): 99-108.
- Lan, S., L. Wu, D. Zhang, C. Hu and Y. Liu** (2010). "Effects of drought and salt stresses on man-made cyanobacterial crusts." *European Journal of Soil Biology* 46(6): 381-386.
- Lange, O. L.** (1969). "Functional Adaptation of Lichens to Ecological Conditions of Arid Regions." *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 82(1-2): 3-&.
- Lange, O. L., W. Bilger, S. Rimke and U. Schreiber** (1989). "Chlorophyll Fluorescence of Lichens Containing Green and Blue-Green Algae During Hydration by Water Vapor Uptake and by Addition of Liquid Water*." *Botanica Acta* 102(4): 306-313.
- Lange, O. L., B. Büdel, H. Zellner, G. Zotz and A. Meyer** (1994). "Field Measurements of Water Relations and CO₂ Exchange of the Tropical, Cyanobacterial Basidiolichen *Dictyonema glabratum* in a Panamanian Rainforest*." *Botanica Acta* 107(5): 279-290.
- Lange, O. L., G. J. Kidron, B. Büdel, A. Meyer, E. Kilian and A. Abeliovich** (1992). "Taxonomic Composition and Photosynthetic Characteristics of the 'Biological Soil Crusts' Covering Sand Dunes in the Western Negev Desert." *Functional Ecology* 6(5): 519-527.
- Lange, O. L., E. Kilian and H. Ziegler** (1986). "Water vapor uptake and photosynthesis of lichens: performance differences in species with green and blue-green algae as phycobionts." *Oecologia* 71(1): 104-110.
- Lawlor, D. W.** (2001). *Photosynthesis, Bios.*
- Laws, E. A., K. L. Terry, J. Wickman and M. S. Chalup** (1983). "A simple algal production system designed to utilize the flashing light effect." *Biotechnol Bioeng* 25(10): 2319-2335.
- Leckie, F., A. H. Scragg and K. C. Cliffe** (1991). "An investigation into the role of initial K(L)a on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*." *Biotechnol Bioeng* 37(4): 364-370.
- Lee, C. W. and M. L. Shuler** (2000). "The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells." *Biotechnol Bioeng* 67(1): 61-71.
- Lee, Y. K. and C. S. Low** (1993). "Productivity of outdoor algal cultures in unstable weather conditions." *Biotechnol Bioeng* 41(10): 1003-1006.
- Leipold, D., G. Wunsch, M. Schmidt, H. J. Bart, T. Bley, H. E. Neuhaus, H. Bergmann, E. Richling, K. Muffler and R. Ulber** (2010). "Biosynthesis of ursolic acid derivatives by microbial metabolism of ursolic acid with *Nocardia* sp strains-Proposal of new biosynthetic pathways." *Process Biochemistry* 45(7): 1043-1051.
- Li, P., S. E. Harding and Z. Liu** (2001). "Cyanobacterial exopolysaccharides: their nature and potential biotechnological applications." *Biotechnol Genet Eng Rev* 18: 375-404.
- Liberton, M., R. Howard Berg, J. Heuser, R. Roth and H. B. Pakrasi** (2006). "Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." *Protoplasma* 227(2-4): 129-138.

- Linek, V., P. Benes and V. Vacek** (1989). "Dynamic pressure method for k_{La} measurement in large-scale bioreactors." *Biotechnol Bioeng* 33(11): 1406-1412.
- Linek, V., V. Vacek and P. Beneš** (1987). "A critical review and experimental verification of the correct use of the dynamic method for the determination of oxygen transfer in aerated agitated vessels to water, electrolyte solutions and viscous liquids." *The Chemical Engineering Journal* 34(1): 11-34.
- Liu, J.** (2005). "Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives." *J Ethnopharmacol* 100(1-2): 92-94.
- Ludwig, C. B.** (2014). Produktion von pharmakologischen Sekundärmetaboliten. PhD, TU Kaiserslautern.
- Lühe, F.** (2013). Optische Signalübertragung mit Lichtwellenleitern: Einführung in die physikalischen Grundlagen, Vieweg+Teubner Verlag.
- Luis, J. G., A. G. González, L. S. Andrés and S. Mederos** (1992). "Diterpenes from in vitro-grown *Salvia canariensis*." *Phytochemistry* 31(9): 3272-3273.
- Lustigman, B., L. H. Lee and C. Weissmagasic** (1995). "Effects of Cobalt and Ph on the Growth of *Chlamydomonas-Reinhardtii*." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55(1): 65-72.
- Lüttge, U. and M. Kluge** (2012). Botanik: die einführende Biologie der Pflanzen, Wiley-VCH.
- MacColl, R.** (1998). "Cyanobacterial phycobilisomes." *J Struct Biol* 124(2-3): 311-334.
- Macias-Sancho, J., L. H. Poersch, W. Bauer, L. A. Romano, W. Wasielesky and M. B. Tesser** (2014). "Fishmeal substitution with *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: Effects on growth and immunological parameters." *Aquaculture* 426: 120-125.
- Malcata, F. X.** (2011). "Microalgae and biofuels: A promising partnership?" *Trends in Biotechnology* 29(11): 542-549.
- Märkl, H., R. Bronnenmeier and B. Wittek** (1991). "The resistance of micro-organisms to hydrodynamic stress." *International Journal of Chemical Engineering* 31: 185-197.
- Martelli, G., C. Folli, L. Visai, M. Daglia and D. Ferrari** (2014). "Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications." *Process Biochemistry* 49(1): 154-159.
- Martin, K. and C. Allgaier** (2002). *Ökologie der Biozönosen*, Springer.
- Mata, T. M., A. A. Martins and N. S. Caetano** (2010). "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review." *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 14(1): 217-232.
- Matile, P., S. Hortensteiner, H. Thomas and B. Krautler** (1996). "Chlorophyll Breakdown in Senescent Leaves." *Plant Physiol* 112(4): 1403-1409.
- Matsubara, K., S. Kitani, T. Yoshioka, T. Morimoto, Y. Fujita and Y. Yamada** (1989). "High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 46(1): 61-69.
- Mavituna, F. and J. M. Park** (1987). "Size distribution of plant cell aggregates in batch culture." *The Chemical Engineering Journal* 35(1): B9-B14.
- Mazor, G., G. J. Kidron, A. Vonshak and A. Abeliovich** (1996). "The role of cyanobacterial exopolysaccharides in structuring desert microbial crusts." *FEMS Microbiology Ecology* 21(2): 121-130.



- Mcdaniel, L. E. and E. G. Bailey** (1969). "Effect of Shaking Speed and Type of Closure on Shake Flask Cultures." *Applied Microbiology* 17(2): 286-&.
- Merchuk, J. C.** (1991). "Shear effects on suspended cells." *Adv Biochem Eng Biotechnol* 44: 65-95.
- Metting, B.** (1981). "The systematics and ecology of soil algae." *The Botanical Review* 47(2): 195-312.
- Milledge, J. J.** (2011). "Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review." *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology* 10(1): 31-41.
- Miller, S. R. and R. W. Castenholz** (2000). "Evolution of Thermotolerance in Hot Spring Cyanobacteria of the Genus *Synechococcus*." *Applied and Environmental Microbiology* 66(10): 4222-4229.
- Mohsenpour, S. F. and N. Willoughby** (2013). "Luminescent photobioreactor design for improved algal growth and photosynthetic pigment production through spectral conversion of light." *Bioresource Technology* 142: 147-153.
- Monod, J.** (1949). "THE GROWTH OF BACTERIAL CULTURES." *Annual Review of Microbiology* 3: 371-394.
- Moreno, J., M. A. Vargas, H. Olivares, J. Rivas and M. G. Guerrero** (1998). "Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture." *Journal of Biotechnology* 60(3): 175-182.
- Moreno, P. R., R. van der Heijden and R. Verpoorte** (1993). "Effect of terpenoid precursor feeding and elicitation on formation of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*." *Plant Cell Rep* 12(12): 702-705.
- Morimoto, S., Y. Goto and Y. Shoyama** (1994). "Production of Lithospermic Acid-B and Rosmarinic Acid in Callus-Tissue and Regenerated Plantlets of *Salvia-Miltiorrhiza*." *Journal of Natural Products* 57(6): 817-823.
- Moroney, J. V., N. Jungnick, R. J. DiMario and D. J. Longstreth** (2013). "Photorespiration and carbon concentrating mechanisms: two adaptations to high O₂, low CO₂ conditions." *Photosynthesis Research* 117(1-3): 121-131.
- Moroney, J. V. and R. A. Ynalvez** (2007). "Proposed carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Eukaryotic Cell* 6(8): 1251-1259.
- Muffler, K., D. Leipold, M.-C. Scheller, C. Haas, J. Steingroewer, T. Bley, H. E. Neuhaus, M. A. Mirata, J. Schrader and R. Ulber** (2011). "Biotransformation of triterpenes." *Process Biochemistry* 46(1): 1-15.
- Mulabagal, V. and H. S. Tsay** (2004). "Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites " *International Journal of Applied Science and Engineering* 2(1): 29-48.
- Mulder-Krieger, T., R. Verpoorte, A. B. Svendsen and J. J. C. Scheffer** (1988). "Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 13(2): 85-154.
- Muller-Feuga, A., J. Moal and R. Kaas** (2007). *The Microalgae of Aquaculture. Live Feeds in Marine Aquaculture*, Blackwell Science Ltd: 206-252.
- Mullineaux, C. W. and D. Emlyn-Jones** (2005). "State transitions: an example of acclimation to low-light stress." *Journal of Experimental Botany* 56(411): 389-393.

- Munk, K.** (2011). *Ökologie, Biodiversität, Evolution*, Thieme.
- Mur, L. R., O. M. Skulber and H. Utkilen** (1999). "Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. In: cyanobacteria in the environment. WHO. Kapitel 2."
- Murchie, E. H. and T. Lawson** (2013). "Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications." *Journal of Experimental Botany*.
- Namikoshi, M. and K. L. Rinehart** (1996). "Bioactive compounds produced by cyanobacteria." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 17(5-6): 373-384.
- Nielsen, P. and A. Jahn** (1999). Extraction of EPS. *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. J. Wingender, T. Neu and H.-C. Flemming, Springer Berlin Heidelberg: 49-72.
- Ogbonna, J. C., H. Yada, H. Masui and H. Tanaka** (1996). "Novel internally illuminated stirred tank photobioreactor for large-scale cultivation of photosynthetic cells." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82(1): 61-67.
- Ohad, I., H. Raanan, N. Keren, D. Tchernov and A. Kaplan** (2010). "Light-Induced Changes within Photosystem II Protects *Microcoleus* sp. in Biological Desert Sand Crusts against Excess Light." *PLoS ONE* 5(6): e11000.
- Ozkan, A., K. Kinney, L. Katz and H. Berberoglu** (2012). "Novel Algae Biofilm Photobioreactor for Reduced Energy and Water Usage." *Proceedings of the Asme International Mechanical Engineering Congress and Exposition - 2010, Vol 5, Pts a and B*: 75-80.
- Painter, T. J.** (1993). "Carbohydrate polymers in desert reclamation: the potential of microalgal biofertilizers." *Carbohydrate Polymers* 20(2): 77-86.
- Patterson, G. M., C. D. Smith, L. H. Kimura, B. A. Britton and S. Carmeli** (1993). "Action of tolytoxin on cell morphology, cytoskeletal organization, and actin polymerization." *Cell Motil Cytoskeleton* 24(1): 39-48.
- Payne, G. F., V. Bringi, C. L. Prince and M. L. Shuler** (1992). "Plant cell and tissue culture in liquid systems." *Biotechnology Techniques* 6(3): 287-287.
- Pegallapati, A. K., Y. Arudchelvam and N. Nirmalakhandan** (2012). "Energy-efficient photobioreactor configuration for algal biomass production." *Bioresource Technology* 126: 266-273.
- Pereira, S., A. Zille, E. Micheletti, P. Moradas-Ferreira, R. De Philippis and P. Tamagnini** (2009). "Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly." *Fems Microbiology Reviews* 33(5): 917-941.
- Peter, C. P., Y. Suzuki, K. Rachinskiy, S. Lotter and J. Buchs** (2006). "Volumetric power consumption in baffled shake flasks." *Chemical Engineering Science* 61(11): 3771-3779.
- Peter, C. P., Y. Suzuki, K. Rachinskiy, S. Lotter and J. Büchs** (2006). "Volumetric power consumption in baffled shake flasks." *Chemical Engineering Science* 61(11): 3771-3779.
- Porra, R. J., W. A. Thompson and P. E. Kriedemann** (1989). "Determination of Accurate Extinction Coefficients and Simultaneous-Equations for Assaying Chlorophyll-a and Chlorophyll-B Extracted with 4 Different Solvents - Verification of the Concentration of Chlorophyll Standards by Atomic-Absorption Spectroscopy." *Biochimica Et Biophysica Acta* 975(3): 384-394.
- Potts, M.** (1994). "Desiccation Tolerance of Prokaryotes." *Microbiological Reviews* 58(4): 755-805.



- Potts, M.** (1999). "Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria." *European Journal of Phycology* 34(4): 319-328.
- Prenosil, J. E., M. Hegglin, J. R. Bourne and R. Hamilton** (1987). "Purine Alkaloid Production by Free and Immobilized *Coffea arabica* Cells." *Annals of the New York Academy of Sciences* 501(1): 390-394.
- Presser, K. A., D. A. Ratkowsky and T. Ross** (1997). "Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration." *Applied and Environmental Microbiology* 63(6): 2355-2360.
- Pritchard, D. T. and J. A. Currie** (1982). "Diffusion of coefficients of carbon dioxide, nitrous oxide, ethylene and ethane in air and their measurement." *Journal of Soil Science* 33(2): 175-184.
- Pulz, O.** (2001). "Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms." *Appl Microbiol Biotechnol* 57(3): 287-293.
- Pulz, O. and W. Gross** (2004). "Valuable products from biotechnology of microalgae." *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(6): 635-648.
- Pulz, O. and K. Scheibenbogen** (1998). *Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis*, Springer Berlin Heidelberg. 59: 123-152.
- Purves, W. K., J. Markl and D. E. Sadava** (2011). *Biologie*, Spektrum-Akademischer Vlg.
- Radman, R., T. Saez, C. Bucke and T. Keshavarz** (2003). "Elicitation of plants and microbial cell systems." *Biotechnol Appl Biochem* 37(Pt 1): 91-102.
- Radmer, R., P. Behrens and K. Arnett** (1987). "Analysis of the productivity of a continuous algal culture system." *Biotechnol Bioeng* 29(4): 488-492.
- Rajeev, L., U. N. da Rocha, N. Klitgord, E. G. Luning, J. Fortney, S. D. Axen, P. M. Shih, N. J. Bouskill, B. P. Bowen, C. A. Kerfeld, F. Garcia-Pichel, E. L. Brodie, T. R. Northen and A. Mukhopadhyay** (2013). "Dynamic cyanobacterial response to hydration and dehydration in a desert biological soil crust." *ISME J* 7(11): 2178-2191.
- Rao, S. R. and G. A. Ravishankar** (2002). "Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites." *Biotechnol Adv* 20(2): 101-153.
- Rascher, U., M. Lakatos, B. Budel and U. Luttge** (2003). "Photosynthetic field capacity of cyanobacteria of a tropical inselberg of the guiana highlands." *Eur J Phycol* 38: 247 - 256.
- Raven, J. and J. Allen** (2003). "Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants?" *Genome Biology* 4(3): 1-5.
- Reynolds, C. S.** (1984). *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*, Cambridge University Press.
- Richmond, A.** (2008). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Wiley.
- Richter, G.** (1998). *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen: Physiologie und Biochemie des Primär- und Sekundärstoffwechsels*, Thieme.
- Rippka, R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman and R. Y. Stanier** (1979). "Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria." *Journal of General Microbiology* 111(1): 1-61.

- Rippka, R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman and R. Y. Stanier** (1979). "Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria." *Journal of General Microbiology* 111(Mar): 1-61.
- Roberts, S. C. and M. L. Shuler** (1997). "Large-scale plant cell culture." *Curr Opin Biotechnol* 8(2): 154-159.
- Rojas, C. J.** (2014). Simulation und Modellierung des anaeroben Prozesses der Biogaserzeugung mit verschiedenen Substraten. PhD, Technische Universität Hamburg-Harburg.
- Romagnoli, L. G. and D. Knorr** (1988). "Effects of ferulic acid treatment on growth and flavor development of cultured vanilla planifolia cells." *Food Biotechnology* 2(1): 93-104.
- RÖMPP.** (2015). "Volumetrischer Stoffübergangskoeffizient." Retrieved 12.04.2015, 2015, from <https://www.thieme.de/de/thieme-chemistry/roempp-54843.htm>.
- Rosenberg, M. Z.** (1987). The hydrodynamic shear sensitivity of suspension cultured plant cells. PhD, Washington University.
- Ruszkowski, D., A. Szakiel, E. Auguscinska and W. Janiszowska** (2006). "Biosynthesis of oleanolic acid glycosides in protoplasts isolated from *Calendula officinalis* L. roots." *Acta Physiologiae Plantarum* 28(3): 217-223.
- Saimaru, H., Y. Orihara, P. Tansakul, Y. H. Kang, M. Shibuya and Y. Ebizuka** (2007). "Production of triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea*." *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 55(5): 784-788.
- Sand-Jensen, K. and T. S. Jespersen** (2012). "Tolerance of the widespread cyanobacterium *Nostoc commune* to extreme temperature variations (-269 to 105 degrees C), pH and salt stress." *Oecologia* 169(2): 331-339.
- Schlatmann, J. E., E. Fonck, H. J. Ten Hoopen and J. J. Heijnen** (1994). "The negligible role of carbon dioxide and ethylene in ajmalicine production by *Catharanthus roseus* cell suspensions." *Plant Cell Rep* 14(2-3): 157-160.
- Schlatmann, J. E., J. L. Vinke, H. J. Ten Hoopen and J. J. Heijnen** (1995). "Relation between dissolved oxygen concentration and ajmalicine production rate in high-density cultures of *Catharanthus roseus*." *Biotechnol Bioeng* 45(5): 435-439.
- Schlegel, M. and R. Meisterfeld** (2003). "The species problem in protozoa revisited." *European Journal of Protistology* 39(4): 349-355.
- Schlösser, U.** (1966). "Enzymatisch gesteuerte Freisetzung von Zoosporen bei *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard in Synchronkultur." *Archiv für Mikrobiologie* 54(2): 129-159.
- Schmadke, H.** (2009). "Triterpene in Oliven." *Ernährungsumschau* 2: 92-95.
- Schopfer, P. and A. Brennicke** (2010). *Pflanzenphysiologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Schuler, H.** (2008). *Prozeßsimulation*, Wiley.
- Secundus, G. P. and J. D. Denso** (1765). *Naturgeschichte, Röse*.
- Shah, Y. T., B. G. Kelkar, S. P. Godbole and W. D. Deckwer** (1982). "Design parameters estimations for bubble column reactors." *AIChE Journal* 28(3): 353-379.



- Shaw, E., D. R. Hill, N. Brittain, D. J. Wright, U. Tauber, H. Marand, R. F. Helm and M. Potts** (2003). "Unusual water flux in the extracellular polysaccharide of the cyanobacterium *Nostoc commune*." *Applied and Environmental Microbiology* 69(9): 5679-5684.
- Shields, L. M. and L. W. Durrell** (1964). "Algae in Relation to Soil Fertility." *Botanical Review* 30(1): 92-128.
- Siebertz, K., D. v. Bebber and T. Hochkirchen** (2010). *Statistische Versuchsplanung*, Springer London, Limited.
- Sieg, D.** (2011). *Making Algae Biodiesel at Home: 2012 Edition*, CreateSpace Independent Publishing Platform.
- Silvestrini, A., G. Pasqua, B. Botta, B. Monacelli, R. van der Heijden and R. Verpoorte** (2002). "Effects of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line." *Plant Physiology and Biochemistry* 40(9): 749-753.
- Singh, R., P. Srivastava, V. Singh, G. Dubey and S. Prasad** (2012). "Light intensity determines the extent of mercury toxicity in the cyanobacterium *Nostoc muscorum*." *Acta Physiologiae Plantarum* 34(3): 1119-1131.
- Singh, S. and S. Das** (2011). "Screening, production, optimization and characterization of cyanobacterial polysaccharide." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 27(9): 1971-1980.
- Singh, S., B. N. Kate and U. C. Banerjee** (2005). "Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview." *Critical Reviews in Biotechnology* 25(3): 73-95.
- Sinha, R. P., P. Richter, J. Faddoul, M. Braun and D. P. Hader** (2002). "Effects of UV and visible light on cyanobacteria at the cellular level." *Photochem Photobiol Sci* 1(8): 553-559.
- Skrzypek, Z. and H. Wysokinska** (2003). "Sterols and triterpenes in cell culture of *Hyssopus officinalis* L." *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 58(5-6): 308-312.
- Skulberg, O. M.** (2000). "Microalgae as a source of bioactive molecules - experience from cyanophyte research." *Journal of Applied Phycology* 12(3-5): 341-348.
- Smart, N. and M. Fowler** (1981). "Effect of aeration on large-scale cultures of plant cells." *Biotechnology Letters* 3(4): 171-176.
- Smith, J. J., M. D. Lilly and R. I. Fox** (1990). "The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*." *Biotechnol Bioeng* 35(10): 1011-1023.
- Smith, T. M. and R. L. Smith** (2009). *Ökologie*, Pearson Studium.
- Sobczuk, T. M., F. G. Camacho, E. M. Grima and Y. Chisti** (2006). "Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricorutum* and *Porphyridium cruentum*." *Bioprocess Biosyst Eng* 28(4): 243-250.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran and A. Isambert** (2006). "Commercial applications of microalgae." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(2): 87-96.
- Staats, N., B. De Winder, L. Stal and L. Mur** (1999). "Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipellic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*." *European Journal of Phycology* 34(2): 161-169.
- Stanier, R. Y., W. R. Sistrom, T. A. Hansen, B. A. Whitton, R. W. Castenholz, N. Pfennig, V. N. Gorlenko, E. N. Kondratieva, K. E. Eimhjellen, R. Whittenburry, R. L. Gherna and H. G. Trüper** (1978). "Proposal to Place the Nomenclature of the Cyanobacteria (Blue-Green

- Algae) Under the Rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria." *International Journal of Systematic Bacteriology* 28(2): 335-336.
- Starmach, K. and J. Siemńska** (1979). "Blue-green algae from soil samples at various places in Europe." *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 22: 1-23.
- Stern, D.** (2009). *The Chlamydomonas Sourcebook: Organellar and Metabolic Processes*, Elsevier Science.
- Storhas, W.** (2000). *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen: Ein Leitfaden für die Hochschulausbildung, für Hersteller und Anwender*, Springer.
- Storhas, W.** (2012). *Bioverfahrensentwicklung*, Wiley.
- Sturm, A.** (1999). "Invertases. Primary Structures, Functions, and Roles in Plant Development and Sucrose Partitioning." *Plant Physiology* 121(1): 1-8.
- Sultemeyer, D., G. D. Price, J. W. Yu and M. R. Badger** (1995). "Characterization of Carbon-Dioxide and Bicarbonate Transport during Steady-State Photosynthesis in the Marine Cyanobacterium *Synechococcus* Strain Pcc7002." *Planta* 197(4): 597-607.
- Sutherland, I. W.** (1988). "Bacterial Surface Polysaccharides - Structure and Function." *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology* 113: 187-231.
- Sutherland, I. W.** (1990). "Food usage of polysaccharides." *Biotechnology of Microbial Polysaccharides*: 117-125.
- Sutherland, I. W.** (1996). "Microbial biopolymers from agricultural products: Production and potential." *International Biodeterioration & Biodegradation* 38(3-4): 249-261.
- Szakiel, A., A. Grzelak, P. Dudek and W. Janiszowska** (2003). "Biosynthesis of oleanolic acid and its glycosides in *Calendula officinalis* suspension culture." *Plant Physiology and Biochemistry* 41(3): 271-275.
- Takahashi, S. and Y. Fujita** (1991). Production of shikonin. *Plant cell culture in Japan*. A. Komamine, M. Misawa and F. diCosmo. Tokyo, CMC: 72-78.
- Talling, J. F.** (1976). "The depletion of carbon dioxide from lake water by phytoplakton." *Journal of Ecology* 64(1): 79-121.
- Tamburic, B., F. W. Zemichael, P. Crudge, G. C. Maitland and K. Hellgardt** (2011). "Design of a novel flat-plate photobioreactor system for green algal hydrogen production." *International Journal of Hydrogen Energy* 36(11): 6578-6591.
- Tanaka, H.** (1981). "Technological problems in cultivation of plant cells at high density." *Biotechnology and Bioengineering* 23(6): 1203-1218.
- Tanaka, H.** (1982). "Oxygen transfer in broths of plant cells at high density." *Biotechnol Bioeng* 24(2): 425-442.
- Tandeau de Marsac, N. and J. Houmard** (1993). "Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms." *FEMS Microbiology Letters* 104(1-2): 119-189.
- Tang, E. P. Y. and W. F. Vincent** (1999). "Strategies of thermal adaptation by high-latitude cyanobacteria." *New Phytologist* 142(2): 315-323.
- Tang, H. Q., J. Hu, L. Yang and R. X. Tan** (2000). "Terpenoids and flavonoids from *Artemisia* species." *Planta Med* 66(4): 391-393.
- Taticek, R., M. Moo-Young and R. Legge** (1991). "The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 24(2): 139-158.



- Thomas, C. R.** (1990). Problems of shear in biotechnology. Critical Reports on Applied Chemistry: Chemical Engineering Problems in Biotechnology. M. A. Winkler. London, Elsevier Applied Science. 29: 23-94.
- Thompson, J. E., C. D. Froese, E. Madey, M. D. Smith and Y. Hong** (1998). "Lipid metabolism during plant senescence." *Prog Lipid Res* 37(2-3): 119-141.
- Tiemeyer, A. K.** (2007). Reaktionstechnische Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator*. PhD, Technischen Universität München.
- Tiwari, G. L.** (1972). "A study of the blue-green algae from paddy field soils of India." *Hydrobiologia* 39(3): 335-350.
- Treat, W. J., C. R. Engler and E. J. Soltes** (1989). "Comparison of Photomixotrophic and Heterotrophic Callus and Suspension-Cultures of *Pinus-Elliottii* .1. Photosynthetic Properties and Ultrastructural Evidence for Coexistence of Starch Granules and Secondary Metabolites." *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 17(3): 205-224.
- Trösch, W.** (2005). Bio-reactor for the cultivation of micro-organisms and method for the production thereof, Google Patents.
- Tsai, S. J. and M. C. Yin** (2008). "Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells." *J Food Sci* 73(7): H174-178.
- Tsoglin, L. N., B. V. Gabel, T. N. Falkovich and V. E. Semenenko** (1996). "Closed photobioreactors for microalgal cultivation." *Russian Journal of Plant Physiology* 43(1): 131-136.
- Uhlenhut, F.** (1999). Modellierung der biologischen Abbauvorgänge in Kläranlagen. PhD, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.
- Ulbrich, B., W. Wiesner and H. Arens** (1985). Large-Scale Production of Rosmarinic Acid from Plant Cell Cultures of *Coleus blumei* Benth. Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. K.-H. Neumann, W. Barz and E. Reinhard, Springer Berlin Heidelberg: 293-303.
- Ullevig, S. L., Q. Zhao, D. Zamora and R. Asmis** (2011). "Ursolic acid protects diabetic mice against monocyte dysfunction and accelerated atherosclerosis." *Atherosclerosis* 219(2): 409-416.
- Ulubelen, A. and G. Topcu** (1992). "Abietane diterpenoids from *Salvia pomifera*." *Phytochemistry* 31(11): 3949-3951.
- Vanisree, M., L. Chen-Yue, L. Shu-Fung, M. Satish, Y. L. Chien and T. Hsin-Sheng** (2004). "Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures." *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 45: 1-22.
- Vincent, W.** (2002). Cyanobacterial Dominance in the Polar Regions. The Ecology of Cyanobacteria. B. Whitton and M. Potts, Springer Netherlands: 321-340.
- Vogel, J. T., M. H. Walter, P. Giavalisco, A. Lytovchenko, W. Kohlen, T. Charnikhova, A. J. Simkin, C. Goulet, D. Strack, H. J. Bouwmeester, A. R. Fernie and H. J. Klee** (2010). "SICCD7 controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato." *Plant J* 61(2): 300-311.
- Vogelmann, H., A. Bischof, D. Pape and F. Wagner** (1978). Some aspects on mass cultivation. Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods. A. W. Alfermann and E. Reinhard. München, GSF: 130-146.
- Walter, C.** (1999). Entwicklung und Scale-up eines thermisch sterilisierbaren, extern beleuchteten Photobioreaktors.

- Wang, H. Q., J. T. Yu and J. J. Zhong** (1999). "Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by sucrose feeding strategy." *Process Biochemistry* 35(5): 479-483.
- Wang, Y. S., L. P. Gao, Z. R. Wang, Y. J. Liu, M. L. Sun, D. Q. Yang, C. L. Wei, Y. Shan and T. Xia** (2012). "Light-induced expression of genes involved in phenylpropanoid biosynthetic pathways in callus of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)." *Scientia Horticulturae* 133: 72-83.
- Wang, Z. H., C. C. Hsu, C. N. Huang and M. C. Yin** (2010). "Anti-glycative effects of oleanolic acid and ursolic acid in kidney of diabetic mice." *Eur J Pharmacol* 628(1-3): 255-260.
- Watanabe, M. and S. Malla** (1988). *Cryptogams of the Himalayas: The Kathmandu Valley*, Department of Botany, National Science Museum.
- Waterbury, J. B., S. W. Watson, R. R. L. Guillard and L. E. Brand** (1979). "Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium." *Nature* 277(5694): 293-294.
- Weiler, E. W. and L. Nover** (2008). *Allgemeine und molekulare Botanik*, Thieme.
- Weisenberger, S. and A. Schumpe** (1996). "Estimation of gas solubilities in salt solutions at temperatures from 273 K to 363 K." *Aiche Journal* 42(1): 298-300.
- Weissman, J. C., R. P. Goebel and J. R. Benemann** (1988). "Photobioreactor design: Mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation." *Biotechnol Bioeng* 31(4): 336-344.
- Weuster-Botz, D., J. Altenbach-Rehm and A. Hawrylenko** (2001). "Process-engineering characterization of small-scale bubble columns for microbial process development." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24(1): 3-11.
- Whitmer, S., C. Canel, D. Hallard, C. Gonçalves and R. Verpoorte** (1998). "Influence of Precursor Availability on Alkaloid Accumulation by Transgenic Cell Line of *Catharanthus roseus*." *Plant Physiology* 116(2): 853-857.
- Whitton, B. A. and C. Sinclair** (1975). "Ecology of Blue-Green-Algae." *Science Progress* 62(247): 429-446.
- Wijffels, R. H., M. J. Barbosa and M. H. M. Eppink** (2010). "Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels." *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr* 4(3): 287-295.
- Winder, G. B. M. d.** (1990). *Ecophysiological strategies of drought tolerant phototrophic micro-organisms in dune soils*. PhD, Amsterdam.
- Wongsamuth, R. and P. M. Doran** (1994). "Foaming and cell flotation in suspended plant cell cultures and the effect of chemical antifoams." *Biotechnol Bioeng* 44(4): 481-488.
- Xue, S. Z., Q. H. Zhang, X. Wu, C. H. Yan and W. Cong** (2013). "A novel photobioreactor structure using optical fibers as inner light source to fulfill flashing light effects of microalgae." *Bioresource Technology* 138: 141-147.
- Yamada, Y. and F. Sato** (1981). "Production of berberine in cultured cells of *Coptis japonica*." *Phytochemistry* 20(3): 545-547.
- Yamamoto, Y., R. Mizuguchi and Y. Yamada** (1982). "Selection of a high and stable pigment-producing strain in cultured *Euforbia millii* cells." *Theoretical and Applied Genetics* 61: 113-116.
- Yan, S.-l., C.-y. Huang, S.-t. Wu and M.-c. Yin** (2010). "Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines." *Toxicology in Vitro* 24(3): 842-848.



Yang, C., Q. Hua and K. Shimizu (2000). "Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions." *Biochemical Engineering Journal* 6(2): 87-102.

Ying, H., L. Yao-ying and L. Shang-hao (1992). "Preliminary study on the Blue-Green Algae Community of Arid Soil in Qaidam Basin." *Acta Botanica Sinica* 34(3): 161-168.

Yu, F., A. M. K. Thamm, D. Reed, N. Villa-Ruano, A. L. Quesada, E. L. Gloria, P. Covello and V. De Luca (2013). "Functional characterization of amyrin synthase involved in ursolic acid biosynthesis in *Catharanthus roseus* leaf epidermis." *Phytochemistry* 91: 122-127.

Zakhia, F., A.-D. Jungblut, A. Taton, W. Vincent and A. Wilmotte (2008). *Cyanobacteria in Cold Ecosystems. Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology.* R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx and C. Gerday, Springer Berlin Heidelberg: 121-135.

Zhong, J. J., T. Seki, S. I. Kinoshita and T. Yoshida (1992). "Effects of surfactants on cell growth and pigment production in suspension cultures of *Perilla frutescens*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8(2): 106-109.

Zhong, J. J., J. T. Yu and T. Yoshida (1995). "Recent advances in plant cell cultures in bioreactors." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11(4): 461-467.

Zittelli, G. C., R. Pastorelli and M. R. Tredici (2000). "A Modular Flat Panel Photobioreactor (MFPP) for indoor mass cultivation of *Nannochloropsis* sp under artificial illumination." *Journal of Applied Phycology* 12(3-5): 521-526.

Zuber, H. (1979). "Thermophile Bakterien." *Chemie in unserer Zeit* 13(6): 165-175.

Anhang

A Methodenteil

A.1 Bestimmung von verfahrenstechnischen Parametern

A.1.1 Bestimmung des Leistungseintrages

Wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben, ist der Leistungseintrag (auch Leistungsdichte) eine wichtige Kenngröße bei der Kultivierung von Mikroorganismen. Die Berechnung ist dabei abhängig von vielen verschiedenen Faktoren (der eingebrachten Leistung durch Rührer und Begasung, sowie der Geometrie aller Bauteile) und daher je nach verwendetem System sehr unterschiedlich. Für die in dieser Arbeit verwendeten Reaktorsysteme sind die für eine Berechnung des volumetrischen Leistungseintrages verwendeten Formeln und Grafiken nachfolgend dargestellt. Eine Berechnung ist dabei nie so exakt wie eine direkte Messung an dem verwendeten Kultivierungssystem, welche aber aufgrund der notwendigen technischen Geräte meistens nicht möglich ist.

A.1.1.1 Rührkessel

Der Leistungseintrag in einem Rührkesselreaktor mit einem 2-stufigen Scheibenrührer, Stromstörern und einem Medium, das annähernd die Dichte von Wasser hat, kann bei turbulenten Strömungsverhältnissen laut (Storhas 2000) mit Formel (20) berechnet werden:

$$\frac{P}{V} \sim \frac{n^3}{\sqrt{1 + 8,17 \cdot q \cdot f_s \cdot \sqrt{\frac{D}{g}}}} \quad (20)$$

$P/V =$	Volumetrischer Leistungseintrag	$[W m^{-3}]$
$n =$	Drehzahl	$[min^{-1}]$
$q =$	Begasungsrate	$[vvm]$
$f_s =$	Schlankheitsgrad H/D	$[-]$
$D =$	Durchmesser des Reaktors	$[m]$
$g =$	Erdbeschleunigung	$[m s^{-2}]$

Die Abmessungen des verwendeten Rührreaktors sind in Abbildung 43 dargestellt. Obwohl der verwendete Reaktor die Voraussetzungen der oben beschriebenen Formel im Hinblick auf die geometrischen Größen nicht erfüllt (die betrachteten Reaktoren waren größer), liefert die



dargestellte Formel die beste Möglichkeit, den Leistungseintrag abzuschätzen. Exakte Werte liefert nur eine Messung direkt am verwendeten System.

A.1.1.2 Blasensäule

Der Leistungseintrag in einer Blasensäule ist ausschließlich bestimmt durch die pneumatische Leistung, die bei der Begasung entsteht. Nach (Storhas 2000) gilt daher allgemein Formel (21):

$$\frac{P}{V} = \frac{\dot{V}_G \cdot \rho_L \cdot g \cdot H_f}{V_L} \quad (21)$$

$P/V =$	Volumetrischer Leistungseintrag	$[W \text{ m}^{-3}]$
$V_G =$	Gasvolumenstrom	$[m^3 \text{ s}^{-1}]$
$\rho_L =$	Dichte des Mediums	$[g \text{ L}^{-1}]$
$g =$	Erdbeschleunigung	$[m \text{ s}^{-2}]$
$H_f =$	Füllhöhe	$[m]$
$V_L =$	Flüssigkeitsvolumen	$[L]$

A.1.1.3 Schüttelkolben

Der Leistungseintrag in einem Schüttelkolben ist abhängig von der Drehzahl (Schüttelfrequenz), der Geometrie des betrachteten Kolbens (Nennvolumen, Stromstörer) und dem verwendeten Füllvolumen.

Nach (Storhas 2000) gilt für 300 mL Schüttelkolben mit 3 Stromstörern Formel (22):

$$\frac{P}{V} = 1,17 \cdot 10^{-6} \cdot \frac{n^{2,95}}{V^{0,62}} \quad (22)$$

$P/V =$	Volumetrischer Leistungseintrag	$[W \text{ m}^{-3}]$
$n =$	Schüttlerfrequenz	$[s^{-1}]$
$V =$	Füllvolumen	$[m^3]$

Nach (Peter et al. 2006) gilt für 500 mL Schüttelkolben mit 3 Stromstörern und einem Füllvolumen von 50 mL Formel (23):

$$\frac{P}{V} = 4,18 \cdot 10^{-7} \cdot n^{3,03} \quad (23)$$

$P/V =$ Volumetrischer Leistungseintrag $[W m^{-3}]$

$n =$ Schüttelfrequenz $[s^{-1}]$

Da sich nach der Formel von Storhas und Kollegen der Leistungseintrag bei einer Verdreifachung des Füllvolumens halbiert, wurde der aus Formel (23) nach Peter und Kollegen berechnete Leistungseintrag für einen Kolben mit 500 mL Nennvolumen, 3 Stromstörern und einem Füllvolumen von 150 mL entsprechend auch halbiert.

Der Leistungseintrag für Schüttelkolben ohne Stromstörer kann nach (Storhas 2012) aus Abbildung 99 abgelesen bzw. anhand der angegebenen Gleichungen für eine bestimmte Schüttelfrequenz berechnet werden.

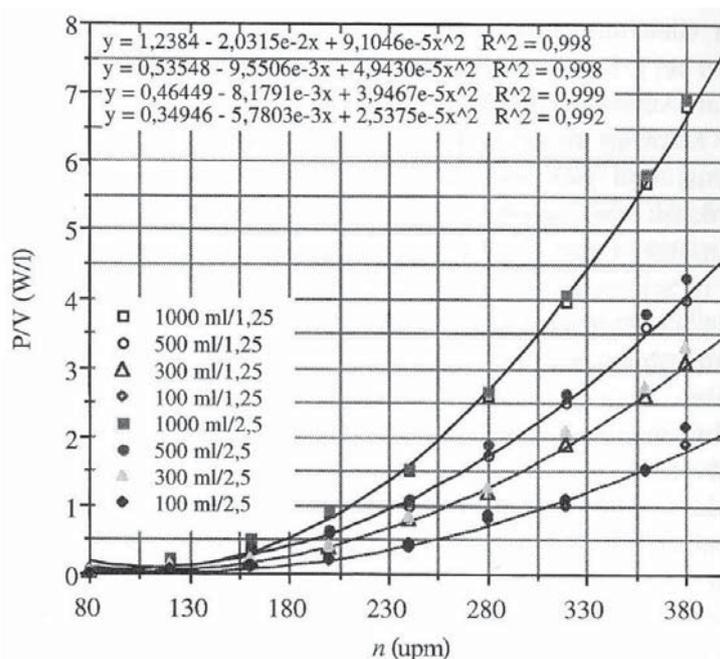


Abbildung 99: Leistungseintrag in Schüttelkolben ohne Stromstörer in Abhängigkeit von Schüttelfrequenz und Volumen nach (Storhas 2012).

A.1.1.4 Wavebag-Reaktor

Der Leistungseintrag in einem Wavebag-Reaktor ist abhängig vom Füllvolumen des Wavebags, dem Neigungswinkel des Tablars, sowie der Geschwindigkeit der ausgeführten Kipp-Bewegung. Ein weiterer Faktor ist die individuelle Geometrie des verwendeten Wavebags, welche ja nach Hersteller unterschiedlich ist. Für das in dieser Arbeit verwendete Wavebag-Reaktorsystem (Cultibag RM, Sartorius GmbH, Göttingen) wurde der Leistungseintrag bereits untersucht und unter Variation der oben genannten Parameter in Abbildung 100 dargestellt. Der



entsprechende Leistungseintrag kann bei der Verwendung von 1 L Kultursuspension und einem Neigungswinkel von 10° abgelesen werden.

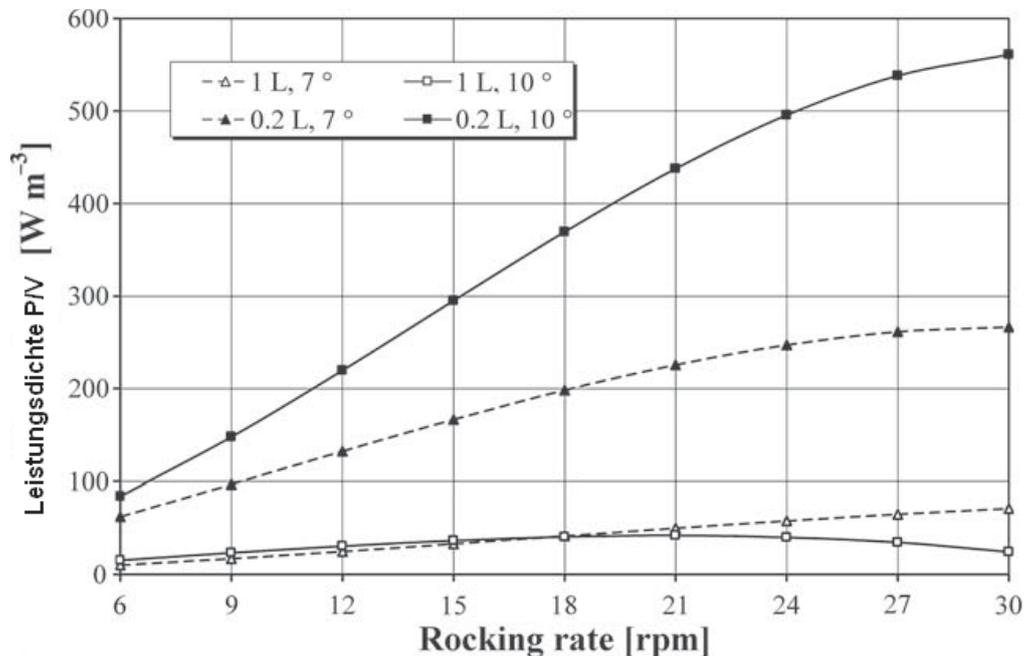


Abbildung 100: Abhängigkeit der Leistungsdichte von Volumen, dem Neigungswinkel des Tablars und der Frequenz der Kipp-Bewegung; die dargestellten Daten sind für individuell für BioWave® und BIOSTAT® CultiBag RM Reaktorsysteme (Eibl et al. 2009).

A.1.2 Bestimmung des k_{LA} -Wertes

Der spezifische Stofftransportkoeffizient k_{LA} [h^{-1}] setzt sich aus der spezifischen Stoffaustauschfläche a [m^{-1}] und dem Stofftransportkoeffizienten k_L [$m s^{-1}$] zusammen. Der k_{LA} -Wert ist eine wichtige Kenngröße, um Bioreaktoren zu vergleichen, da er direkt widerspiegelt, wie gut die Mikroorganismen mit Sauerstoff oder Kohlenstoffdioxid während der Kultivierung versorgt werden. Großen Einfluss auf den k_{LA} -Wert und damit auf den Stofftransport hat neben der Begasung der Leistungseintrag, durch den die primäre Stoffaustauschfläche vergrößert werden kann. Neben der Möglichkeit, den k_{LA} -Wert experimentell zu bestimmen, gibt es mehrere Möglichkeiten, diesen zu berechnen. Die Genauigkeit der berechneten Werte beruht allerdings auf den zugrundeliegenden empirischen Gleichungen und ist nicht so genau wie eine direkte Messung. Um diese durchführen zu können, wird allerdings eine entsprechende Sensorik (O_2 -Sonde, CO_2 -Sonde) benötigt, was nicht in jedem Reaktorsystem verfügbar ist. Nachfolgend dargestellt sind die Ergebnisse der experimentellen k_{LA} -Wert Bestimmung im Rührreaktor sowie verschiedene Formeln, um den k_{LA} -Wert zu berechnen.

Der k_{La} -Wert für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid wurde im Rührreaktor mit Hilfe der dynamischen Ausgasungsmethode bestimmt. Für die Messung des gelösten Sauerstoffgehaltes wurde ein Gelöstgas-Sensor von Mettler Toledo verwendet. Zunächst wurde mit Hilfe von Stickstoff eine Nullpunkt-Kalibrierung der Sauerstoffsonde durchgeführt und anschließend zur Bestimmung des k_{La} -Wertes für Sauerstoff das Medium mit Luft begast, der gemessene Wert an gelöstem Sauerstoff dann gegen die Zeit aufgetragen (Chmiel 2006).

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = k_{La} \cdot (c_i^* - c_l) \quad (24)$$

Durch Integration erhält man Formel (25):

$$\ln \frac{c_i^*}{c_i^* - c_l(t)} = k_{La} \cdot t \quad (25)$$

Es wird $\ln \frac{c_i^*}{c_i^* - c_l(t)}$ gegen die Zeit aufgetragen, und die Steigung der linearen Regression entspricht dem k_{La} -Wert. Nach Doran können die Variablen c_i^* gegen 100% und $c_l(t)$ gegen $pO_2(t)$ ausgetauscht werden (Doran 1995). Die zur Berechnung der Werte erforderlichen linearen Regressionen sind in Abbildung 101 inkl. ihres Bestimmtheitsmaßes R^2 dargestellt.

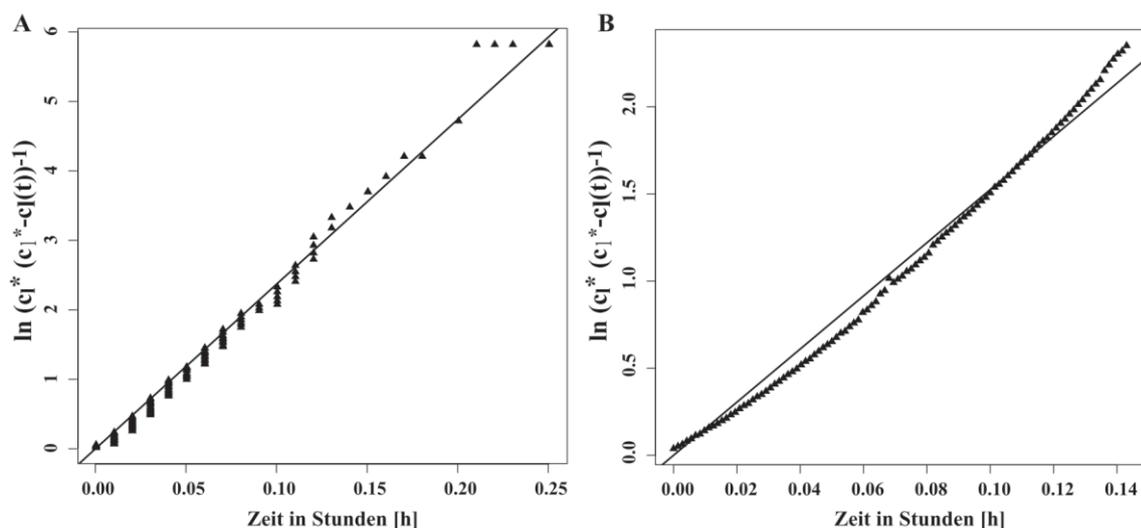


Abbildung 101: Ergebnisse der Ausgasungsmethode zur Bestimmung des k_{La} für CO_2 und O_2 . A = Lineare Regression zur Berechnung des k_{La} -Wertes für Sauerstoff. Bestimmtheitsmaß = 0,9939; $k_{La} = 23,7066 \text{ h}^{-1}$; B = Lineare Regression zur Berechnung des k_{La} -Wertes von Kohlenstoffdioxid. Bestimmtheitsmaß = 0,9966; $k_{La} = 15,253 \text{ h}^{-1}$.

Der experimentell bestimmte k_{La} -Wert für Sauerstoff beträgt demnach $23,71 \text{ h}^{-1}$ und der für Kohlenstoffdioxid $15,25 \text{ h}^{-1}$. Beide Werte haben ein Bestimmtheitsmaß von mehr als 99 %. Weitere experimentelle Möglichkeiten zur Bestimmung des k_{La} -Wertes sind die statische Methode (Doran 2013), die klassische Sulfitoxidationsmethode (Cooper et al. 1944), die dynamische Sulfitmethode (Havelka et al. 1998), sowie die Druckmethode (Linek et al. 1989).



Generell können sich die Messergebnisse der einzelnen Methoden zur k_{La} -Bestimmung je nach Betriebspunkt des Reaktors stark unterscheiden, so dass eine sorgfältige Evaluation der erhaltenen Messergebnisse vorgenommen werden muss (Linek et al. 1987). Laut (Storhas 2000) sieht eine allgemeine Formel zur Abschätzung des k_{La} -Wertes wie folgt aus:

$$k_{La} \sim A \cdot \left(\frac{P_R}{V_{R,L}} \right)^a \cdot u_G^b \quad (26)$$

k_{La} =	spezifischer Stofftransportkoeffizient	[s ⁻¹]
P_R =	Rührerleistung	[W]
$V_{R,L}$ =	Flüssigreaktionsvolumen	[m ³]
u_G =	Gasleerrohrgeschwindigkeit	[m s ⁻¹]
A =	Konstante	[-]
a, b =	Exponenten	[-]

Die Exponenten weisen die Fähigkeit eines Rührsystems aus, in wie weit es den spezifischen Leistungseintrag (a) und den Luftstrom (b) in eine Stofftransferleistung umsetzt. Laut (Henzler 1982) gilt für die meisten betrachteten Systeme der Zusammenhang $a + b = 1$. Konkret lässt sich aus dieser Formel für Rührreaktoren bis 2 L Volumen, einer Begasungsrate von 0,1 bis 2 vvm, u_G zwischen 0,0006-0,02 m s⁻¹, einer Viskosität von etwa 1 mPa·s und einem Leistungseintrag zwischen 0,01-16,3 kW m⁻³ nach (Storhas 2000) Formel (27) ableiten:

$$k_{La} = 0,01 \cdot \left(\frac{P_R}{V_{R,L}} \right)^{0,55} \cdot u_G^{0,43} \quad (27)$$

Die Gasleerrohrgeschwindigkeit kann nach Gleichung (28) bestimmt werden:

$$u_G = 18,1 \cdot 10^{-3} \cdot q \cdot \sqrt[3]{V_{R,L} \cdot f_S^2} \quad (28)$$

u_G =	Gasleerrohrgeschwindigkeit	[m s ⁻¹]
$V_{R,L}$ =	Flüssigreaktionsvolumen	[m ³]
q =	Begasungsrate	[vvm]
f_S =	Schlankheitsgrad H/D	

Für Blasensäulen mit den unten genannten Parametern gilt nach (Shah et al. 1982) Gleichung (29):

$$k_L a = b \cdot (u_g)^n \quad (29)$$

$u_G =$ Gasleerrohrgeschwindigkeit [m s⁻¹]

$b, n =$ Variable [-]

Die Variablen b und n sind abhängig von dem verwendeten Medium, den Spezifikationen der Blasensäule und der verwendeten Gasleerrohrgeschwindigkeit. In reinem Wasser, einer Blasensäule von 0,2 m Durchmesser, einer Höhe von 2-7,2 m, einer Düse und einer Gasleerrohrgeschwindigkeit zwischen 0,002 und 0,08 m/s betragen $b = 0,467$ und $n = 0,82$.

Für Schüttelkolben (mit $e = 2,5$; $e = 4,2$; $e = 5$) ohne Stromstörer gilt nach (Storhas 2000) Gleichung (30):

$$k_L a = 1,6 \cdot 10^{-6} \cdot \left[\frac{n \cdot e^{1/3}}{V_{R,L}} \right]^{5/6} \quad (30)$$

$n =$ Drehzahl (Schüttelfrequenz) [s⁻¹]

$e =$ Exzentrizität bei Schüttlern [m]

$V_{R,L} =$ Flüssigreaktionsvolumen [m³]

Die $k_{L,a}$ -Werte des Wavebag-Reaktors werden vom dem Hersteller Sartorius in Abbildung 102 dargestellt.

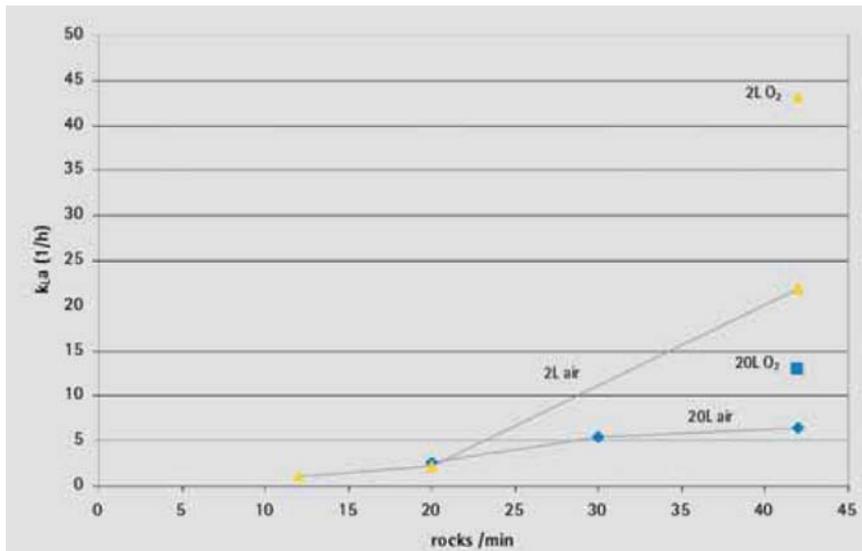


Abbildung 102: $k_{L,a}$ -Werte des Cultibag RM bestimmt mit Hilfe der Ausgasungsmethode in Abhängigkeit der Wavebag-Größe und der Schüttelfrequenz nach Sartorius GmbH.

Die maximalen $k_{L,a}$ -Werte bei voller Schüttelfrequenz, maximalem Neigungswinkel und der Verwendung von Raumluft liegen bei 22 h^{-1} und bei $43,2 \text{ h}^{-1}$ unter Verwendung von reinem Sauerstoff jeweils in einem 2 L Wavebag.

Nach Bonarius und Kollegen besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem $k_{L,a}$ -Wert von Sauerstoff und dem von CO_2 , so dass der $k_{L,a}$ -Wert von Sauerstoff mit einem Faktor von 0,893 multipliziert werden kann um den entsprechenden Wert für CO_2 zu erhalten (Bonarius et al. 1995).

A.1.3 Sauerstofftransferrate OTR (Oxygen Transfer Rate)

Die OTR wird unter anderem von der spezifischen Stoffaustauschfläche und dem Stofftransportkoeffizienten der Flüssigkeit beeinflusst. Dadurch ist die OTR auch direkt abhängig von dem verwendeten Leistungseintrag bei der Kultivierung. Aufgrund der Zweifilmtheorie wird angenommen, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Sauerstofftransports der Widerstand zwischen der Gas- und der Flüssigkeitsgrenzschicht ist. Mit dem entsprechenden Transportwiderstand $k_{L,a}$ gilt die allgemeine Stoffübergangsgleichung:

$$OTR = k_{L,a} \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) \quad (31)$$

$k_L =$	Stoffübergangskoeffizient	$[\text{m s}^{-1}]$
$a =$	volumenbezogene spezifische Grenzfläche	$[\text{m}^2 \text{m}^{-3}]$
$c_{O_2}^* =$	Gleichgewichtskonzentration an der Phasengrenzfläche	$[\text{mol L}^{-1}]$
$c_{O_2} =$	Gaskonzentration der Lösung in	$[\text{mol L}^{-1}]$

Bei nicht limitierten, aeroben Prozessen ist die OTR gleich der Sauerstoffaufnahme rate OUR:

$$OTR = OUR \quad (32)$$

Die OUR kann durch die Massenbilanz des Sauerstoffs in Zu- und Abluft (z. B. durch eine Abgasanalytik) wie folgt bestimmt werden:

$$OUR = \frac{(y_{O_2,in} - y_{O_2,out}) \cdot F_G}{V_M} \cdot \frac{M_{O_2}}{V_L} \quad (33)$$

$y_{O_2,in}$ =	Molanteil des Sauerstoffs in der Zuluft	[-]
$y_{O_2,out}$ =	Molanteil des Sauerstoffs in der Abluft	[-]
F_G =	Gasvolumenstrom	[L h ⁻¹]
V_M =	Molvolumen des idealen Gases	[mol L ⁻¹]
M_{O_2} =	Molmasse von Sauerstoff	[g mol ⁻¹]
V_L =	Flüssigkeitsvolumen	[L]

Aus Formel (32) ergibt sich mit Formel (33) und Formel (31) folgende Beziehung zur Bestimmung des $k_L a$:

$$k_L a = \frac{OUR}{c_{O_2}^* - c_{O_2}} \quad (34)$$

Die Gelöstsauerstoffkonzentration an der Phasengrenze kann mit dem Henry-Gesetz berechnet werden:

$$c_{O_2}^* = k_H \cdot p_{O_2} \quad (35)$$

$c_{O_2}^*$ =	Gleichgewichtskonzentration an der Phasengrenzfläche	[mol L ⁻¹]
k_H =	Henry-Konstante	[mol m ⁻³ bar ⁻¹]
p_{O_2} =	Sauerstoffpartialdruck	[bar]

Ist der $k_L a$ -Wert bekannt und kann die Gaskonzentration in Lösung bestimmt werden, ist somit eine Berechnung der momentanen OTR in der Kultivierung möglich. Mit Hilfe dieses Wertes kann online nachvollzogen werden, in welchem Stadium des Wachstums sich die Organismen zurzeit befinden und ob ggfs. Limitierungen vorliegen (Hansen et al. 2012).



Der Sauerstoffübergangskoeffizient wurde berechnet, da nach Bonarius ein Zusammenhang zum Kohlenstoffdioxidübergangskoeffizienten besteht (Bonarius et al. 1995).

A.1.4 Bestimmung der Beleuchtungsstärke

Die Beleuchtungsstärke aller Versuche wurde mit Hilfe eines Quantumsensors der Firma Licor (Licor 190A, Licor-Biosciences USA) bestimmt. Die Angabe der Beleuchtungsstärke erfolgt in der für phototrophe Organismen üblichen Einheit $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im photosynthetisch aktiven Wellenlängenbereich des Lichtes PAR (380-780 nm).

A.1.5 Bestimmung der Oberflächenrauheit

Die arithmetische Mittenrauheit (Ra) der verwendeten Oberflächen des emersen Photobioreaktors wurde am Lehrstuhl für Biophysik von Prof. Ziegler mit Hilfe eines AFM (MFP3D, Asylum Research) bestimmt und wird in der Einheit [nm] angegeben.

A.1.6 Berechnung der CO₂-Löslichkeit nach Weisenberger

Die Löslichkeit von Kohlenstoffdioxid ist abhängig von der Temperatur und der Elektrolytlösung. Aus diesem Grund wurde die Löslichkeit von CO₂ in dem verwendeten Medium bei 24 °C nach Weisenberger berechnet. Zur Korrektur der Henry-Konstante in Salzlösungen wurde die Sechenov-Konstante K_{C_s} verwendet.

Nach Henry gilt:

$$k_H^T = \frac{c_i}{p_i} \quad (36)$$

k_H^T = Henry-Konstante [mol L⁻¹ atm⁻¹]

p_i = Partialdruck [atm]

k_H^T berechnet sich aus Formel (33):

$$k_H^T = k_H^0 \cdot e^{\left(\frac{-d \ln k_H}{dT^{-1}} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^\theta}\right)\right)} \quad (37)$$

Mit

$$k_H^0 = 3,4 \cdot 10^{-2} \quad (38)$$

$$\frac{-d \ln k_H}{dT^{-1}} = 2400K \quad (39)$$

$k_H^T =$	Henry-Konstante bei T	[mol L ⁻¹ atm ⁻¹]
T =	Interessierende Temperatur	[K]
T ₀ =	Temperatur bei Standardbedingungen	[298,15 K]
$k_H^0 =$	Henry-Konstante bei Standardbedingungen	[mol L ⁻¹ atm ⁻¹]
$\frac{-d \ln k_H}{dT^{-1}} =$	Temperaturabhängigkeitsparameter	[K]

Zur Berechnung der CO₂-Löslichkeit in Elektrolytlösungen wurde die Sechenov-Konstante nach (Weisenberger&Schumpe 1996) verwendet:

$$K_{CS} = \log \left(\frac{C_{G_0}}{C_G} \right) \quad (40)$$

$K_{CS} =$	Sechenov-Konstante	
$C_{G_0} =$	Gaskonzentration in Deionat	[mol L ⁻¹]
$C_G =$	Gaskonzentration der Salzlösung	[mol L ⁻¹]

Die Sechenov-Konstante K_{CS} wurde durch Formel (37) ermittelt:

$$K_{CS} = \log \left(\frac{C_{G_0}}{C_G} \right) = \sum (h_i + h_G) \cdot C_i \quad (41)$$

$h_G =$	Gasspezifischer Parameter	[L mol ⁻¹]
$h_i =$	Salzspezifischer Parameter	[L mol ⁻¹]
$c_i =$	Ionenkonzentration	[mol L ⁻¹]

h_G ist temperaturabhängig und lässt sich mit Gleichung (38) berechnen:

$$h_G = h_{G_0} + h_T(T - 298,15K) \quad (42)$$

$h_T =$	Gasspezifischer Temperaturparameter	[L mol ⁻¹ K ⁻¹]
$h_{G_0} =$	Spezifischer Gasparameter bei Standardbedingungen	
T =	Temperatur	[K]



h_{G0} und h_i können der Veröffentlichung von (Weisenberger&Schumpe 1996) entnommen werden. Die Werte von h_i wurden durch Umformen der Aktivitätsgleichung berechnet. Für die korrigierte Henry-Konstante ergibt sich:

$$k_H^T = 0,0348 = 3,5 \cdot 10^{-2} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{atm}} \right] \quad (43)$$

Insgesamt ergibt sich unter Berücksichtigung der Temperatur und der gelösten Salze für k_H^T folgender Zusammenhang:

$$k_H^T = \frac{k_H^0 \cdot e^{\left(\frac{-d \ln k_H}{dT^{-1}} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^0} \right) \right)} }{10^{K_{cs}}} \quad (44)$$

Je nach Elektrolytlösung ergibt sich ein anderer Wert für die Sechenov-Konstante.

A.2 Methodenteil Pflanzenzellkultivierung

A.2.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung der Stämme von *Salvia officinalis* erfolgte auf LS-Medium Agarplatten in einem Thermoinkubationsschrank bei 28 °C. Die Kalluskulturen wurden alle zwei Wochen auf frische Platten überimpft und die Vitalität optisch überprüft.

A.2.2 Ansetzen der Vorkulturen

Als Vorkulturen wurden weitere LS-Medium-Agarplatten mit etwa 0,1 bis 0,2 g des entsprechenden Kallus der Stammhaltung steril beimpft. Die exakte Biomasse, die zum Animpfen verwendet wurde, konnte durch Wägung der Ausgangsplatte vor und nach dem Überimpfen bestimmt werden. Auf eine submerse Vorkultivierung wurde verzichtet, da eine exakte Bestimmung der eingesetzten Biomasse aufgrund der Aggregatbildung während des Wachstums nicht möglich ist.

A.2.3 Animpfen der Hauptkulturen

Die Hauptkulturen der Versuche mit Schüttelkolben wurden mit 0,1 bis 0,3 g Biomasse der oben beschriebenen Vorkultur je Kolben beimpft. Die genaue Bestimmung der verwendeten Biomasse erfolgte auch hier über Wägung der Vorkultur vor und nach Entnahme der Biomasse. Bei Versuchen im Wavebag-Reaktor wurden 1 bis 1,5 g Biomasse zum Animpfen verwendet, da das Volumen entsprechend größer ist. Das Inokulum wurde in diesem Fall zunächst in 10 mL sterilem LS-Medium gelöst und anschließend mit Hilfe einer Einwegspritze über eine Luer-/Lock-Verbindung in den Wavebag überführt.

A.2.4 Probennahme

Die Schüttelkolbenversuche wurden als sogenannte „Schlachtkolben“-Versuche durchgeführt, so dass der gesamte Inhalt eines Schüttelkolbens als Probe verwendet wird. Auf diese Art und Weise kann deutlich mehr Biomasse als Probe genommen werden, und die Genauigkeit der Analytik wird deutlich erhöht. Bei den Versuchen im Wavebag-Reaktor erfolgte die Probennahme durch die dafür vorgesehene Luer-/Lock-Verbindung am Wavebag mit Hilfe einer Einwegspritze. Es wurde stets ein Volumen von 5 mL steril entnommen, die Biomasse quantifiziert und die Probe für die Zuckeranalytik entsprechend weiter verarbeitet. Eine Bestimmung der Triterpene im Verlauf der Kultivierung erfolgte aufgrund der erforderlichen Biomasse nur im Schüttelkolben. Bei den Wavebag-Versuchen konnte nur eine Endpunktbestimmung der Triterpene durchgeführt werden.



A.2.5 Ernte der Biomasse und Quantifizierung

Um die Biomasse aus der Kultursuspension zu gewinnen, wird das gesamte Probenvolumen mit Hilfe eines Tiefenfilters filtriert. Das Filtrat kann dann nach einer weiteren Sterilfiltration mit einem Membranfilter (0,2 μm Porendurchmesser) für die Zuckanalytik verwendet werden. Das Retentat wird zusammen mit dem Filter lyophilisiert. Die Biomasse kann dann durch die Differenzbildung aus dem Gewicht des lyophilisierten Filters mit der Biomasse und eines identischen Filters ohne Biomasse, der ebenfalls lyophilisiert wird, quantifiziert werden.

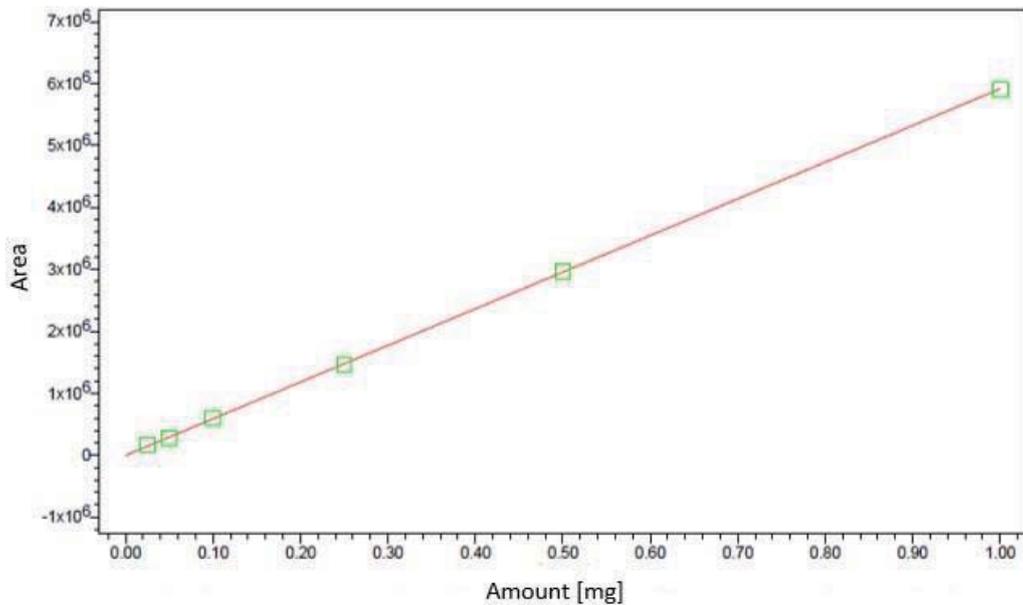
A.2.6 Extraktion der Triterpene

Da es sich bei den Triterpenen Oleanol- und Ursolsäure um intrazelluläre, wasserunlösliche Stoffe handelt, muss zur Quantifizierung zunächst ein Zellaufschluss und eine Extraktion durchgeführt werden. Durch die Verwendung von lyophilisierter Zellmasse, die für den Zellaufschluss in Ethanol suspendiert wird, lassen sich beide Prozessschritte kombinieren. Der Zellaufschluss erfolgt mit einer Schwingmühle bei 30 Hz für eine Dauer von 20 Minuten. Als Mahlkammer dienen 2 mL Reaktionsgefäße mit einem Füllgrad von 75 %, in denen Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,6 mm als Mahlkörper verwendet werden. Jeweils 50 mg lyophilisierte Biomasse werden in 1 mL Ethanol suspendiert und aufgeschlossen. Die Zelltrümmer werden nach dem Aufschluss durch Zentrifugation entfernt und die Konzentration der Triterpene mittels einer HPLC-Analytik nach (Leipold et al. 2010) bestimmt. Die zugrundeliegenden Kalibriergeraden sind im nachfolgenden Abschnitt dargestellt, die verwendeten Lösungen in Kapitel D.1.

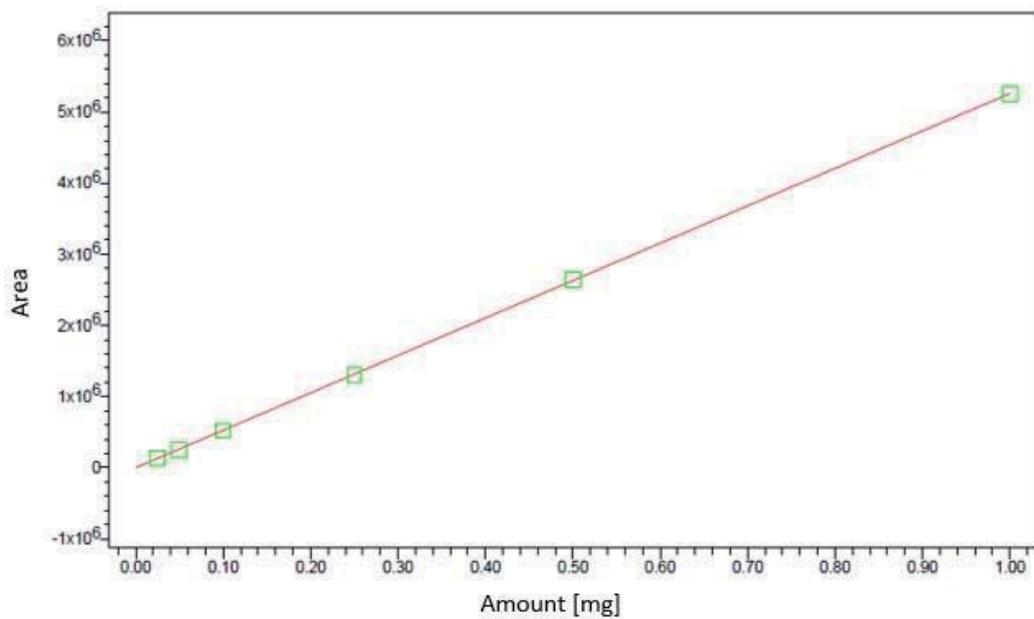
A.2.7 Kalibriergeraden der Triterpenanalytik

Nachfolgend sind die für die HPLC-Analytik verwendeten Kalibriergeraden der Pflanzenzellkultivierung dargestellt.

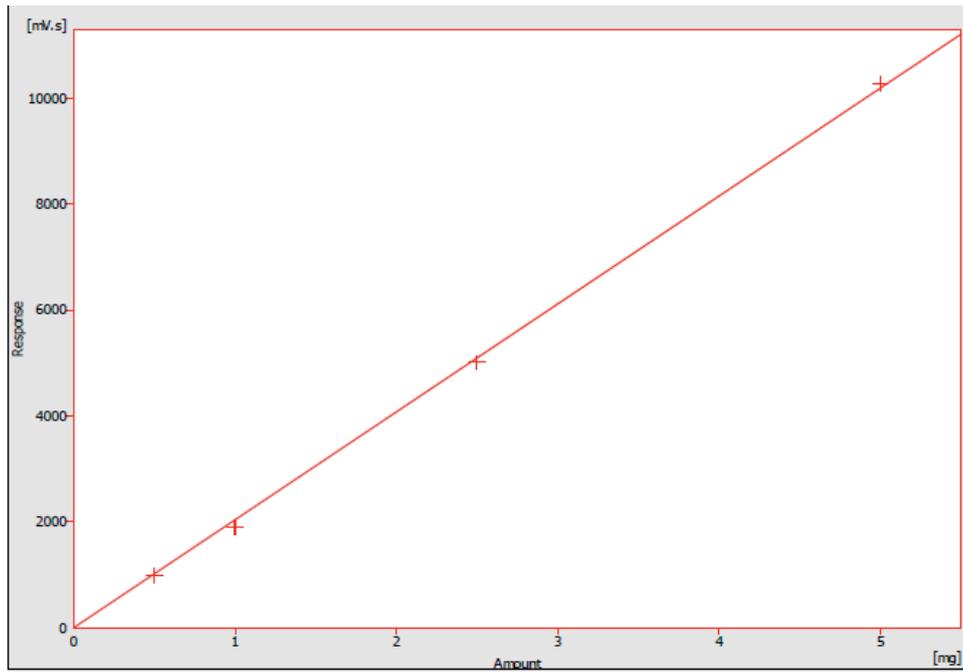
Kalibriergeraden der Versuche bei $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Schüttelkolben und im Wavebag-Reaktor



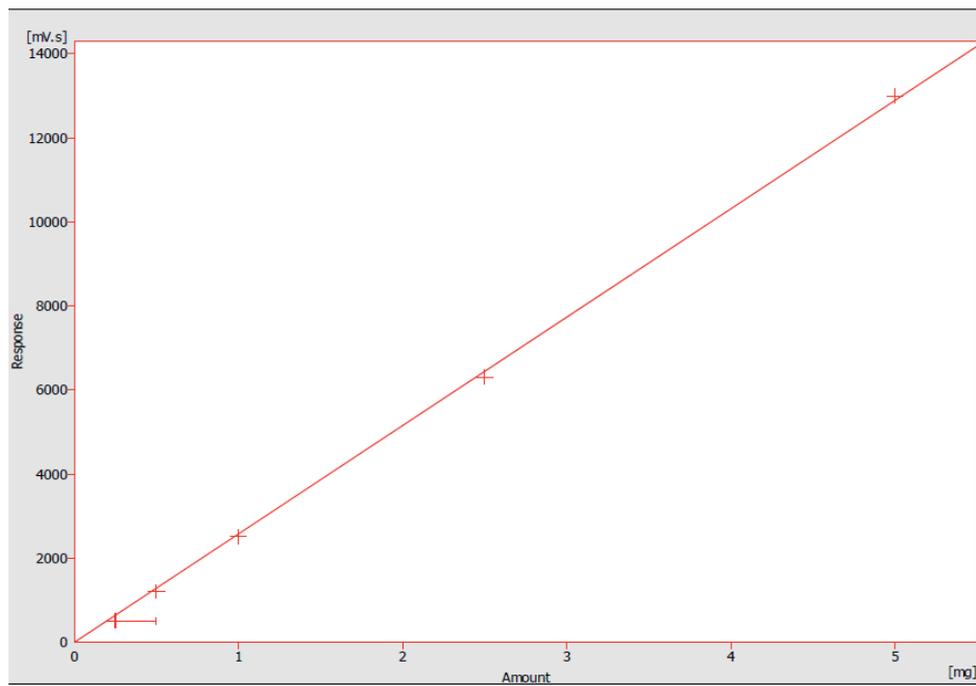
Kalibriergerade Ursolsäure



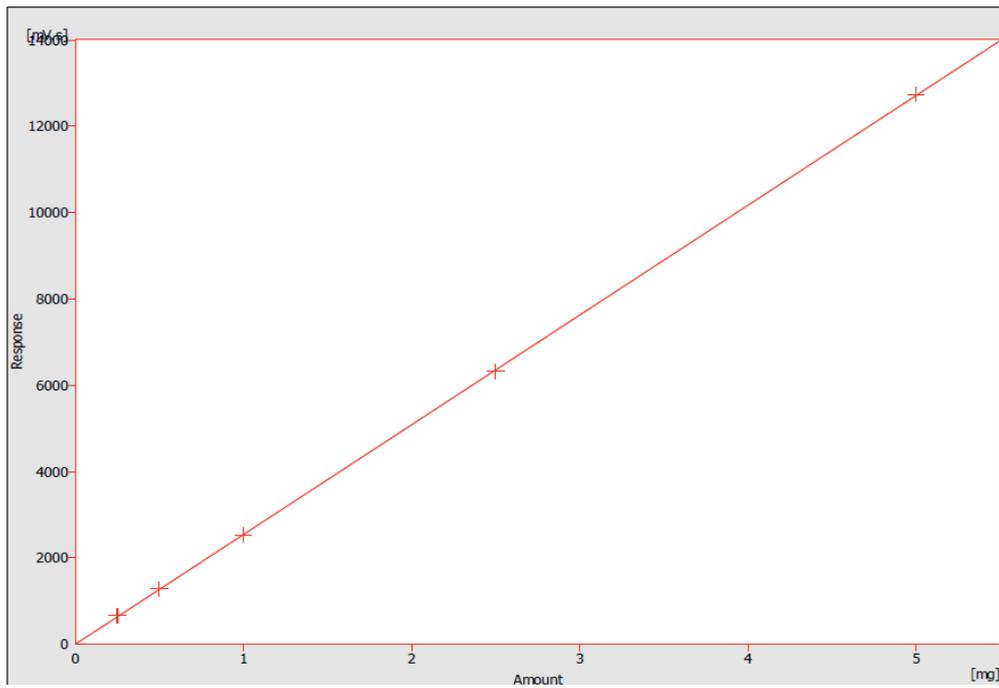
Kalibriergerade Oleanolsäure



Kalibriergerade Saccharose

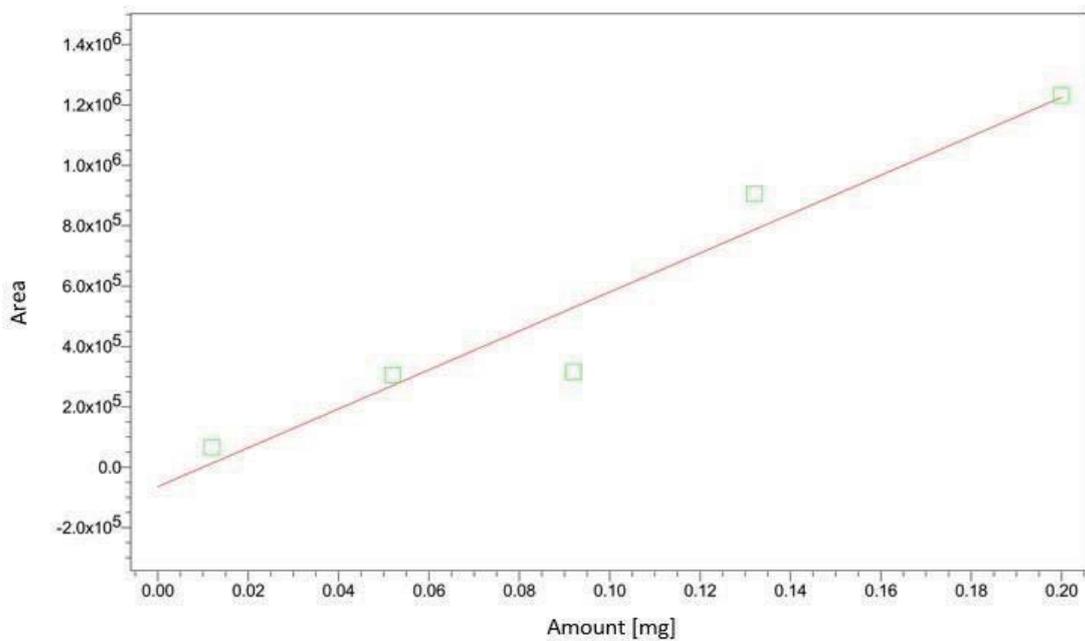


Kalibriergerade Glucose

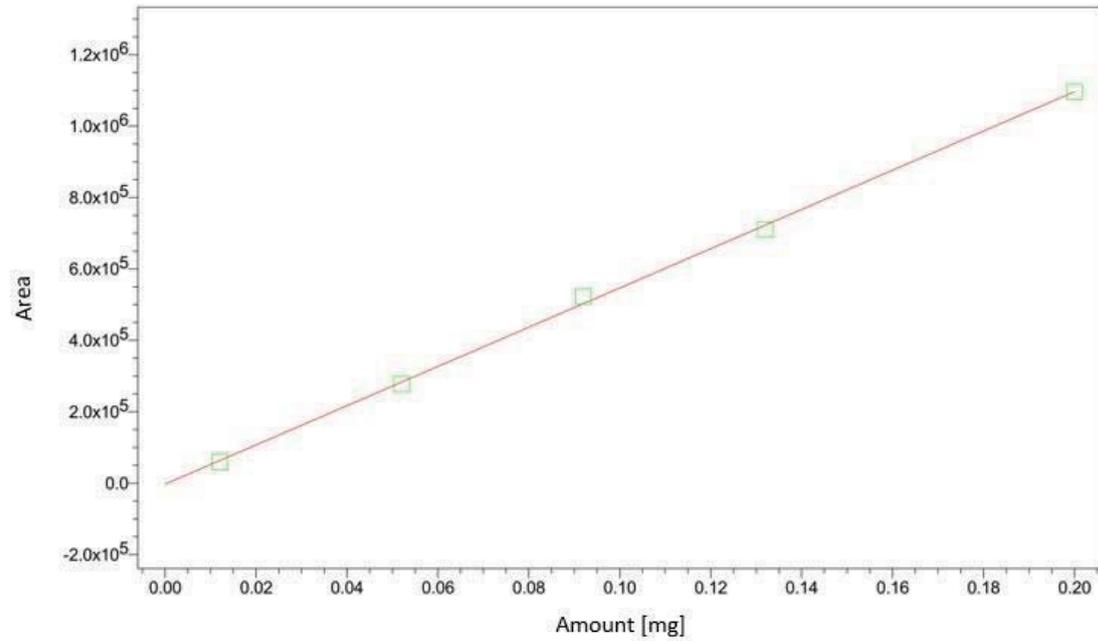


Kalibriergerade Fructose

Kalibriergeraden der Versuche bei verschiedenen Lichtstärken im Schüttelkolben



Kalibriergerade Oleanolsäure



Kalibriergerade Ursolsäure

Bei der Zuckernalytik wurden die gleichen Kalibriergeraden verwendet wie bei den Versuchen mit $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A.3 Methodenteil zur Kultivierung terrestrischer Cyanobakterien

A.3.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung aller Kulturen erfolgt am Lehrstuhl für Pflanzenökologie und Systematik von Prof. Dr. Büdel. Die Organismen werden dort bei konstant 4 °C und einer Lichtstärke von 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in BG 11 Medium gelagert.

A.3.2 Ansetzen der Vorkulturen

Zum Ansetzen einer Vorkultur wurden 10 mL Kultursuspension zusammen mit 40 mL BG 11 Medium in einen 300 mL Erlenmeyerkolben steril überführt und für 3 Tage inkubiert. Nach dieser Zeit befindet sich die Kultur in der Phase des exponentiellen Wachstums und kann zum Animpfen einer Hauptkultur verwendet werden.

A.3.3 Animpfen der Hauptkulturen

Zum Animpfen der Hauptkultur mit einer bestimmten Zellmasse wird die Kultursuspension der Vorkultur entnommen und bei 4000g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die pelletierte Biofeuchtmasse BFM gravimetrisch bestimmt. Die gewünschte Startmasse kann dann in frischem BG 11 Medium gelöst und zum Animpfen einer submersen Hauptkultivierung oder von Agarplatten verwendet werden. Eine Ausnahme bilden hier die Versuche mit dem emersen Photobioreaktor (ePBR). Die dafür verwendeten Methoden werden in Kapitel 6.8 eingehend beschrieben.

A.3.4 Probennahme

Die Probennahme erfolgte bei allen submersen Kultivierungen steril unter einer Clean-Bench (Schüttelkolben, Blasensäule) oder durch eine geeignete Probennahme-Vorrichtung (Rührreaktor). Dafür wurden 2 mL Kultursuspension entnommen und für weitere Untersuchungen in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. War für bestimmte Untersuchungen mehr Biomasse notwendig, wurden sogenannte Schlachtkolben-Versuche durchgeführt, bei denen der gesamte Inhalt eines Schüttelkolbens als Probe diente. Bei diesen Versuchen wurden mehrere Kolben gleich angeimpft und dann zum Zeitpunkt der Probennahme jeweils einer oder mehrere entnommen. Das gleiche Prinzip wurde bei den Versuchen mit dem emersen Photobioreaktor angewendet, da hier aus verfahrenstechnischen Gründe eine Probennahme während der Kultivierung nicht möglich war. Bei sowohl der Blasensäule als auch dem Rührreaktor war es innerhalb gewisser Grenzen möglich, sofern dies erforderlich sein sollte, mehr als 2 mL Kultursuspension als Probe zu entnehmen, ohne die Kultivierungsbedingungen signifikant zu verändern.



A.3.5 Bestimmung der Biomasse

Um die Daten dieser Arbeit mit anderen Veröffentlichungen vergleichen zu können, war es notwendig, jeweils neben der Biofeuchtmasse BFM auch die Biotrockenmasse BTM zu bestimmen. Dies wurde entweder direkt gravimetrisch nach einer Trocknung (48h, bei 70 °C) der Proben durchgeführt oder über eine Umrechnung der Biofeuchtmasse über einen entsprechenden stammspezifischen Korrelationsfaktor. Die verwendeten Korrelationsfaktoren inkl. der statistischen Parameter sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Zusammenfassung der linearen Regression von Feucht- und Trockenmasse der untersuchten Cyanobakterien *Trichocoleus sociatus* und *Nostoc muscorum*.

	<i>Trichocoleus sociatus</i>	<i>Nostoc muscorum</i>
Umrechnungsfaktor BFM zu BTM	0,0206072	0,038956
Multiple R-Squared	0,9854	0,9698
p-Wert	< 2·10 ⁻¹⁶	< 2·10 ⁻¹⁶
Signifikanzcode	< 0,001	< 0,001
Residualstandardfehler	0,001074	0,002449
Freiheitsgrade	19	20

A.3.6 Analytik der Photopigmente

Zur Bestimmung der gebildeten Menge an Photopigmenten wurde der Chlorophyllgehalt nach Porra und der Carotinoidgehalt nach Chamovitz ermittelt (Porra et al. 1989, Chamovitz et al. 1992). Hierfür wurden 0,1 g BFM in 2 mL Reaktionsgefäße abgewogen, in 2 mL gesättigter Methanol-Calciumcarbonat-Lösung suspendiert und für 60 Minuten im Wasserbad bei 60 °C und 1000 rpm geschüttelt. Daraufhin wurde die Lösung für eine Minute bei 4000 g abzentrifugiert, der Überstand wurde in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde mit derselben BFM wiederholt. Die Überstände wurden vereinigt und die OD bei den Wellenlängen 665 nm, 652 nm und 461 nm bestimmt. Der Chlorophyll-a-Gehalt wurde über die optische Dichte bei den Wellenlängen 665 nm und 652 nm und der Carotinoidgehalt über die optische Dichte bei den Wellenlängen 665 nm und 461 nm nach Karsten und Mitarbeitern berechnet (Karsten et al. 1996):

Der Carotinoidgehalt konnte mit Formel (41) berechnet werden:

$$\text{Carotinoidgehalt } [\mu\text{g/mL}] = [OD_{461} - (0,046 \cdot OD_{665})] \cdot 4 \quad (41)$$

Die Chlorophyll *a*-Gehälter ließen sich mit Formel (42) errechnen:

$$\text{Chlorophyll } a \text{ } [\mu\text{g/mL}] = 16,29 \cdot OD_{665} - 8,52 \cdot OD_{652} \quad (42)$$



A.3.7 Extraktion der EPS

Die Extraktion der EPS wurde nach einer modifizierten Methode von (Staats et al. 1999) durchgeführt. Es wurden zunächst 0,5 g Biofeuchtmasse in BG11-Medium gelöst, und abweichend zu den in dieser Methode beschriebenen Volumen an 5 M NaCl- und 0,5 M EDTA-Lösung (0,2 mL) wurden 6,67 mL jeder Lösung pro Gramm Biomasse verwendet. Mit dieser Menge an Lösungsmittel wird das Maximum an EPS von der Zelloberfläche gelöst, ohne diese dabei zu beschädigen. Nach 30 Minuten Extraktion wurde die Suspension bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Überstand in einen Membranschlauch (Membranfilter aus Celluloseacetat, 0,2 μm) für zwei Tage dialysiert und lyophilisiert. Daraufhin wurde die erhaltene EPS gewogen und auf die verwendete Trockenbiomasse bezogen.

A.3.8 Analytik der EPS

Die nach der zuvor beschriebenen Methode isolierte EPS wurde anhand der nachfolgenden photometrischen Methoden näher charakterisiert. Die verwendeten Lösungen sind in Kapitel D2 aufgelistet.

A.3.8.1 Bestimmung des Kohlenhydratgehalts nach Dubois

Die Bestimmung des Kohlenhydratgehalts wurde nach (Dubois et al. 1956) durchgeführt. Als Standards wurden 0,8 g L⁻¹ Dextran from *Leuconostoc* und 2,88 g L⁻¹ Sodium Alginate verwendet. Ausgehend von diesen Konzentrationen wurde bei jeder Bestimmung eine Standardreihe mitgemessen.

0,2 mL Probe bzw. 0,2 mL Deionat (Blindprobe) wurden zuerst mit 0,2 mL Lösung I und dann mit 1 mL Lösung II versetzt und für 15 Minuten bei 1000 rpm und 30 °C im Thermoschüttler inkubiert. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption im Photometer bei 480 nm (saure Polysaccharide wie bspw. Alginate) und bei 490 nm (neutrale Polysaccharide wie bspw. Dextran) bestimmt.

A.3.8.2 Bestimmung des Acetylgruppengehalts nach Hestrin

Die Bestimmung des Acetylgruppengehalts wurde nach (Hestrin 1949) durchgeführt. Zur Messung der Standardreihe wurde eine 5 mM Acetylchlorid Lösung angesetzt. Hierfür wurden 5 mM Acetylcholinchlorid in Natriumacetat-Pure (1 mM Natriumacetat, pH 4,5) gelöst.

0,1 mL Probe bzw. Deionat (Blindprobe) wurde mit 0,2 mL Lösung I versetzt. Nach kurzem Durchmischen bei Raumtemperatur wurden 0,1 mL Lösung II und 0,1 mL Lösung III

hinzugegeben. Daraufhin wurde die Absorption bei 540 nm im Photometer bestimmt. Es wurden jeweils drei Replikationen durchgeführt.

A.3.8.3 Kombinierte Protein- und Huminstoffanalyse nach Frølund

Zur Bestimmung des Gehaltes an Proteinen und Huminstoffen wurde eine kombinierte Protein- und Huminstoffanalyse nach (Frølund et al. 1996) durchgeführt. Zur Messung der Standardreihe, wurde BSA (Bovines Serumalbumin) in einer Konzentration von 0,012 g/50 mL für die Proteinbestimmung und Huminsäure (0,02 g/50 mL) für die Huminstoffbestimmung verwendet.

Proteinbestimmung

0,5 mL Probe bzw. Deionat wurden 0,1 mL Lösung VI und 0,7 mL des Arbeitsreagenz I hinzugegeben und für 20 Minuten bei 25 °C und 1000 rpm im Thermoschüttler geschüttelt. Daraufhin wurden 0,1 mL Lösung V hinzugefügt und für 10 Minuten bei 25 °C und 1000 rpm im Thermoschüttler geschüttelt. Nach weiteren 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 750 nm im Photometer bestimmt. Es wurden jeweils 3 Replikationen durchgeführt.

Huminstoffbestimmung

0,5 mL Probe bzw. Deionat wurden 0,7 mL des Arbeitsreagenz II hinzugegeben und für 20 Minuten bei 25 °C und 1000 rpm im Thermoschüttler geschüttelt. Daraufhin wurden 0,1 mL Lösung V hinzugefügt und für 10 Minuten bei 25 °C und 1000 rpm im Thermoschüttler geschüttelt. Nach weiteren 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 750 nm im Photometer bestimmt. Es wurden jeweils 3 Replikationen durchgeführt.

A.3.8.4 Rhamnolipidanalyse nach Chandrasekaran und BeMiller

Die Rhamnolipidanalyse wurde nach (Chandrasekaran&BeMiller 1980) durchgeführt. Zur Messung der Standardreihe wurde L-Rhamnose (0,25 g/50 mL) verwendet.

Zu 0,3 mL Probe bzw. Deionat wurden 0,6 mL Ethylacetat hinzugegeben und in einer Schwingmühle bei 30 Zyklen pro Minute für 10 Minuten ohne Kugeln geschüttelt und die ätherische Phase in ein neues 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Dieser Extraktionsschritt wurde wiederholt und anschließend für 15 Minuten bei 100 °C und 1000 rpm im Thermoschüttler geschüttelt. Daraufhin wurden 0,1 mL der Lösung II und der Lösung III, sowie 0,8 mL Lösung IV hinzugegeben und die Proben für 30 Minuten 80 °C und 1000 rpm im Thermoschüttler geschüttelt. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 421 nm im Photometer bestimmt.



A.3.8.5 Uronsäureanalyse nach Blumenkrantz und Asboe-Hanson

Die Uronsäureanalyse wurde nach (Blumenkrantz&Asboe-Hansen 1973) durchgeführt. Zur Messung der Standardreihe wurde D-Glucuronsäure (0,02 g/ 50 mL) verwendet.

0,2 mL Probe bzw. Deionat wurden 1,2 mL Lösung I hinzugegeben und für 10 Minuten im Eisbad inkubiert. Daraufhin wurden die Proben für 5 Minuten bei 100 °C und 1000 rpm im Thermoschüttler geschüttelt und anschließend 20 µl Lösung II hinzugefügt. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 520 nm im Photometer bestimmt. Es wurden jeweils drei Replikationen durchgeführt.

A.3.9 Bestimmung der EPS-Zusammensetzung

Die Zusammensetzung der EPS wurde anhand der oben genannten Methoden analysiert und die Ergebnisse sind nachfolgend in Tabelle 21 und Tabelle 22 detailliert aufgelistet. Isoliert wurde die EPS zuvor nach einer modifizierten Methode, basierend auf (Staats et al. 1999).

Tabelle 21: Zusammensetzung der isolierten EPS nach submerser Kultivierung. Isolation nach modifizierter Methode von (Staats et al. 1999) und Bestimmung der Bestandteile nach Anhang A3.

Gehalt [mg (g EPS) ⁻¹]	<i>Trichocoleus sociatus</i>	<i>Nostoc muscorum</i>
Acetylgruppen	165,49 ± 98,69	103,15 ± 21,97
Alginat	329,76 ± 168,78	379,26 ± 106,82
Dextran	58,52 ± 25,70	67,24 ± 17,37
Huminsäure	73,55 ± 9,19	86,07 ± 9,52
Proteine	3,50 ± 4,48	0,98 ± 0,85
Rhamnolipide	158,89 ± 159,91	436,50 ± 295,04
Uronsäure	11,30 ± 1,41	32,14 ± 13,18

Tabelle 22: Zusammensetzung der isolierten EPS nach emerser Kultivierung. Isolation nach modifizierter Methode von (Staats et al. 1999) und Bestimmung der Bestandteile nach Anhang A3.

Gehalt [mg (g EPS) ⁻¹]	<i>Trichocoleus sociatus</i>	<i>Nostoc muscorum</i>
Acetylgruppen	278,95 ± 201,06	80,84 ± 89,10
Alginat	851,23 ± 181,94	189,84 ± 37,96
Dextran	140,22 ± 36,74	32,15 ± 6,61
Huminsäure	88,13 ± 35,86	33,85 ± 17,75
Proteine	6,92 ± 5,84	8,34 ± 7,09
Rhamnolipide	482,94 ± 444,73	136,03 ± 130,45
Uronsäure	16,19 ± 4,35	15,11 ± 17,31

A.3.10 Versuchsplan und Ergebnisse nach DoE für das submerse Wachstum

V	Temp [°C]	pH [-]	CO ₂ [%-Vol.]	Licht [μE m ⁻² s ⁻¹]	Salzgehalt [%]	<i>N. muscorum</i> μ _{max} [h ⁻¹]
1	18	7	0,03	110	100	0,006
2	24	7	0,03	110	100	0,012
3	28	7	0,03	110	100	0,007
4	30	7	0,03	110	100	0,012
5	36	7	0,03	110	100	0,004
6	24	5	0,03	110	100	0,008
7	24	6	0,03	110	100	0,011
8	24	8	0,03	110	100	0,008
9	24	7	2	110	100	0,038
10	28	7	0,03	50	100	-
11	28	7	0,03	70	100	0,006
12	24	7	5	110	100	0,035
13	36	7	3	50	100	-
14	18	5	0,5	110	25	0,036
15	18	5	3	50	100	0,036
16	28	6	1	70	50	0,041
17	18	8	3	50	25	0,029
18	28	7	0,03	110	75	0,014
19	28	5	3	110	100	0,066
19	28	5	3	110	100	0,063
20	36	8	0,03	50	50	-
21	24	8	3	70	100	0,047
21	24	8	3	70	100	0,046
22	36	8	1	70	75	-
23	30	5	0,03	110	75	0,004
24	24	7	0,03	70	25	0,007
25	18	8	1	50	100	0,043
26	30	8	3	110	100	0,028



V	Temp [°C]	pH [-]	CO ₂ [%-Vol.]	Licht [μE m ⁻² s ⁻¹]	Salzgehalt [%]	<i>N. muscorum</i> μmax [h ⁻¹]
27	24	5	0,5	50	50	0,036
28	28	8	0,5	110	25	0,047
29	24	6	0,03	50	75	0,007
30	30	6	0,5	50	25	0,039
31	36	5	0,03	70	100	-
32	30	7	1	110	50	0,051
33	36	6	3	110	25	-

A.3.11 Versuchsplan und Ergebnisse nach DoE für das emerse Wachstum

Nr.	Temp. [°C]	pH [-]	Licht [$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	Salzgehalt [%]	<i>T. sociatus</i> μ_{max} [h ⁻¹]	<i>N. muscorum</i> μ_{max} [h ⁻¹]
6	18	8	90	75	0,021	0,007
6	18	8	90	75	0,034	0,016
7	28	7	90	50	0,020	0,021
7	28	7	90	50	0,016	0,012
8	18	7	50	100	0,005	0,010
8	18	7	50	100	0,003	0,008
9	18	8	110	25	-	0,005
9	18	8	110	25	-	0,003
10	36	9	110	25	0,001	-
10	36	9	110	25	0,002	0,0003
11	36	9	70	100	0,002	0,026
11	36	9	70	100	0,003	0,023
12	36	7	50	75	-	0,021
12	36	7	50	75	-	0,021
13	24	8	110	100	0,008	0,032
13	24	8	110	100	-	0,022
14	24	6	90	25	-	-
14	24	6	90	25	-	-
15	24	9	50	25	-	-
15	24	9	50	25	-	0,005
16	36	6	70	25	0,014	0,007
16	36	6	70	25	0,018	0,008
17	36	5	50	100	-	-
17	36	5	50	100	-	0,006
18	18	5	110	100	-	0,011
18	18	5	110	100	-	0,013
19	36	6	110	50	0,022	-
19	36	6	110	50	0,024	-



Nr.	Temp. [°C]	pH [-]	Licht [$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	Salzgehalt [%]	<i>T. sociatus</i> μ_{max} [h ⁻¹]	<i>N. muscorum</i> μ_{max} [h ⁻¹]
20	28	8	70	75	0,022	-
20	28	8	70	75	0,021	-
21	18	5	50	50	0,003	-
21	18	5	50	50	0,005	-
22	36	5	110	25	-	-
22	36	5	110	25	-	-
23	28	9	50	100	0,024	0,036
23	28	9	50	100	0,023	0,024
24	18	9	110	100	-	0,016
24	18	9	110	100	-	0,009

A.3.12 Versuchsplan und Ergebnisse nach DoE für EPS-Bildung

Nr.	Temp. [°C]	pH [-]	CO ₂ [%-Vol.]	Licht [$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	Salzgehalt [%]	EPS [g·gTM ⁻¹]	EPS [g·h ⁻¹]
3	28	7	0,03	110	100	0,053	0,0003
4	30	7	0,03	110	100	0	0
9	24	7	2	110	100	0,333	0,0019
10	28	7	0,03	50	100	0,069	0,0004
11	28	7	0,03	70	100	0,129	0,0007
12	24	7	5	110	100	0,523	0,0031
13	36	7	3	50	100	0	0
14	18	5	0,5	110	25	0,075	0,0004
15	18	5	3	50	100	0,097	0,0005
16	28	6	1	70	50	0,366	0,0021
17	18	8	3	50	25	0,507	0,0030
18	28	7	0,03	110	75	0,186	0,0011
19	28	5	3	110	100	0,267	0,0015
20	36	8	0,03	50	50	0	0
21	24	8	3	70	100	0,137	0,0008
22	36	8	1	70	75	0	0
23	30	5	0,03	110	75	0,069	0,0004
24	24	7	0,03	70	25	0,298	0,0017
25	18	8	1	50	100	0,233	0,0013
26	30	8	3	110	100	0,058	0,0003
27	24	5	0,5	50	50	0,213	0,0012
28	28	8	0,5	110	25	0,152	0,0009
29	24	6	0,03	50	75	0,104	0,0006
30	30	6	0,5	50	25	0,108	0,0006
31	36	5	0,03	70	100	0	0
32	30	7	1	110	50	0,250	0,0014
33	36	6	3	110	25	0	0



A.3.13 Fluoreszenz-Analytik

Das Wachstum von phototrophen Organismen kann unter bestimmten Voraussetzungen durch die Verwendung einer Imaging-PAM quantifiziert werden. Grundlage dafür ist, dass die Organismen so wenig wie möglich dreidimensional und so viel wie möglich zweidimensional auf einer Oberfläche wachsen. Sobald das Wachstum zu stark dreidimensional erfolgt, wird der bauteilbedingte Fehler der Messung zu groß, und eine aussagekräftige Bestimmung des Wachstums ist nicht länger möglich. Die Funktionsweise einer Imaging-PAM ist nachfolgend dargestellt.

Funktionsweise der Imaging Pam

Eine Imaging Pam erzeugt zunächst einen Lichtsättigungspuls mit rotem Licht. Dadurch werden die Chlorophyllmoleküle angeregt und die Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben. Fallen diese Elektronen in den Grundzustand zurück, so kann die Energiedifferenz entweder in Form von Wärme oder Strahlung an die Umgebung abgegeben werden. Normalerweise wird diese Energie aber bei phototrophen Organismen für photochemische Prozesse genutzt. Demnach ist die messbare Strahlung dann maximal, wenn die Energie, die für photochemische Prozesse genutzt wird, minimal ist. Um dies zu erreichen, muss das Reaktionszentrum des Photosystems II inaktiv, also die Elektronenakzeptoren bereits reduziert sein. Diese Reduzierung wird durch den eingangs erwähnten Lichtsättigungspuls erreicht. Mit dem Programm Imaging-Win kann die emittierte Strahlung über eine CCD-Kamera aufgezeichnet und in eine Fläche umgerechnet werden. Da die messbare Strahlung proportional zu der vorhandenen Chlorophyllkonzentration ist, welche wiederum proportional zu der Zellzahl der Organismen ist, kann über eine Zunahme der Fläche der Zuwachs der phototrophen Organismen bestimmt werden. Die Imaging-PAM bildet somit eine einfache, nichtinvasive Methode zur Bestimmung des emersen Wachstums auf Agarplatten.

A.3.14 Script für Berkley-Madonna

Das Skript zur Überprüfung des Wachstumsmodells von Cyanobakterien in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert (Kapitel 3.6.1) ist nachfolgend dargestellt. Die mathematische Beschreibung des Wachstums wurde in Berkley Madonna (Betaversion) durchgeführt und am Beispiel von *Trichocoleus sociatus* im Folgenden erläutert.

RK	4	definiert die Numerische Integrationsmethode
Starttime	0	Startzeit
Stoptime	150	Länge der Simulation
DT	0,2	Zeitschritte
Konstanten:		
UM	0,023	μ_{max} [h ⁻¹]
X0	0,08	Initial BTM [g L ⁻¹]
pHmin	3	Unterer pH-Wert
pHmax	12	Oberer pH-Wert
pH	8	Initial pH
KS	0,7	Sättigungskonstante [g L ⁻¹]
YXS	0,7	BTM pro Gramm Substrat [gTM gS ⁻¹]
Temp	24	Initial Temperatur [°C]
Tempop	24	Optimale Temperatur [°C]
A	8,19	Peakbreite

Anfangsbedingungen:

INIT X	= X0	Initial BTM [g L ⁻¹]
INIT S	= 2	Initial Substrat [g L ⁻¹]

Massenbilanz:

d/dt(x) = RX Änderung der BTM pro Zeit

d/dt(s) = RS Änderung des Substrats

Kinetiken: pro Zeit

RX = U*X Wachstumsrate

RS = -RX/Y Substratverbrauch

U = $UM * (S / (KS + S)) * EXP(-1 * ((Temp - Tempop) / 10) ^ 2) * (1 - (pHmin / pH)) * (1 - (pH / pHmax))$



limit $x \geq 0$

limit $S \geq 0$

Das Skript zur Berechnung des erweiterten Wachstumsmodells von Cyanobakterien in Abhängigkeit von Temperatur, CO₂, Mineralsalzgehalt, Licht und pH-Wert (Kapitel 3.6.3) ist nachfolgend dargestellt. Die mathematische Beschreibung des Wachstums wurde in Berkeley Madonna (Betaversion) durchgeführt und am Beispiel von *Nostoc muscorum* im Folgenden erläutert.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=200

DT = 0,02

(BATPERM)

(Batch growth with product formation)

(Constants)

UM=0,066

K1=0,0

K2=0,0

X0 = 2,0 ;Initial biomass inoculum, kg/m³

Y = 0,02

KS = 0,7

pHop= 6,5 ;Initial pH

pH0 = 5

Temp = 28 ;Temperatur

Tempop = 24,5

CO2 = 3

CO₂op=3

Licht = 110

Lichtop=110

Salzgehalt = 100

Salzgehaltop=100

(Initial Conditions)

INIT X = X0

INIT pH = pH0

INIT S = 3000

(Mass Balances)

d/dt(x) = RX ;BIOMASS BALANCE

d/dt(pH) = RP ;PH BALANCE

d/dt(s) = RS

Z1 = IF CO₂=3 THEN 2 ELSE 0

M1=Z1

Z2 = IF CO₂=1 THEN 1 ELSE 0

M2=M1+Z2

MA = 0,48

MB = 0,7

MC = 0,71

MD = 0

A = IF M2=2 THEN MA ELSE IF M2 = 1 THEN MB ELSE IF M2 = 0 THEN MC ELSE

MD

(Kinetics)

RX = A*U*X ;BIOMASS RATE



$$RS = -RX/Y$$

$$U = (0,026263 + 0,01273 * ((Licht-80)/30) - 0,03207 * ((CO_2-2,515)/2,485) + 0,020145 * ((Salzgehalt-62,5)/37,5) - 0,00594 * ((pH_0-6,5)/1,5) - 0,00545 * ((Temp-27)/9) + 0,010509 * ((Licht-80)/30) * ((CO_2-2,515)/2,485) + 0,005692 * ((Licht-80)/30) * ((Temp-27)/9) + 0,033091 * ((CO_2-2,515)/2,485) * ((Salzgehalt-62,5)/37,5) - 0,00271 * ((CO_2-2,515)/2,485) * ((pH_0-6,5)/1,5) + 0,004181 * ((Salzgehalt-62,5)/37,5) * ((pH_0-6,5)/1,5) - 0,00322 * ((Salzgehalt-62,5)/37,5) * ((Temp-27)/9) - 0,00385 * ((pH_0-6,5)/1,5) * ((Temp-27)/9) - 0,03893 * ((CO_2-2,515)/2,485)^2 - 0,0063 * ((Temp-27)/9)^2 * (S/(KS + S)))$$

$$pHe = (pHop - pH)$$

$$RP = RX * K1 + X * K2 * pHe$$

$$\text{limit } x \geq 0$$

$$\text{limit } pH \geq 0$$

$$\text{limit } S \geq 0$$

B Verwendete Geräte

Abgasanalytik:

BCpreFerm + Software FermVis, BleuSens gas sensor GmbH, Deutschland

Aerosolerzeuger:

Pariboy SX, Pari GmbH, Starnberg

Autoklaven:

Systemec V1550, Systemec GmbH, Labor-Systemtechnik, Deutschland

ECO 2000; Caso[®] Germany, Deutschland

Chromatographie:

Bestimmung der Triterpenkonzentrationen:

Alliance[®] Waters 2695 Separations Module, Waters Corporation, Deutschland

Alliance[®] Waters 2996 Photodiode Array Detector, Waters Corporation, Deutschland

Säule: RP C 18, Waters Corporation, Deutschland

Bestimmung der Zuckerkonzentrationen:

AS-2000A Autosampler, Merck KGaA, Deutschland

L-6200 Intelligent Pump, Merck KGaA, Deutschland

Spark, Sum Chrom RI Detektor, Midas

Einwegreaktor:

BIOSTAT[®] CultiBag RM Culturing Convenience, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland

Gefriertrocknungsanlage:

Christ LOC-1m, ALPHA 2-4; Martin Christ GmbH, Deutschland

Drehschieber-Vakuumpumpe; Vakuumband GmbH + Co, Deutschland

**Inkubations-Schüttelschränke:**

Sartorius AG Stedim Biotech, CERTOMAT® BS-T - Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland

Ecotron, INFORS HT, Infors AG, Schweiz

Multitron 2 mit Haftfolien-Tablar, Typ ATM 00, 850 x 470 mm; Infors AG, Schweiz

Kugelmühle

Schwingmühle MM 200, Retsch, Deutschland

LEDs:

Edipower II EPSW-VF55, 25 W, kalt-weiß, Edison Opto, Taipei City, Taiwan

Magnetrührer:

MR Hei-Mix L, Heidolph-Instruments, Deutschland

Mikroskop:

Motic B1 Series, System Microscopes; Motic Deutschland GmbH, Deutschland

pH-Meter:

pH-Einstabmesskette, pH211 Microprocessor, Hanna Instruments, Deutschland

Quantumsensor:

Li-190A, Li-Cor Biosciences GmbH, Deutschland

Reinstwasseranlage:

Elix 5, Merck Millipore, USA

Rotationsverdampfer und Vakuumpumpe:

Heidolph, LABOROTA 4003 control – Heidolph & Co.KG, Deutschland

Heidolph, ROTAVAG vario control - Heidolph & Co.KG, Deutschland

Rührkessel:

Bioengineering AG, Schweiz

Pumpe: WATSON MARLOW, Bioengineering AG, Schweiz

Schlauchpumpe:

IPC 8, Ismatec, Schweiz

Sterilbank:

HERAsafe® KS 12, Fisher Scientific GmbH, Deutschland

Thermoinkubationsschrank:

Brutschrank IPS750, Memmert, Deutschland

Waage:

Analysewaage ABS, Kern Deutschland

Waage Scout™- Pro, Ohaus, Schweiz

Zentrifuge:

HERMLE Z383K – HERMLE Labortechnik, Deutschland



C Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	Duchefa Biochemie	D0911.0100
Agar für die Bakteriologie	AppliChem GmbH	VWR APPCA0949.1000
Agarose	Duchefa Biochemie	P1001
Ameisensäure 98-100 %	Merck KGaA	100264
Ammoniumeisencitrat	Sigma-Aldrich Co. LLC	VWR SIALF5879-500G
Calciumcarbonat RECTAPUR	VWR International	22296.294
Calciumchlorid	AppliChem GmbH	A1873.1000
Citronensäure	AppliChem GmbH	Chemikalienausgabe TU KL
Cobalt(II)chlorid Hexahydrat	VWR International	22892.261
L-Cystein	Merck KGaA	VWR 1.02838.0100
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Co. LLC	17835-250G
Eisen(III)chlorid Hexahydrat	VWR International	24208.237
Ethanol, $\geq 99,8\%$ p.a.	Carl Roth GmbH	Chemikalienausgabe TU KL
Ethylacetat	Merck KGaA	VWR 1.09623.1000
D-Fructose	AppliChem GmbH	A3688
D-Glucose, wasserfrei	Sigma-Aldrich Co. LLC	G0350500-1EA
Glycerin, reinst. wasserfrei	Bernd Kraft GmbH	Chemikalienausgabe TU KL
Hefeextrakt	AppliChem GmbH	VWR A3732.0500
Hydroxybiphenyl	Sigma-Aldrich Co. LLC	VWR SAFA371297-5G
Hydroxylamin	Merck KGaA	VWR 8.14441.0500
Isopropanol, technisch	AppliChem GmbH	Chemikalienausgabe TU KL
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA	VWR 1.04873.1000
Kinetin	Duchefa Biochemie	K0905.0005
Kupfer(II)sulfat	AppliChem GmbH	VWR A3880.0500
LS-Medium incl. Vitamine	Duchefa Biochemie	L0230.0050
Magnesiumchlorid Hexahydrat	VWR International	25107.292
Magnesiumsulfat Heptahydrat	VWR International	25167.298
Malzextrakt für Mikrobiologie	VWR International	84618.0500
MES-Puffer	AppliChem GmbH	A0689
Methanol, HPLC Grade	Mallinckrodt Baker B.V.	Chemikalienausgabe TU KL
Natriumcarbonat	Merck KGaA	VWR 1.06395.0050



Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
Natriumchlorid	VWR International	27808.297
Natriumdodecylsulfat	Merck KGaA	VWR 8.22050.1000
Natriumhydroxid	Merck KGaA	1.06498.1000
Natriumnitrat	Merck KGaA	VWR 1.06537.1000
Natriumsulfat	VWR International	28104.292
Natriumtartrat	AppliChem GmbH	VWR APPCA2662.1000
Natriumtetraborat	Merck KGaA	VWR 1.06308.1000
Oleanolsäure, $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich Co. LLC	05504-500MG
Oleanolsäuremethylester	LGC-Standards	CDX-00015300-010
Orcinol	Sigma-Aldrich Co. LLC	VWR SIALO1875-10G
Pectinase EC 3.2.1.15	Sigma-Aldrich Co. LLC	VWR SAFS17389-10G
Pepton aus Soja	Merck KGaA	1.07212.0500
Phenol	VWR International	20596.297
Plant agar	Duchefa Biochemie	P1001.5000
Salzsäure 37%	Merck KGaA	Chemikalienausgabe TU KL
Schwefelsäure 95-97 %	Merck KGaA	Chemikalienausgabe TU KL
Sucrose, $\geq 99,7\%$	Duchefa Biochemie	S0809.5000
Trypton	Merck KGaA	VWR 84610.0500
Ursolsäure, $\geq 98,5\%$	Sigma-Aldrich Co. LLC	89797-25MG-F
Ursolsäuremethylester	LGC-Standards	CDX-00021650-025

D Verwendete Medien und Lösungen

D.1 Medien und Lösungen der Pflanzenzellkultivierung

D.1.1 LS-Medium

Die Zusammensetzung des zur Kultivierung der Pflanzenzellen verwendeten LS-Mediums ist in Tabelle 23 dargestellt. Der pH-Wert wurde mit Natronlauge eingestellt und beträgt 5,7 ($\pm 0,01$).

Tabelle 23: Zusammensetzung LS-Mediums; Alle Bestandteile wurden in desionisiertem Wasser gelöst.

Bestandteil	Menge [g L ⁻¹]
Sucrose	30
Linsmaier & Skoog Medium inklusive Vitamine	4,4
MES (Puffer)	1
2,4-Dichlorphenoxy- Essigsäure	$5 \cdot 10^{-4}$
6-(Furfuryl-amino)purin (Kinetin)	$5 \cdot 10^{-4}$
Agarose	5,5

D.1.2 HPLC-Eluent

Die Zusammensetzung des für die Analytik der Triterpene genutzten HPLC-Eluenten ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Zusammensetzung des HPLC-Eluenten

Bestandteil	Menge [mL]
0,1 % Ameisensäure (98-100 %) in Reinstwasser	20
Methanol HPLC Grade	980

D.1.3 Ursol- und Oleanolsäurestandards

Die Konzentrationen der verwendeten Ursol- und Oleanolsäurestandards sind in Tabelle 25 dargestellt. Beide wurden aus Stammlösungen mit Konzentrationen von $1,8909 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ursol- und $1,9303 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Oleanolsäure hergestellt.



Tabelle 25: Zusammensetzung der Ursol- und Oleanolsäurestandards

Bestandteil	Menge [g L ⁻¹]
Ursolsäure (analytical standard; Fluka)	1,135 0,567 0,113
Oleanolsäure (analytical standard; Fluka)	0,386 0,193 0,039
Methanol HPLC Grade	als Lösungs-mittel

D.1.4 Standards der Zuckanalytik

Die Konzentrationen der für die Zuckanalytik verwendeten Standards ist in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Konzentration der verwendeten Standards für die Zuckanalytik

Bestandteil	Menge [g·L ⁻¹]
D-(+)-Glucose (≥99,5 %)	10
	5
	4
	3
	2
	1
D(-)-Fructose BioChemica	10
	5
	4
	3
	2
	1
Sucrose	10
	5
	4
	3
	2
	1

D.2 Medien und Lösungen der Cyanobakterienkultivierung

Nachfolgend wird die Zusammensetzung des zur Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Cyanobakterien genutzten Mediums sowie Lösungen der EPS-Analytik aufgelistet.

D.2.1 BG 11 Medium

Die Zusammensetzung des Vollmediums BG 11 zur Kultivierung der terrestrischen Cyanobakterien ist in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: Zusammensetzung des zur Kultivierung der Cyanobakterien verwendeten Vollmediums nach (Rippka et al. 1979)

Chemikalie	Stammlösung	Menge pro Liter
NaNO ₃	15 g · 100 mL ⁻¹	10 mL
K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	0,4 g · 100 mL ⁻¹	10 mL
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,75 g · 100 mL ⁻¹	10 mL
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,37 g · 100 mL ⁻¹	10 mL
Zitronensäure, EDTA	0,01 g · 100 mL ⁻¹ , 0,06 g · 100 mL ⁻¹	10 mL
Fe-Ammoniumcitrat	0,6 g · 100 mL ⁻¹	1 mL
Na ₂ CO ₃	0,2 g · 100 mL ⁻¹	10 mL
Metallmix		1 mL

D.2.2 Lösungen der EPS-Analytik

Nachfolgend dargestellt sind die für die einzelnen analytischen EPS-Untersuchungen verwendeten Lösungen, sortiert nach der jeweiligen Methode.

Bestimmung des Kohlenhydratgehalts nach (Dubois et al. 1956)

Lösung I

5%-Phenol-Lösung (w/v)

Lösung II

konzentrierte Schwefelsäure

**Bestimmung des Acetylgruppengehalts nach (Hestrin 1949)***Lösung I*

1 Volumen 2 M Hydroxylamin in Deionat gelöst wurde mit 1 Volumen 3,5 M NaOH gemischt.

Lösung II

12,5% (v/v) HCl wurden in Deionat gelöst.

Lösung III

0,37 M $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ wurden in 0,1 M HCl gelöst.

Kombinierte Protein- und Huminstoffanalyse nach (Frølund et al. 1996)*Lösung I*

0,143 M NaOH und 0,270 M Na_2CO_3 in Deionat

Lösung II

0,057 M Kupfersulfat-Pentahydrat in Deionat

Lösung III

0,124 M di-Natriumtartrat-dihydrat in Deionat

Lösung IV

Deionat

Lösung V

Zur Herstellung des Phenolreagenz wurden 5 mL Ciocalteus Folin mit 6 mL Deionat versetzt.

Lösung VI

6 % (w/v) SDS-Lösung

Arbeitsreagenz I Proteinbestimmung

Das Arbeitsreagenz zur Proteinbestimmung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt. Hierfür wurden Lösung 1, 2 und 3 im Verhältnis 100:1:1 gemischt.

Arbeitsreagenz II Huminstoffbestimmung

Das Arbeitsreagenz zur Huminstoffbestimmung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt. Hierfür wurden Lösung 1, 3 und 4 im Verhältnis 100:1:1 gemischt.

Rhamnolipidanalyse nach (Chandrasekaran&BeMiller 1980)

Lösung I

Ethylacetat

Lösung II

Deionat

Lösung III

1,6 % (w/v) Orcinol-Lösung in Deionat

Lösung IV

60 % (v/v) Schwefelsure-Lösung

Uronsäureanalyse nach (Blumenkrantz&Asboe-Hansen 1973)

Lösung I

0,0125 M Natriumtetraborat-Decahydrat in konz. Schwefelsure (96 %)

Lösung II

0,15 % (w/v) Hydroxybiphenyl in 0,5 % (w/v) NaOH in Deionat



E Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die Lichtreaktion. Dargestellt ist der nichtzyklische Elektronentransport modifiziert nach (Purves et al. 2011).	7
Abbildung 2:	Der Calvin-Zyklus. Dargestellt ist der vereinfachte Ablauf der Dunkelreaktion. 1 = Kohlenstofffixierung durch RuBP, Reduktion und Zuckersynthese; 2 = Regenerierung von RuBP modifiziert nach (Purves et al. 2011).	8
Abbildung 3:	Exemplarische Darstellung der Photosynthese- bzw. Sauerstoffbildungsrate in Abhängigkeit der Bestrahlung. 1 = Lichtlimitierung (max. Quantenausbeute); 2 = Lichtsättigung (max. Photosyntheserate); 3 = Photoinhibierung modifiziert nach (Walter 1999).	9
Abbildung 4:	Klassifizierung von Elicitoren nach (IJDDHR 2011).	12
Abbildung 5:	Schematische Darstellung eines Wavebagreaktor-Systems	15
Abbildung 6:	Stukturformeln von Ursolsäure (links) und Oleanolsäure (rechts).....	16
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der durchgeführten genetischen Modifizierung	18
Abbildung 8:	In Salbei identifizierte Basensequenz zur Expression des Enzyms AGPase.....	18
Abbildung 9:	Experimentell bestimmte Aufnahme von C ¹⁴ markierter Saccharose in genetisch modifizierten <i>Salvei officinalis</i> Stamm.	19
Abbildung 10:	Vergleich der Wachstumsraten von <i>Salvia officinalis</i> Suc 1 und Suc 4 bei verschiedenen Lichtstärken. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.	21
Abbildung 11:	Vergleich der produzierten Biomasse von <i>Salvia officinalis</i> Suc 1 und Suc 4 bei verschiedenen Lichtstärken. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.	22
Abbildung 12:	Vergleich der produzierten Triterpenkonzentration von <i>Salvia officinalis</i> Suc 1 und Suc 4 bei verschiedenen Lichtstärken. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.	23
Abbildung 13:	Vergleich der Produktivitäten von <i>Salvia officinalis</i> Suc 1 und Suc 4 bei verschiedenen Lichtstärken. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.	23
Abbildung 14:	Zuckeranalytik der photo-mixotrophen Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i> . Dargestellt ist der Verlauf der Konzentration von Saccharose, Glucose und Fructose während der Kultivierung von Suc 1 und Suc 4 bei Lichtstärken von 50	



- bis $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Experimente wurden bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$, 120 rpm , unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt. 25
- Abbildung 15: Übersicht der Kultivierung von *Salvia officinalis* im Wavebagreaktor. Bestimmt wurde in einer Kulturzeit von 21 Tagen die Wachstumsrate (rot), die gebildete Biomasse (grün), die Konzentration der gebildeten Triterpene Oleanolsäure (magenta) und Ursolsäure (gelb), sowie deren Produktivitäten (Oleanolsäure lila, Ursolsäure oliv). Die Experimente wurden bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$, einer Kippfrequenz von 20 min^{-1} , einem Winkel von 7° , einer Lichtstärke von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 18 Tagen, in 2 L Wavebags mit einem Füllvolumen von 1 L durchgeführt. 29
- Abbildung 16: Zuckanalytik der Versuche im Wavebagreaktor. A = Verlauf der Zuckerkonzentrationen von Saccharose, Glucose und Fructose bei Suc 1. B = Verlauf der Zuckerkonzentrationen von Saccharose, Glucose und Fructose bei Suc 4. Die Experimente wurden bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$, einer Kippfrequenz von 20 min^{-1} , einem Winkel von 7° , einer Lichtstärke von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 18 Tagen, in 2 L Wavebags mit einem Füllvolumen von 1 L durchgeführt. 30
- Abbildung 17: Übersicht der Wachstumsraten von *Salvia officinalis* auf Agarplatten bei drei verschiedenen Lichtstärken. Die Experimente wurden bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$, unter Verwendung von LS-Medium mit Agar über einen Zeitraum von 21 Tagen, in Petrischalen mit einem Füllvolumen von 10 mL durchgeführt. 32
- Abbildung 18: Übersicht der gebildeten Biomasse von *Salvia officinalis* auf Agarplatten bei drei verschiedenen Lichtstärken. Die Experimente wurden bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$, unter Verwendung von LS-Medium mit Agar über einen Zeitraum von 21 Tagen, in Petrischalen mit einem Füllvolumen von 10 mL durchgeführt. 33
- Abbildung 19: Vergleich der Wachstumsraten in photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von *Salvia officinalis* im Schüttelkolben. Die Experimente wurden bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$, 120 rpm , unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt. 35
- Abbildung 20: Vergleich der Wachstumsraten in photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von *Salvia officinalis* im Wavebagreaktor. Die Experimente wurden bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$, einer Kippfrequenz von 20 min^{-1} , einem Winkel von 7° , einer Lichtstärke von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 18 Tagen, in 2 L Wavebags mit einem Füllvolumen von 1 L durchgeführt. 35

Abbildung 21:	Vergleich der erhaltenen Biomasse aus photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i> im Schüttelkolben. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.....	36
Abbildung 22:	Vergleich der erhaltenen Biomasse aus photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i> im Wavebagreaktor. Die Experimente wurden bei 28 °C, einer Kippfrequenz von 20 min ⁻¹ , einem Winkel von 7°, einer Lichtstärke von 50 µE m ⁻² s ⁻¹ unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 18 Tagen, in 2 L Wavebags mit einem Füllvolumen von 1 L durchgeführt.....	37
Abbildung 23:	Vergleich der Triterpenkonzentration nach photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i> im Schüttelkolben. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.....	37
Abbildung 24:	Vergleich der Triterpenkonzentration nach photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i> im Wavebagreaktor. Die Experimente wurden bei 28 °C, einer Kippfrequenz von 20 min ⁻¹ , einem Winkel von 7°, einer Lichtstärke von 50 µE m ⁻² s ⁻¹ unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 18 Tagen, in 2 L Wavebags mit einem Füllvolumen von 1 L durchgeführt.....	38
Abbildung 25:	Vergleich der Produktivität der Triterpenproduktion in photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i> im Schüttelkolben. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.	39
Abbildung 26:	Vergleich der Produktivität der Triterpenproduktion in photo-mixotropher und heterotropher Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i> im Wavebagreaktor. Die Experimente wurden bei 28 °C, einer Kippfrequenz von 20 min ⁻¹ , einem Winkel von 7°, einer Lichtstärke von 50 µE m ⁻² s ⁻¹ unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 18 Tagen, in 2 L Wavebags mit einem Füllvolumen von 1 L durchgeführt.	40
Abbildung 27:	Vergleich der gebildeten Biomasse von <i>Salvia officinalis</i> mit und ohne Beleuchtung während der Kultivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen von Pektinase in der Kultursuspension. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.....	43



Abbildung 28:	Vergleich der Triterpenkonzentration von <i>Salvia officinalis</i> mit und ohne Beleuchtung während der Kultivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen von Pektinase in der Kultursuspension. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.....	43
Abbildung 29:	Vergleich der Produktivität der Triterpenproduktion von <i>Salvia officinalis</i> mit und ohne Beleuchtung während der Kultivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen von Pektinase in der Kultursuspension. Die Experimente wurden bei 28 °C, 120 rpm, unter Verwendung von LS-Medium über einen Zeitraum von 21 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 45 mL durchgeführt.....	44
Abbildung 30:	Foto von Open Ponds zur Produktion von <i>Spirulina platensis</i> in Asien (Sieg 2011).	51
Abbildung 31:	Schema eines Raceway ponds modifiziert nach (CCRES 2015)	52
Abbildung 32:	Schematischer Aufbau eines Glasrohrmoduls mit Vor- und Rücklauf modifiziert nach (Broneske et al. 2002)).	53
Abbildung 33:	Schematischer Aufbau des Hanging-Gardens-Reaktorsystems und des FPAREaktors. A = Reaktortyp Hanging-Gardens B = Funktionsprinzip des FPA-Reaktors modifiziert nach (Eriksen&Umana 2004, Brucker et al. 2005, Trösch 2005).	53
Abbildung 34:	Schematischer Aufbau der Folien-Reaktoren zur Produktion von Mikroalgen unter Nutzung von Kraftwerksrauchgasen zur CO ₂ -Bindung (modifiziert nach (Cordes 2013)).	55
Abbildung 35:	Darstellung einer bakteriellen Wachstumskurve. Aufgetragen ist der Logarithmus der Zellzahl der Zeit. Die Phasen I bis VI beschreiben dabei das bakterielle Wachstum: I = lag Phase, II = Übergangsphase, III = exponentielles Wachstum, IV = verzögertes Wachstum, V = stationäre Phase und VI = Absterbephase. Die gestrichelte Linie illustriert die Kapazitätsgrenze. Abbildung modifiziert nach (Cypionka 2010).	61
Abbildung 36:	Absorptionsspektren von Photopigmenten. A = Absorptionsspektren der verschiedenen Photopigmente Chlorophyll a, Chlorophyll b, Phycoerythrin, Phycocyanin und beta-Carotene. B = Schematisch dargestellter Lichtsammelkomplex. PE = Phycoerythrin; PC = Phycocyanin; APC = Allophycocyanin; Chl = Chlorophyll a; PS = Photosystem. Die Lichtenergie wird nach dem Trichter-Prinzip an das Reaktionszentrum weitergeleitet modifiziert nach (Kupper et al. 2009).	64
Abbildung 37:	Vereinfachtes Termschema für Chlorophyll. Das Pigment kann, entsprechend seinem Extinktionsspektrum, durch Quanten aus dem roten und dem violetten	

	Spektralbereich vom Grundzustand (S_0) in distinkte elektronische Anregungszustände überführt werden, die man 1. und 2. Singulett (S_1 bzw. S_2) nennt. S_1 und S_2 unterscheiden sich stark in ihrer Lebensdauer. Der Übergang $S_2 \rightarrow S_1$ ist so von so kurzer Dauer, dass die Energiedifferenz ausschließlich in Wärme umgewandelt werden kann. Der Übergang $S_1 \rightarrow S_0$ ist ausreichend langsam, um auch andere Energieumwandlungen zu gestatten: Emission eines Lichtquants = Fluoreszenz; Emission eines energiereichen Elektrons = photochemische Redoxreaktion, ΔE ; strahlungsloser Energietransfer zum Nachbarmolekül. Der Übergang zum angeregten Triplett ($S_1 \rightarrow T_1$) ist mit einer Umkehrung des Elektronenspins verbunden und kann nur langsam rückgängig gemacht werden. Der Übergang $T_1 \rightarrow S_0$ liefert eine relativ lang anhaltende Lichtemission (= Phosphoreszenz, $\lambda_{\text{max.}} \approx 750 \text{ nm}$) (Schopfer&Brennicke 2010).	65
Abbildung 38:	CO_2 -Aufnahme eines Cyanobakteriums inkl. CCM in der Zelle modifiziert nach (Badger&Price 2003).	66
Abbildung 39:	Löslichkeit von Mineralstoffen entlang von pH-Gradienten modifiziert nach (Munk 2011).	67
Abbildung 40:	Verhältnisse von CO_2 in Wasser in Abhängigkeit des pH-Werts. IC = Inorganic Carbon modifiziert nach (Walter 1999).	68
Abbildung 41:	Die Hauptgruppen der EPS. Dargestellt ist eine bakterielle Zelle mit den drei Hauptgruppen der EPS. RPS = Released polysaccharid, CPS = Capsulare polysaccharid und Scheide. MS = Mureinschicht, PM = Plasmamembran. Abbildung modifiziert nach (Sutherland 1988).	72
Abbildung 42:	Aufbau für die Luftversorgung der Blasensäule. Die angesaugte Umgebungsluft wird mit Wasser gesättigt, um einen Verlust von Flüssigkeit in der Blasensäule zu vermindern. Um ein Verstopfen der Ventile und Sterilfilter zu verhindern, strömt die Luft durch eine Tropfenfalle. Die Durchflussmenge wird am Einstellventil manuell reguliert. Vor dem Eintritt in die Blasensäule wird die Luft durch einen Sterilfilter geleitet, um eine Kontamination der Mikroorganismen zu verhindern. Auch am Austritt befindet sich ein Filter. Ein temperiertes Wasserbad sorgt für die richtige Temperatur in der Blasensäule.	77
Abbildung 43:	Schema der verwendeten Reaktoren. A = Schüttelkolben B = Blasensäule C = Rührreaktor. Wichtige Parameter zur Charakterisierung der Reaktoren sind in Tabelle 4 dargestellt.	78
Abbildung 44:	Vergleich von One-factor-at-a-time mit statistischer Versuchsplanung (DoE) nach (Kleppmann 2008).	79



Abbildung 45:	Vollständiger faktorieller Versuchsplan umfasst alle Ecken des Würfels, fraktioneller faktorieller Versuchsplan nur die markierten Eckpunkte. Abbildung nach (Kleppmann 2008).....	80
Abbildung 46:	Mikroskopische Aufnahmen der zwei verwendeten terrestrischen Cyanobakterien. A <i>Nostoc muscorum</i> ; B <i>Trichocoleus (Microcoleus) sociatus</i>	84
Abbildung 47:	Vergleich der Wachstumsraten von <i>T. sociatus</i> bei verschiedenen Leistungseinträgen. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in verschiedenen Bioreaktorsystemen durchgeführt.	87
Abbildung 48:	Vergleich der Wachstumsraten von <i>N. muscorum</i> bei verschiedenen Leistungseinträgen. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in verschiedenen Bioreaktorsystemen durchgeführt.	87
Abbildung 49:	Vergleich der Wachstumsraten von <i>T. sociatus</i> bei verschiedenen pH-Werten. Die Experimente wurden bei 24 °C, 120 rpm, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 50 mL durchgeführt.	90
Abbildung 50:	Vergleich der Wachstumsraten von <i>N. muscorum</i> bei verschiedenen pH-Werten. Die Experimente wurden bei 24 °C, 120 rpm, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 50 mL durchgeführt.....	91
Abbildung 51:	Vergleich der Wachstumsraten von <i>T. sociatus</i> bei verschiedenen Temperaturen auf Agarplatten. Die Experimente wurden bei Temperaturen zwischen 17 und 38 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium mit Agar mit pH 8, über einen Zeitraum von 31 Tagen, in Petrischalen durchgeführt.....	93
Abbildung 52:	Vergleich der Wachstumsraten von <i>N. muscorum</i> bei verschiedenen Temperaturen auf Agarplatten. Die Experimente wurden bei Temperaturen zwischen 17 und 38 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium mit Agar mit pH 6, über einen Zeitraum von 31 Tagen, in Petrischalen durchgeführt.....	93
Abbildung 53:	Vergleich der Wachstumsraten von <i>T. sociatus</i> (TS) und <i>N. muscorum</i> (NM) bei verschiedenen Lichtstärken. Die Experimente wurden bei 24 °C, 120 rpm, einer Lichtstärke von 50 bis 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 50 mL durchgeführt.	96
Abbildung 54:	Verlauf der Elektronentransportrate (ETR) in Abhängigkeit von der Lichtstärke (PAR) am Beispiel von <i>N. muscorum</i>	96

- Abbildung 55: Vergleich der Wachstumsraten von *T. sociatus* und *N. muscorum* bei verschiedenen CO₂-Konzentrationen in der Zuluft. Die Experimente wurden bei 24 °C, 150 rpm, einer Lichtstärke von 100 μE m⁻² s⁻¹, einem CO₂-Gehalt von 0,03 bis 5 %-Vol., unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in einem Rührreaktor mit einem Füllvolumen von 1 L durchgeführt. 99
- Abbildung 56: Mathematische Beschreibung der experimentell bestimmten Wachstumskurve von *Nostoc muscorum* (A) und *T. sociatus* (B). ▲ = die experimentell bestimmte Biomasse BTM pro Zeit im Schüttelkolben bei optimalem pH-Wert und Temperatur. Die schwarze Linie stellt die berechnete Wachstumskurve dar..... 104
- Abbildung 57: Ergebnisse des DoE am Beispiel von *Nostoc muscorum*. Dargestellt ist der Einfluss der einzelnen Versuchsparameter auf die maximale Wachstumsrate μ_{max} [h⁻¹]. Die ermittelten Optima sind in roter Schrift über dem jeweiligen Parameter zu sehen, bzw. auf der Y-Achse..... 106
- Abbildung 58: Absoluter Effekt (Y) der einzelnen Parameter auf die Zielgröße μ_{max}, nach Analyse durch multiple-Regression in Visual-Xsel. 107
- Abbildung 59: Residuen-Verteilung der multiplen Regression. Die Punkte stellen dabei die jeweiligen Versuche dar, je näher sie sich an der blauen Gerade befinden, desto näher liegen sie am erstellten Modell. Die beiden äußeren Linien stellen dabei die Grenzbereiche dar. Liegen die Punkte außerhalb des begrenzten Bereichs, können diese für das Modell in weiteren Betrachtungen ausgeschlossen werden. 108
- Abbildung 60: Auftragung der Zielgröße μ_{max} über dem Mineralsalzgehalt und der CO₂-Konzentration der Zuluft. Die anderen Faktoren entsprechen den jeweiligen Optima: pH = 6,5; Temperatur = 24,5 °C und einer Lichtintensität von 110 μE..... 109
- Abbildung 61: Auftragung der Zielgröße μ_{max} über der Lichtstärke und der CO₂-Konzentration der Zuluft. Die anderen Faktoren entsprechen den jeweiligen Optima: pH = 6,5; Temperatur = 24,5 °C und einem Mineralsalzgehalt von 100 %. 109
- Abbildung 62: Verlauf des pH-Wertes eines beispielhaft gewählten Versuchs (V19, siehe Anhang A.3) mit *N. muscorum*. Initial-pH 5, T=28 °C, 3 % CO₂, 100 % Mineralsalzgehalt, Lichtintensität = 110 μE m⁻² s⁻¹..... 111
- Abbildung 63: Vergleich der experimentell ermittelten Daten (■) aus Versuch 19 des DoE mit dem simulierten Verlauf des Wachstums (rote Linie). Die Versuchsparameter sind in Tabelle 13 dargestellt. Das Modell beschreibt die experimentellen Daten mit einer Genauigkeit von 91 % (R² = 0,91). 113
- Abbildung 64: Vergleich der experimentell ermittelten Daten (■) aus Versuch 16 des DoE mit dem simulierten Verlauf des Wachstums (rote Linie). Die Versuchsparameter sind in Tabelle 14 dargestellt. Das Modell beschreibt die experimentellen Daten mit einer Genauigkeit von 92 % (R² = 0,92). 114



- Abbildung 65: Vergleich der experimentell ermittelten Daten (■) aus Versuch 14 des DoE mit dem simulierten Verlauf des Wachstums (rote Linie). Die Versuchsparameter sind in Tabelle 15 dargestellt. Das Modell beschreibt die experimentellen Daten mit einer Genauigkeit von 83 % ($R^2 = 0,83$)..... 114
- Abbildung 66: Ergebnisse des DoE zum emersen Wachstum von *N. muscorum*. Dargestellt ist der Einfluss der einzelnen Versuchsparameter auf die maximale Wachstumsrate μ_{\max} [h^{-1}]. Die ermittelten Optima sind in roter Schrift über dem jeweiligen Parameter zu sehen. 117
- Abbildung 67: Ergebnisse des DoE zum emersen Wachstum von *T. sociatus*. Dargestellt ist der Einfluss der einzelnen Versuchsparameter auf die maximale Wachstumsrate μ_{\max} [h^{-1}]. Die ermittelten Optima sind in roter Schrift über dem jeweiligen Parameter zu sehen. 118
- Abbildung 68: Explosionszeichnung des emersen Photobioreaktors inkl. Bemaßung. 122
- Abbildung 69: 3D-Darstellung des emersen Photobioreaktors in der Frontansicht (a) und als Längsschnitt (b). 123
- Abbildung 70: Schematische Darstellung der kontinuierlichen Begasung des emersen Photobioreaktors. Die Zahlen 1, 2, 3 und 4 kennzeichnen die vier Anschlüsse, MV steht für die Magnetventile, und die Lichtquelle ist über dem Reaktor angeordnet. 124
- Abbildung 71: Charakterisierung der Oberflächen von Borosilikatglasstäben mit einem AFM nach 60 (A), 90 (B) und 120 (C) Minuten chemischer Behandlung. X,Y und Z stellen die Achsen des dreidimensionalen, gemessenen Raumes in μm bzw. Å dar. 125
- Abbildung 72: Charakterisierung der Oberflächen von Quarzglasstäben mit einem AFM nach 60 (A), 90 (B) und 120 (C) Minuten chemischer Behandlung. X,Y und Z stellen die Achsen des dreidimensionalen, gemessenen Raumes in μm bzw. Å dar. 125
- Abbildung 73: Theoretische Beleuchtung des ePBRs. Von oben werden die Borosilikatstäbe über Kaltlicht-LED's bestrahlt. Sie dienen gleichzeitig als Lichtwellenleiter und als Kultivierungsoberfläche..... 126
- Abbildung 74: Schema der untersuchten Glasstabprototypen. Die Stäbe sind jeweils 140 mm lang und weisen an der Oberseite einen Durchmesser von 5 mm auf. (a) rund klar; (b) rund, matt; (c) rund, konisch, matt; (d) viereckig, konisch, matt. 127
- Abbildung 75: Abnahme der abgestrahlten Lichtstärke von vier Glasstab-Prototypen in Abhängigkeit von der Entfernung zur Lichtquelle. A = Prototyp a (rund, klar); B = Prototyp b (rund, matt); C = Prototyp c (konisch, rund, matt); D = Prototyp d (konisch, viereckig, matt). Die Differenz zwischen der Lichtquelle (0 cm) und dem nächsten Messpunkt (3cm) entspricht dem Abstand des Reaktors von der

	Lichtquelle plus der Dicke des Deckels, durch den die Glasstäbe von oben in den Reaktor hineinreichen.	128
Abbildung 76:	Beispielhafte Darstellung des Temperaturverlaufes im ePBR während einer Kultivierung, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen wird.	129
Abbildung 77:	Beispielhafte Darstellung des Verlaufes der Luftfeuchtigkeit im ePBR während einer Kultivierung, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen wird.	130
Abbildung 78:	CFD-Simulation der Aerosolströmung im emersen Photobioreaktor, basierend auf den technischen Daten des Pariboy SX sowie den Abmessungen des Reaktors.	131
Abbildung 79:	Aufbau und Fließschema des emersen Photobioreaktors. Inbegriffen sind die Aerosolerzeugung, die Begasung, Sterilfilter (0,2 µm Porenweite), das Medienreservoir und die Wiederverwertung, die Dosierpumpe und die Beleuchtung.	132
Abbildung 80:	Schema der Inokulation des emersen Photobioreaktors in 3 Teilschritten; (RG) Reaktionsgefäß, (BFM) Biofeuchtmasse.	133
Abbildung 81:	Vergleich der Wachstumsraten von <i>T. sociatus</i> bei verschiedenen Aerosolmengen pro Tag. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 µE m ⁻² s ⁻¹ , unter Verwendung eines Aerosols aus BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in dem emersen Photobioreaktor durchgeführt.	134
Abbildung 82:	Vergleich der Wachstumsraten von <i>T. sociatus</i> und <i>N. muscorum</i> im ePBR. * markiert die Wachstumsrate unter optimierten Versuchsbedingungen mit einer kontinuierlichen Belüftung des Reaktors. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 µE m ⁻² s ⁻¹ , unter Zugabe von 16 mL Aerosol aus BG 11-Medium pro Tag, über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt.	135
Abbildung 83:	Verlauf der isolierten Photopigmente von <i>T. sociatus</i> in Abhängigkeit von der applizierten Menge an Aerosol pro Tag. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 µE m ⁻² s ⁻¹ , unter Verwendung eines Aerosols aus BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in dem emersen Photobioreaktor durchgeführt.	137
Abbildung 84:	Vergleich der isolierten Photopigmente von <i>T. sociatus</i> und <i>N. muscorum</i> unter optimalen Wachstumsbedingungen (16 mL Aerosol pro Tag). Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 µE m ⁻² s ⁻¹ , unter Zugabe von 16 mL Aerosol aus BG 11-Medium pro Tag, über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt.	138
Abbildung 85:	Isolierte Menge an EPS in Abhängigkeit von der applizierten Menge an Aerosol pro Tag am Beispiel von <i>T. sociatus</i> . Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 µE m ⁻² s ⁻¹ , unter Verwendung eines Aerosols aus BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in dem emersen Photobioreaktor durchgeführt.	139



- Abbildung 86: Vergleich der gebildeten Menge an EPS bei optimalen Wachstumsbedingungen (16 mL Aerosol pro Tag) im ePBR zwischen *T. sociatus* und *N. muscorum*. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Zugabe von 16 mL Aerosol aus BG 11-Medium pro Tag, über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt..... 140
- Abbildung 87: Vergleich der Produktivität der EPS-Produktion in Abhängigkeit von der applizierten Aerosolmenge pro Tag am Beispiel von *T. sociatus*. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung eines Aerosols aus BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in dem emersen Photobioreaktor durchgeführt. 141
- Abbildung 88: Vergleich der extrahierten EPS-Masse nach direkter Isolierung von den Glasstäben und nach Zellernte am Beispiel von *T. sociatus*. 142
- Abbildung 89: Übersicht der Produktivität der Biomassebildung von *Trichocoleus sociatus* in verschiedenen Bioreaktorsystemen. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in verschiedenen Bioreaktorsystemen durchgeführt (vgl. Kapitel 3.5.1). 144
- Abbildung 90: Übersicht der Produktivität der Biomassebildung von *Nostoc muscorum* in verschiedenen Bioreaktorsystemen. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in verschiedenen Bioreaktorsystemen durchgeführt (Vgl. Kapitel 3.5.1). 144
- Abbildung 91: Übersicht der gebildeten Photopigmente Chlorophyll a und Carotinoide bei einer submersen Kultivierung. Die Experimente wurden bei 24 °C, 120 rpm, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 50 mL durchgeführt. Für *N. muscorum* wurde ein pH-Wert von 6 verwendet und für *T. sociatus* ein pH-Wert von 8..... 146
- Abbildung 92: Übersicht der gebildeten Photopigmente Chlorophyll a und Carotinoide bei einer emersen Kultivierung. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Zugabe von 16 mL Aerosol aus BG 11-Medium pro Tag, über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt..... 147
- Abbildung 93: EPS-Produktion in Abhängigkeit von dem pH-Wert am Beispiel von *T. sociatus*. Die Experimente wurden bei 24 °C, 120 rpm, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 50 mL durchgeführt..... 149
- Abbildung 94: EPS-Produktion in Abhängigkeit von dem pH-Wert am Beispiel von *N. muscorum*. Die Experimente wurden bei 24 °C, 120 rpm, einer Lichtstärke von

	100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in 300 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 50 mL durchgeführt.....	149
Abbildung 95:	Ergebnisse des DoE zur Optimierung der submersen EPS-Produktion von <i>N. muscorum</i> . Die jeweiligen ermittelten Optima sind in „rot“ über dem betreffenden Faktor markiert.	151
Abbildung 96:	Vergleich der Produktivitäten der verschiedenen Kultivierungssysteme unter optimalen Bedingungen für das Wachstum und die EPS-Produktion. Die Experimente wurden bei 24 °C, einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, unter Verwendung von BG 11-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen, in verschiedenen Bioreaktorsystemen durchgeführt (vgl. Kapitel 3.9.4 für die Versuche im ePBR, Kapitel 3.10.3.1 für die Versuche im Schüttelkolben und Kapitel 3.10.3.2 für die Versuche im Rührreaktor).....	153
Abbildung 97:	Vergleich der EPS-Zusammensetzung nach submerser und emerser Kultivierung von <i>T. sociatus</i>	155
Abbildung 98:	Vergleich der EPS-Zusammensetzung nach submerser und emerser Kultivierung von <i>N. muscorum</i>	156
Abbildung 99:	Leistungseintrag in Schüttelkolben ohne Stromstörer in Abhängigkeit von Schüttelfrequenz und Volumen nach (Storhas 2012).....	185
Abbildung 100:	Abhängigkeit der Leistungsdichte von Volumen, dem Neigungswinkel des Tablars und der Frequenz der Kipp-Bewegung; die dargestellten Daten sind für individuell für BioWave® und BIOSTAT® CultiBag RM Reaktorsysteme (Eibl et al. 2009).	186
Abbildung 101:	Ergebnisse der Ausgasungsmethode zur Bestimmung des $k_{\text{L}}a$ für CO_2 und O_2 . A = Lineare Regression zur Berechnung des k_{a} -Wertes für Sauerstoff. Bestimmtheitsmaß = 0,9939; $k_{\text{a}} = 23,7066 \text{ h}^{-1}$; B = Lineare Regression zur Berechnung des k_{a} -Wertes von Kohlenstoffdioxid. Bestimmtheitsmaß = 0,9966; $k_{\text{a}} = 15,253 \text{ h}^{-1}$	187
Abbildung 102:	$k_{\text{L}}a$ -Werte des Cultibag RM bestimmt mit Hilfe der Ausgasungsmethode in Abhängigkeit der Wavebag-Größe und der Schüttelfrequenz nach Sartorius GmbH.	190



F Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Parameter der Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i> im Schüttelkolben	21
Tabelle 2:	Parameter der Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i> im Wavebagreaktor.....	28
Tabelle 3:	Die wichtigsten Nährstoffe und ihre Funktion modifiziert nach (Schopfer&Brennicke 2010).....	70
Tabelle 4:	Charakterisierung der verwendeten Bioreaktorsysteme aus Abbildung 43.....	79
Tabelle 5:	Übersicht aller initial für das Screening verwendeter Organismen. Die verwendeten Organismen stammen aus der Sammlung von Prof. Dr. Burkhard Büdel; Technische Universität Kaiserslautern, Abteilung Pflanzenökologie und Systematik.....	83
Tabelle 6:	Parameter der Versuche zur Bestimmung des Einflusses des Leistungseintrages auf die Wachstumsrate.....	85
Tabelle 7:	Parameter der Versuche zur Bestimmung der optimalen pH-Werte von <i>T. sociatus</i> und <i>N. muscorum</i>	90
Tabelle 8:	Parameter der Versuche zur Bestimmung der optimalen Temperatur von <i>T. sociatus</i> und <i>N. muscorum</i>	92
Tabelle 9:	Parameter der Versuche zur Bestimmung der optimalen Lichtstärke von <i>T. sociatus</i> und <i>N. muscorum</i>	95
Tabelle 10:	Parameter der Versuche zur Bestimmung des optimalen CO ₂ -Gehalts für die Kultivierung von <i>T. sociatus</i> und <i>N. muscorum</i>	98
Tabelle 11:	Löslichkeit von CO ₂ in dem verwendeten Medium BG 11 sowie in Deionat zum Vergleich, bei verschiedenen Gehalten von CO ₂ in der Begasung. Die Löslichkeit wurde nach (Weisenberger&Schumpe 1996) berechnet.....	98
Tabelle 12:	Signifikanzen (p-values) der betrachteten Parameter nach Analyse durch multiple-Regression in Visual-Xsel. Werte über 0,05 haben keinen signifikanten Einfluss.	107
Tabelle 13:	Versuchsparameter von Versuch 19 des DoE.....	113
Tabelle 14:	Versuchsparameter von Versuch 16 des DoE.....	113
Tabelle 15:	Versuchsparameter von Versuch 14 des DoE.....	114
Tabelle 16:	Gegenüberstellung der maximalen Wachstumsraten aus den experimentellen Daten und der Simulation.....	115
Tabelle 17:	Übersicht der p-values der Parameter des emersen Wachstums von <i>N. muscorum</i> . Werte über 0,05 haben keinen signifikanten Einfluss.....	117
Tabelle 18:	Übersicht der p-values der Parameter des emersen Wachstums von <i>T. sociatus</i> . Werte über 0,05 haben keinen signifikanten Einfluss.....	118



Tabelle 19:	p-Values der Einflussparameter auf die submerse EPS-Produktion von <i>N. muscorum</i> . Werte über 0,05 sind nicht signifikant.....	151
Tabelle 20:	Zusammenfassung der linearen Regression von Feucht- und Trockenmasse der untersuchten Cyanobakterien <i>Trichocoleus sociatus</i> und <i>Nostoc muscorum</i>	202
Tabelle 21:	Zusammensetzung der isolierten EPS nach submerser Kultivierung. Isolation nach modifizierter Methode von (Staats et al. 1999) und Bestimmung der Bestandteile nach Anhang A3.	206
Tabelle 22:	Zusammensetzung der isolierten EPS nach emerser Kultivierung. Isolation nach modifizierter Methode von (Staats et al. 1999) und Bestimmung der Bestandteile nach Anhang A3.	206
Tabelle 23:	Zusammensetzung LS-Mediums; Alle Bestandteile wurden in desionisiertem Wasser gelöst.	223
Tabelle 24:	Zusammensetzung des HPLC-Eluenten.....	223
Tabelle 25:	Zusammensetzung der Ursol- und Oleanolsäurestandards	224
Tabelle 26:	Konzentration der verwendeten Standards für die Zuckeranalytik	224
Tabelle 27:	Zusammensetzung des zur Kultivierung der Cyanobakterien verwendeten Vollmediums nach (Rippka et al. 1979)	225

G Angaben zur Person

G.1 Betreute Arbeiten

Examens- / Master- / Diplomarbeiten

J. Schuler „Wachstumsoptimierung von terrestrischen Cyanobakterien in Abhängigkeit von Temperatur und CO₂“, Masterarbeit 2014

D. Strieth „Optimierung und Evaluierung von Wachstumsprozessen und Übertragung auf den emersen Photobioreaktor“, Masterarbeit 2013

C. Tautz „Untersuchungen genomisch-sequenzierter Nostoc-Stämme mit neuartigen emersen Fermentationsverfahren“, Examensarbeit 2012

A-S. Schott „Wachstumsoptimierung und Charakterisierung terrestrischer Mikroalgen in einem neuartigen emersen Photobioreaktor“, Masterarbeit 2012

C. Seebach „Entwicklung der Photosynthesemessung terrestrischer Cyanobakterien in einem emersen Photobioreaktor“, Examensarbeit 2011

S. Foltz „Physiologische Charakterisierung der Temperaturadaption terrestrischer Cyanobakterien“, Examensarbeit 2011

Bachelorarbeiten

M. Wüst „Optimierung der Photosynthesemessung und Charakterisierung aerophiler Mikroalgen unter emersen Bedingungen“, Bachelorarbeit 2012

S. Meck „Photosynthese und Lichtadaption terrestrischer Cyanobakterien aus xerischen Habitaten“, Bachelorarbeit 2011

Studienarbeiten

S. Lizcano Arguello „Screening der Triterpenbildung von *Salbei officinalis* bei verschiedenen Lichtstärken“, Studienarbeit 2014

M. Schäfer „Kultivierung von *Salvia officinalis* und *Ocimum basilicum* als Emers- und Submerskultur“, Studienarbeit 2014

J. P. Klein, T. Singh, A. Hoffmann „Vergleich emerser und submerser Fermentation von Cyanobakterien“, Studienarbeit 2013



J. Schiesser, C. Ioannidis „Wachstumsrate von Cyanobakterien im Bioreaktor“, Studienarbeit 2013

P. Eiche, A. Glöckner „Verfahrenstechnische Weiterentwicklung des emersen Photobioreaktors“, Studienarbeit 2012

A. Weber „Charakterisierung verschiedener Kultivierungssysteme für terrestrische Cyanobakterien“, Studienarbeit 2012

Praktika

S. Bittencourt, K. Mendes Negreiros, V. Tozatto „Fermentation of cyanobacteria in a wavebag-reactor-system“, Praktikum im Rahmen eines Erasmusjahres 2014

T. Reck, V. Albers „CO₂-Aufnahme von verschiedenen Cyanobakterien“, Projektarbeit im Team 2014

S. Müller, L. Hitschler, E. Steimers „Vergleich der Wachstumsraten von Cyanobakterien in submersen Systemen“, Projektarbeit im Team 2014

D. Strieth „Optimierung der EPS-Extraktion sowie die Bestimmung der Korrelation von Feucht- zu Trockenmasse bei terrestrischen Cyanobakterien“, Forschungspraktikum 2013

G.2 Veröffentlichungsliste

Peer-reviewed

S. Kuhne, D. Strieth, M. Lakatos, K. Muffler, R. Ulber (2014). A new photobioreactor concept enabling the production of desiccation induced biotechnological products using terrestrial cyanobacteria, *Journal of Biotechnology* 192: 28-33

K. Muffler, M. Lakatos, C. Schlegel, D. Strieth, S. Kuhne, R. Ulber (2014). Application of biofilm bioreactors in white biotechnology, *Advances in biochemical engineering* 146
DOI: 10.1007/10_2013_267

A. Wilming, J. Begemann, S. Kuhne, L. Regestein, J. Bongaerts, S. Evers, KH. Maurer, J. Büchs (2013). Metabolic studies of γ -polyglutamic acid production in *Bacillus licheniformis* by small-scale continuous cultivations, *Biochemical Engineering Journal* 73: 29-37

S. Kuhne, D. Strieth, A. Weber, K. Muffler, M. Lakatos, R. Ulber (2013). Screening of two terrestrial cyanobacteria for biotechnological production processes in shaking flasks, bubble columns and stirred tank reactors, *Journal of applied Phycology* 26 (4): 1-10
DOI 10.1007/s10811-013-0224-z

S. Kuhne, M. Lakatos, S. Foltz, K. Muffler, R. Ulber (2013). Characterization of terrestrial cyanobacteria to increase process efficiency in low energy consuming production processes, *Sustainable Chemical Processes* 1(1), DOI 10.1186/2043-7129-1-6

Non peer-reviewed

K. Muffler, S. Kuhne, R. Ulber (2011). Zugang zum Wertstoffspektrum terrestrischer Cyanobakterien, *GIT Labor-Fachzeitschrift* 10: 670

Konferenzbeiträge

S. Kuhne, K. Muffler, M. Lakatos, R. Ulber (2012). Innovative photobioreactor for cultivation of terrestrial cyanobacteria, *Chemie Ingenieur Technik* 84 (8), DOI:10.1002/cite.201250126

Vorträge

S. Kuhne, K. Muffler, M. Lakatos, R. Ulber. Innovativer Photobioreaktor zur Kultivierung von terrestrischen Cyanobakterien, 30. Jahrestagung der Biotechnologen, Karlsruhe 2012

Poster

S. Kuhne, K. Muffler, M. Lakatos, R. Ulber. Wachstums- und Produktbildungsoptimierung von terrestrischen Cyanobakterien im emersen Photobioreaktor, DECHEMA Himmelfahrtstagung, Bad Wildungen 2013

S. Kuhne, K. Muffler, M. Lakatos, R. Ulber. Entwicklung und Optimierung eines emersen Photobioreaktors, 6ter Bundesalgenstammtisch, Hamburg 2013

S. Kuhne, K. Muffler, M. Lakatos, R. Ulber. Novel emersed photobioreactor and its possible applications, Deutsch-Französischer-Workshop, Rouen 2013



S. Kuhne, K. Muffler, M. Lakatos, R. Ulber. Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen mit terrestrischen Cyanobakterien im emersen Photobioreaktor, Frühjahrstagung der Biotechnologen, Frankfurt a. Main 2013

S. Kuhne, K. Muffler, C. Müller, C. Ziegler, M. Lakatos, R. Ulber. Charakterisierung und Optimierung von Glasoberflächen zur verbesserten Anheftung von Mikroorganismen im Photobioreaktor, Himmelfahrtstagung zum Thema Grenzflächen 2011

S. Kuhne, K. Muffler, M. Lakatos, R. Ulber. An innovative photobioreactor for surface associated fermentation of terrestrial cyanobacteria, ECCE/ECAB, Berlin 2011

K. Muffler, S. Kuhne, R. Ulber. Cyanobakterien als Wertstoffproduzenten, Biotechnica 2011

G.3 Lebenslauf

■ Angaben zur Person

Stephan Kuhne

geboren am 09.07.1982 in Düren (D)

als Sohn von Edeltraud Kuhne geb. Hochmuth und Dr. Helmut Kuhne

■ Beruflicher Werdegang

2014 - heute	Arbeit als Projektingenieur bei VTU Engineering Deutschland GmbH im Bereich der Prozessvalidierung
2010 - 2014	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik an der TU Kaiserslautern (Prof. Ulber)
2003 - 2010	Studium an der Rheinisch – Westfälischen – Technischen – Hochschule (RWTH) Aachen im Fachbereich Biologie. Abschluss mit Diplom im Juni 2010.
2003 - 2010	Nebentätigkeiten während den Semesterferien in der Produktion der chemischen Großindustrie bei Akzo Nobel
2002 – 2003	Grundwehrdienst im Sanitätsdienst der Bundeswehr

■ Schulbildung

1993 – 2002	Besuch des Gymnasiums Kreuzau. Abschluss mit Abitur.
1989 – 1993	Besuch der Grundschule Kreuzau





